

Université de Montréal

**Administration de substances actives dans la peau : rôle de la composition hydrophile de nanoparticules polymériques**

par

Augustine Lalloz Faivre

Thèse effectuée en cotutelle à

la Faculté de Pharmacie  
Université de Montréal

et au

Laboratoire d'Automatique, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique  
Université Claude Bernard Lyon 1

Thèse présentée à

la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal en vue de  
l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)  
en Sciences Pharmaceutiques

et à

l'École Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé ED 205 de l'Université Claude Bernard  
Lyon 1 en vue de l'obtention du grade de Docteur  
en Sciences Pharmacotechniques et Biopharmaceutiques

Décembre, 2018

© Augustine Lalloz Faivre, 2018

## Résumé

La conception de nanoparticules (NPs) polymériques pour le transport de médicaments dans la peau repose sur la compréhension du rôle de leurs compositions chimiques sur leurs interactions avec la peau, notamment la peau pathologique. Ce travail s'est attaché à définir le rôle de la composante hydrophile des NPs sur l'administration cutanée d'un principe actif lipophile modèle (cholécalférol).

Il a été remarqué que la composition hydrophile de polymères amphiphiles à base de PLA conditionnait les propriétés physicochimiques des NPs, notamment la taille, la surface, et la structure, tout comme la protection du cholécalférol. Concernant l'absorption cutanée sur peau intacte, la composante hydrophile de NPs de 100 nm a eu peu d'influence. Une absorption cutanée du cholécalférol légèrement plus importante a toutefois été obtenue à partir des NPs très riches en PEG hydrophile en comparaison aux NPs peu PEGylées. À l'inverse sur peau lésée, les NPs hydrophobes et négativement chargées de PLA seul ont permis la meilleure absorption du cholécalférol.

D'une part, la dynamique de la structure des NPs très PEGylées a permis une meilleure mouillabilité de la peau et une possible extraction de lipides cutanés, pouvant faciliter l'absorption sur peau intacte. D'autre part, la composition de la peau a conditionné la structure des NPs, puisque, sur peau lésée, les espèces ioniques libérées de la peau ont déstabilisé les NPs peu ou non PEGylées. Par adhésion à la surface de la peau, les agrégats de PLA ont pu ainsi faciliter l'absorption sur peau lésée.

Lors du développement de formulations de NPs, leur composition chimique est donc à optimiser selon l'état pathologique de la peau.

**Mots-clés :** nanoparticules polymériques, acide poly(lactique) PLA, poly(éthylène glycol) PEG, composition hydrophile, absorption cutanée, mécanismes d'interactions, peau lésée

## Abstract

The design of clinically efficient polymeric nanoparticles (NPs) for skin drug delivery is based on the understanding of the influence of NPs chemical composition on their interactions with the skin tissue, notably the pathological skin. The aim of this work was to determine the influence of the hydrophilic component of polymeric NPs on the delivery of a lipophilic model drug (cholecalciferol).

It was noticed that the polymeric hydrophilic composition of amphiphilic PLA-based NPs conditioned the NPs physico-chemical properties, notably in terms of size, surface properties, structure and drug protection. With regard to absorption into intact skin, the hydrophilic composition of 100 nm NPs had little impact. Only a slightly greater skin absorption was obtained from NPs with high hydrophilic PEG content compared to weakly PEGylated NPs. On the contrary in impaired skin, hydrophobic and negatively charged non-PEGylated NPs (PLA NPs) provided the best drug absorption.

On the one hand, the dynamic structure of highly PEGylated NPs providing better skin wettability and potential skin lipids extraction may have contributed for increased absorption in intact skin. On the other hand, skin condition altered the NPs structure since it was observed that a non-negligible quantity of ionic species was released from impaired skin, triggering the destabilization of weakly or non-PEGylated charged NPs. However, only PLA aggregates sedimented/adhered onto the skin surface, which could have facilitated absorption in impaired skin.

The polymeric hydrophilic composition of NPs and the pathological skin condition are therefore essential points to consider when designing nanoformulations.

**Keywords:** polymeric nanoparticles, poly(lactic acid) PLA, poly(ethylene glycol) PEG, hydrophilic composition, skin absorption, interaction mechanisms, impaired skin

# Table des matières

RÉSUMÉ .....	X
ABSTRACT.....	II
LISTE DES FIGURES.....	X
LISTE DES TABLEAUX .....	XV
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XVI
REMERCIEMENTS.....	XIX

AVANT-PROPOS.....	1
-------------------	---

-CHAPITRE I- INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	5
---	---

<b>1.1 ADMINISTRATION DE MEDICAMENTS PAR LA VOIE CUTANEE .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 <i>La peau : structure et fonctions</i> .....	6
1.1.1.1 Structure .....	6
1.1.1.1.1 La barrière cutanée : le stratum corneum.....	8
1.1.1.1.2 L'épiderme viable.....	10
1.1.1.1.3 Le derme.....	11
1.1.1.1.4 L'hypoderme.....	12
1.1.1.1.5 Les annexes cutanées.....	12
1.1.1.1.6 Microenvironnement de la surface cutanée .....	13
1.1.1.2 Fonctions de la peau.....	15
1.1.2 <i>Mécanismes de diffusion de molécules dans la peau</i> .....	16
1.1.2.1 Aspects théoriques.....	16
1.1.2.2 Voies de passages dans le <i>stratum corneum</i> .....	17
1.1.2.3 Propriétés physico-chimiques des substances influençant leur absorption dans la peau.....	19
1.1.3 <i>Améliorer la diffusion par la voie cutanée</i> .....	20
1.1.3.1 Sursaturation .....	21
1.1.3.2 Promoteurs d'absorption.....	22
1.1.3.3 Application de forces physiques.....	23
1.1.3.4 Les nanovecteurs.....	24
<b>1.2 LES SYSTEMES NANOPARTICULAIRES POUR LA VOIE CUTANEE .....</b>	<b>25</b>
1.2.1 <i>Les nanotechnologies et l'administration de médicaments</i> .....	25
1.2.1.1 Mise en contexte .....	25
1.2.1.2 Les différents types de systèmes nanoparticulaires.....	27
1.2.1.3 Cas particulier des nanoparticules polymériques.....	31
1.2.1.3.1 Quelques avantages généraux par rapport aux autres types de nanoparticules.....	31
1.2.1.3.2 Compositions.....	31
1.2.1.3.3 Structures .....	33
1.2.2 <i>Enjeux des nanovecteurs pour la voie cutanée</i> .....	33
1.2.2.1 Bénéfices des nanoparticules pour la voie cutanée .....	33
1.2.2.2 Mécanismes connus d'absorption cutanée selon le type de vecteur .....	34
1.2.2.3 Applications et commercialisation.....	36

1.2.3	<i>Illustration des bénéfices des nanoparticules pour la voie cutanée à travers l'exemple des nanoparticules polymériques biodégradables</i> .....	40
1.2.3.1	Encapsulation de substance active, solubilité apparente et stabilité.....	42
1.2.3.2	Absorption cutanée.....	43
1.2.3.3	Efficacité thérapeutique.....	45
1.2.3.4	Réduction des effets secondaires.....	46
<b>1.2</b>	<b>FACTEURS INFLUENÇANT LA BIODISPONIBILITE DANS LA PEAU DES NANOPARTICULES ET/OU DES PRINCIPES ACTIFS A PARTIR DE SYSTEMES PARTICULAIRES.....</b>	<b>47</b>
1.3.1	<i>Facteurs relatifs aux propriétés des nanoparticules</i> .....	49
1.3.1.1	Propriétés physiques.....	50
1.3.1.1.1	Taille.....	50
1.3.1.1.2	Forme.....	53
1.3.1.1.3	Déformabilité des particules molles.....	54
1.3.1.2	Propriétés de surface.....	56
1.3.1.2.1	Charge de surface.....	57
1.3.1.2.2	Hydrophobie/hydrophilie de surface.....	61
1.3.1.3	Stabilité.....	62
1.3.2	<i>Facteurs relatifs à l'application des NPs sur la surface cutanée</i> .....	63
1.3.2.1	Véhicule.....	63
1.3.2.2	Massage.....	65
1.3.2.3	Nanoparticules et méthodes physiques/chimiques.....	66
1.3.3	<i>Influence de la condition pathologique de la peau</i> .....	66
1.3.3.1	Modèles de peaux pathologiques.....	67
1.3.3.2	Pénétration cutanée sur peau non saine.....	69
<b>1.4</b>	<b>DEFINITION DU PROJET DE THESE.....</b>	<b>74</b>
1.4.1	<i>Problématique de la vectorisation de substances actives dans la peau à partir de nanoparticules polymériques biodégradables</i> .....	74
1.4.2	<i>Hypothèse</i> .....	76
1.4.3	<i>Objectifs du projet de thèse</i> .....	76
	<b>REFERENCES AVANT-PROPOS ET CHAPITRE I.....</b>	<b>82</b>
	<b>-CHAPITRE II- SYNTHÈSE D'UNE LIBRAIRIE DE COPOLYMÈRES BIOCOMPATIBLES.....</b>	<b>98</b>
<b>2.1</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>99</b>
<b>2.2</b>	<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>102</b>
2.2.1	<i>Matériel</i> .....	102
2.2.2	<i>Méthodes</i> .....	102
2.2.2.1	Méthodes utilisées pour la caractérisation des polymères.....	102
2.2.2.1.1	Résonance Magnétique Nucléaire.....	102
2.2.2.1.2	Chromatographie de Perméation de Gel.....	103
2.2.2.2	Synthèse de polymères linéaires (A, B, C).....	103
2.2.2.2.1	Synthèse de polymères PLA (A).....	103
2.2.2.2.2	Synthèse de polymères PLA-b-PEG diblocs (B).....	104
2.2.2.2.3	Synthèse de polymère PLA-b-PMPC diblocs (C).....	105
2.2.2.3	Synthèse de polymères PLA-PEG « branchés » (D).....	107
2.2.2.4	Synthèse de polymère fluorescent PLA-Cy5 (E).....	110
<b>2.3</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>111</b>
2.3.1	<i>Librairie de polymères linéaires</i> .....	111
2.3.1.1	Caractéristiques des polymères diblocs linéaires PLA-b-PEG.....	114
2.3.1.2	Caractéristiques du polymère PLA-b-PMPC.....	114

2.3.2	<i>Librairie de polymères branchés</i> .....	116
2.3.2.1	Synthèse en masse.....	117
2.3.2.2	Optimisation des conditions de synthèse en solution.....	121
2.3.2.3	Caractéristiques des polymères branchés PLA- <i>b</i> -PEG synthétisés en solution.....	123
2.3.2.4	Comparaison avec les autres méthodes de synthèses de polymères PLA- <i>b</i> -PEG branchés .	126
2.3.3	<i>Polymère fluorescent</i> .....	128
<b>2.4</b>	<b>CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE II</b> .....	<b>129</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES CHAPITRE II</b> .....	<b>131</b>

## **-CHAPITRE III- FABRICATION DE NANOPARTICULES : COMMENT CONTRÔLER LEURS PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES ?..... 132**

<b>3.1</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE DU CHAPITRE III</b> .....	<b>133</b>
------------	--	------------

### **-PARTIE I- FABRICATION DE NANOPARTICULES : INFLUENCE DE LA COMPOSITION ET DE L'ARCHITECTURE DE POLYMÈRES AMPHIPHILES SUR LEURS PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES..... 135**

<b>3.2</b>	<b>INTRODUCTION PARTIE I</b> .....	<b>136</b>
------------	------------------------------------	------------

<b>3.3</b>	<b>MATERIEL ET METHODES PARTIE I</b> .....	<b>137</b>
------------	--	------------

3.3.1	<i>Matériel</i> .....	137
-------	-----------------------	-----

3.3.2	<i>Méthodes</i> .....	138
-------	-----------------------	-----

3.3.2.1	Fabrication des nanoparticules.....	138
---------	-------------------------------------	-----

3.3.2.2	Caractérisation des nanoparticules.....	139
---------	---	-----

3.3.2.2.1	Taille.....	139
-----------	-------------	-----

3.3.2.2.2	Potentiel Zêta.....	139
-----------	---------------------	-----

3.3.2.2.3	Évaluation de la surface des NPs par étude du PEG de surface.....	139
-----------	---	-----

<b>3.4</b>	<b>RESULTATS &amp; DISCUSSION PARTIE I</b> .....	<b>141</b>
------------	--	------------

3.4.1	<i>Influence de l'architecture et du contenu en PEG des polymères sur la taille, la polydispersité et le potentiel Zêta de NPs</i> .....	141
-------	--	-----

3.4.1.1	Taille et polydispersité.....	142
---------	-------------------------------	-----

3.4.1.2	Potentiel Zêta.....	142
---------	---------------------	-----

3.4.2	<i>Influence du contenu en PEG dans les polymères sur la couronne hydrophile</i> .....	145
-------	--	-----

3.4.2.1	Taille et potentiel Zêta des NPs fabriquées pour la quantification du PEG en surface.....	145
---------	---	-----

3.4.2.2	Étude RMN du PEG en surface.....	146
---------	----------------------------------	-----

3.4.2.2.1	Pourcentage de PEG en surface.....	147
-----------	------------------------------------	-----

3.4.2.2.2	Densité de PEG à la surface.....	150
-----------	----------------------------------	-----

3.4.2.2.3	Conformation du PEG à la surface des NPs.....	151
-----------	---	-----

<b>3.5</b>	<b>CONCLUSION DE LA PARTIE I</b> .....	<b>154</b>
------------	--	------------

### **-PARTIE II- FABRICATION DE NANOPARTICULES : MODULER LA TAILLE DES NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES ..... 155**

<b>3.6</b>	<b>INTRODUCTION PARTIE II</b> .....	<b>156</b>
------------	-------------------------------------	------------

<b>3.7</b>	<b>MATERIEL ET METHODES PARTIE II</b> .....	<b>159</b>
------------	---	------------

3.7.1	<i>Matériel</i> .....	159
-------	-----------------------	-----

3.7.2	<i>Méthodes</i> .....	159
-------	-----------------------	-----

3.7.2.1	Nanoprécipitation classique.....	159
---------	----------------------------------	-----

3.7.2.2	Nanoprécipitation Flash.....	159
---------	------------------------------	-----

3.7.2.3	Microfluidique.....	160
---------	---------------------	-----

3.7.2.4	Paramètres de fabrication étudiés.....	161
3.7.2.5	Caractérisation de la taille des nanoparticules.....	162
<b>3.8</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION PARTIE II .....</b>	<b>162</b>
3.8.1	<i>Influence du débit de fabrication.....</i>	<i>162</i>
3.8.1	<i>Influence de la concentration en polymère .....</i>	<i>162</i>
<b>3.9</b>	<b>CONCLUSION PARTIE II .....</b>	<b>166</b>
<b>3.10</b>	<b>CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE III .....</b>	<b>168</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CHAPITRE III.....</b>	<b>170</b>
<b>-CHAPITRE IV- INFLUENCE DE LA CHIMIE DE SURFACE DE NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES SUR LA PÉNÉTRATION CUTANÉE D'UN ACTIF MODÈLE..... 172</b>		
<b>4.1</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE DU CHAPITRE IV .....</b>	<b>173</b>
ARTICLE: EFFECT OF SURFACE CHEMISTRY OF POLYMERIC NANOPARTICLES ON CUTANEOUS PENETRATION OF CHOLECALCIFEROL ..... 175		
<b>4.2</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>176</b>
<b>4.3</b>	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>177</b>
<b>4.4</b>	<b>MATERIALS &amp; METHODS .....</b>	<b>179</b>
4.4.1	<i>Materials .....</i>	<i>179</i>
4.4.2	<i>Polymers synthesis .....</i>	<i>180</i>
4.4.2.1	Polymer characterization .....	180
4.4.2.2	PLA synthesis .....	181
4.4.2.4	PLA- <i>b</i> -PMPC synthesis.....	181
4.4.2.4.1	Synthesis of PLA-Br.....	182
4.4.2.4.2	Synthesis of PLA- <i>b</i> -PMPC diblock copolymer using ATRP.....	182
4.4.3	<i>Nanoparticles manufacturing using Flash Nanoprecipitation .....</i>	<i>182</i>
4.4.3.1	Preparation and purification of NPs.....	182
4.4.3.2	Characterization .....	183
4.4.3.2.1	Size.....	183
4.4.3.2.2	Zeta Potential .....	183
4.4.3.2.3	Drug content.....	183
4.4.3.2.4	TEM imaging.....	184
4.4.3.2.5	Hydrophilic block surface density .....	184
4.4.3.2.6	Percentage of pure drug NPs in polymeric nanosuspensions.....	185
4.4.4	<i>Cholecalciferol stability in NPs .....</i>	<i>185</i>
4.4.5	<i>Cholecalciferol release from NPs .....</i>	<i>185</i>
4.4.6	<i>Cholecalciferol skin penetration studies.....</i>	<i>186</i>
4.4.7	<i>Drug quantification by UV-HPLC.....</i>	<i>187</i>
4.4.8	<i>Statistical analysis.....</i>	<i>188</i>
<b>4.5</b>	<b>RESULTS AND DISCUSSIONS .....</b>	<b>188</b>
4.5.1	<i>Polymers characteristics .....</i>	<i>188</i>
4.5.2	<i>Optimisation of the NPs physicochemical properties.....</i>	<i>189</i>
4.5.3	<i>Cholecalciferol stability .....</i>	<i>195</i>
4.5.4	<i>Cholecalciferol release.....</i>	<i>197</i>
4.5.5	<i>Cholecalciferol skin absorption .....</i>	<i>199</i>
<b>4.6</b>	<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>202</b>
<b>4.7</b>	<b>ANNEXE A: SUPPLEMENTARY DATA DE L'ARTICLE .....</b>	<b>204</b>

4.7.1	<i>Determination of the hydrophilic block content in NPs</i> .....	204
4.7.1.1	NMR spectra of polymers.....	204
4.7.1.2	Calculations of PEG and PMPC content in PLA- <i>b</i> -PEG and PLA- <i>b</i> -PMPC polymers from <sup>1</sup> H NMR spectrum	205
4.7.1.2.1	PLA- <i>b</i> -PEG.....	205
4.7.1.2.2	PLA- <i>b</i> -PMPC.....	205
4.7.2	<i>Determination of the hydrophilic block density on NPs surface</i> .....	206
4.7.2.1	PLA- <i>b</i> -PEG.....	206
4.7.2.1.1	PLA- <i>b</i> -PEG NMR quantification spectra.....	206
4.7.2.1.2	Calculations of PEG surface density based on NMR results.....	207
4.7.2.2	PLA- <i>b</i> -PMPC.....	208
4.7.2.2.1	PLA- <i>b</i> -PMPC NMR quantification spectra.....	208
4.7.2.2.2	Calculations of PMPC surface density based on NMR results.....	209
<b>4.8</b>	<b>CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE IV</b> .....	<b>211</b>
	<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES CHAPITRE IV</b> .....	<b>213</b>

## **-CHAPITRE V- APPROFONDISSEMENT DES MÉCANISMES D'INTERACTIONS NANOPARTICULES-PEAU LIÉS À LA SURFACE ET LA STRUCTURE DE NANOPARTICULES POLYMÉRIQUES..... 218**

### **5.1 INTRODUCTION GENERALE DU CHAPITRE V.....219**

#### **SUBTLE AND UNEXPECTED ROLE OF PEG IN TUNING THE PENETRATION MECHANISMS OF PLA-BASED NANO-FORMULATIONS INTO INTACT AND IMPAIRED SKIN..... 221**

### **5.2 ABSTRACT .....222**

### **5.3 INTRODUCTION.....223**

### **5.4 MATERIALS AND METHODS.....226**

#### *5.4.1 Materials*.....226

#### *5.4.2 Formulations Preparation and Purification*.....226

#### *5.4.3 Nanoparticles Characterization*.....227

##### 5.4.3.1 Size measurements.....227

##### 5.4.3.2 Zeta potential measurements.....227

##### 5.4.3.3 Drug loading and drug yield.....227

##### 5.4.3.4 Quantification of fabrication yield.....228

##### 5.4.3.5 Total and surface PEG quantification by NMR Analysis.....228

##### 5.4.3.6 Cryo-Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM).....228

##### 5.4.3.7 Colloidal Stability studies.....229

#### *5.4.4 Skin Penetration Studies*.....229

##### 5.4.4.1 Skin preparation.....229

##### 5.4.4.2 In vitro assessment of cholecalciferol skin absorption.....230

#### *5.4.5 HPLC Titration of Cholecalciferol*.....230

#### *5.4.6 Interactions Between Skin Components and Nanoparticles*.....231

##### 5.4.6.1 NPs stability in suspension upon exposure to skin-conditioned solution.....231

##### 5.4.6.2 Visualization of NPs sedimentation on impaired skin surface.....231

##### 5.4.6.3 Evaluation of the alteration of lipid surface model.....232

#### *5.4.7 Data analysis*.....231

### **5.5 RESULTS AND DISCUSSION.....233**

#### *5.5.1 Increase of PEG chain length induces structural changes from solid NPs to micellar NPs*.....233

5.5.2	<i>Skin penetration of encapsulated active compound is PEG-dependent</i> .....	237
5.5.3	<i>Colloidal stability and aggregates adhesion drive the penetration of encapsulated active compounds in non- and weakly PEGylated particles</i> .....	243
5.5.4	<i>Affinity between highly PEGylated NPs and skin surface lipids mediate active compound penetration</i> .....	247
5.5.5	<i>Summary of the mechanisms</i> .....	249
<b>5.6</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>250</b>
<b>5.7</b>	<b>ANNEXE B: SUPPLEMENTARY DATA DE L'ARTICLE</b> .....	<b>251</b>
5.7.1	<i>Materials</i> .....	251
5.7.2	<i>Polymer Synthesis and Characterization</i> .....	251
5.7.2.1	PLA synthesis .....	251
5.7.2.2	PLA-b-PEG diblock synthesis.....	252
5.7.2.3	Fluorescent polymer PLA-Cy5.....	252
5.7.2.4	Polymer Characterization.....	253
5.7.3	<i>Colloidal Stability: evolution of zeta potential</i> .....	253
5.7.4	<i>Differential scanning calorimetry</i> .....	254
5.7.5	<i>Drug-loaded NP degradation study</i> .....	255
5.7.6	<i>NPs colloidal stability in saline</i> .....	255
5.7.7	<i>NPs colloidal stability in a surfactant medium</i> .....	256
<b>5.8</b>	<b>CONCLUSION GENERALE DU CHAPITRE V</b> .....	<b>257</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CHAPITRE V</b> .....	<b>259</b>

## **-CHAPITRE VI- DISCUSSION GÉNÉRALE ..... 263**

<b>6.1</b>	<b>QUEL EST LE ROLE DE LA COMPOSITION HYDROPHILE (TYPE, ARCHITECTURE ET QUANTITE) SUR LES PROPRIETES DES NANOPARTICULES ?</b> .....	<b>265</b>
6.1.1	<i>Structure et propriétés de surface des NPs en fonction de la composition hydrophile</i> ...265	
6.1.1.1	Taille.....	265
6.1.1.2	Propriétés de surface.....	266
6.1.1.3	Morphologie et dynamisme.....	267
6.1.2	<i>Encapsulation de molécules actives dans les NPs en fonction de la composition hydrophile</i> 269	
6.1.3	<i>Stabilité de molécules labiles dans les NPs en fonction du type de composition hydrophile</i> 270	
6.1.4	<i>Libération de molécules actives à partir des NPs en fonction du type de composition hydrophile</i> 272	
<b>6.2</b>	<b>COMMENT CONTROLER FACILEMENT LA TAILLE ET LA SURFACE DES NANOPARTICULES ?</b>	<b>273</b>
<b>6.3</b>	<b>QUELLES SONT LES INTERACTIONS SPECIFIQUES ENTRE LA PEAU ET LES NANOPARTICULES POLYMERIQUES POUVANT INFLUENCER LA PENETRATION CUTANEE DU CHOLECALCIFEROL, SELON LEUR COMPOSITION HYDROPHILE ET L'ETAT DE LA PEAU ?</b> .....	<b>275</b>
6.3.1	<i>L'effèt du PEG et PMPC en surface des NPs sur la pénétration cutanée dans la littérature</i> 275	
6.3.2	<i>Mécanismes proposés dans ce projet</i> .....	276
6.3.3	<i>Précisions à apporter concernant les mécanismes d'interactions cutanés</i> .....	280
6.3.3.1	Agrégation/Adhésion-accumulation .....	280
6.3.3.2	Dynamisme des NPs et mouillabilité de la peau/extraction de lipides .....	282
6.3.3.3	Comparaison particules polymériques très PEGylées et micelles de tensioactifs .....	284
6.3.4	<i>Mécanismes complémentaires à définir</i> .....	285
6.3.4.1	Devenir des nanoparticules dans la peau.....	285
6.3.4.2	Interactions cellulaires.....	287

<b>6.4</b>	<b>QUELLE EST L'EFFICACITE D'ABSORPTION CUTANEE DES NANOPARTICULES POLYMERIQUES TESTEES POUR L'ABSORPTION DU CHOLECALCIFEROL DANS LA PEAU EN COMPARAISON A D'AUTRES SYSTEMES DE LA LITTERATURE ? .....</b>	<b>289</b>
<b>6.5</b>	<b>EST-CE QU'UNE COMPOSITION POLYMERIQUE HYDROPHILE APPORTE UN INTERET SUPPLEMENTAIRE POUR L'ADMINISTRATION CUTANEE EN COMPARAISON A DES PARTICULES HYDROPHOBES PLUS SIMPLES ? .....</b>	<b>292</b>
	<b>-CHAPITRE VII- CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>295</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES CHAPITRES VI ET VII.....</b>	<b>299</b>

# Liste des figures

<b>Figure A.1</b> Nombre de publications dans le moteur de recherche PubMed au 08/08/2018 avec les recherches suivantes de mots-clés dans le titre ou le résumé : A) "nanoparticle" et B) "nanoparticle" et ("skin" ou "cutaneous" ou "topical" ou "transdermal").	<b>3</b>
<b>Figure 1.1</b> Schéma représentant la structure de la peau et ses différents constituants	<b>7</b>
<b>Figure 1.2</b> Différentiation des kératinocytes dans la couche épidermale de la peau.	<b>8</b>
<b>Figure 1.3</b> Organisation lipidique dans le stratum corneum humain. 1) Le stratum corneum est la couche supérieure de l'épiderme et 2) est constitué de cornéocytes dispersés dans une matrice lipidique (modèle brique et mortier). 3) Les lipides intercellulaires sont arrangés sous forme de phases lamellaires, qui ont une courte ou longue périodicité (d). Les bicouches peuvent s'arranger selon trois organisations latérales : orthorhombique, hexagonal ou liquide désordonnée.	<b>10</b>
<b>Figure 1.4</b> Voie de pénétration des actifs dans la peau (stratum corneum). a) voie des annexes cutanées, b) voie transcellulaire, c) voie intercellulaire.	<b>18</b>
<b>Figure 1.5</b> Structures chimiques de principaux promoteurs chimiques d'absorption cutanée	<b>22</b>
<b>Figure 1.6</b> Méthodes physiques pour améliorer la diffusion des actifs dans la peau	<b>24</b>
<b>Figure 1.7</b> Comparaison de la taille des nano-objets à celle des principales structures biologiques.	<b>25</b>
<b>Figure 1.8</b> Types de systèmes nanoparticulaires utilisées dans le domaine biomédical. Les systèmes ne sont pas représentés à l'échelle.	<b>28</b>
<b>Figure 1.9</b> Structure chimique des unités de répétition des blocs polymériques communément utilisés dans la fabrication de NPs polymériques pour le domaine biomédical	<b>33</b>
<b>Figure 1.10</b> Stabilité du cholécalciférol (VD3) encapsulé dans des Tyrosphères® ou dissout dans du méthanol (contrôle).	<b>43</b>
<b>Figure 1.11</b> A) Pourcentage de cellules CD8+ proliférant suivant la coculture avec cellules dendritiques présentes dans les ganglions lymphatiques drainant après 3, 4, 7, 14 ou 21 jours suivant l'immunisation avec des NPs blanches (b-NPs), des NPs chargées en ovalbumine (OVA-NPs) et l'ovalbumine seule. B) Pourcentage de cellules CD8+ proliférant suivant la coculture avec cellules dendritiques présentes dans les ganglions lymphatiques drainant après immunisation avec les b-NPs, les OVA-NPs et l'ovalbumine seule, stockées 1 jour ou 4, 6, 10 semaines avec l'immunisation. n=3 répétitions.	<b>45</b>
<b>Figure 1.12</b> A) Pourcentage de viabilité tissulaire d'un épiderme reconstruit après traitement avec un gel de NPs d'adapalène (Ada-Tyr Mp407) et avec le gel commercial Differin®. B) Libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\alpha$ et C) IL-8 à partir d'un épiderme reconstruit traité avec les NPs, le gel commercial ou un tampon PBS *P < 0.05, **P < 0.01.	<b>46</b>
<b>Figure 1.13</b> Propriétés physico-chimiques des NPs pouvant influencer l'absorption cutanée	<b>49</b>
<b>Figure 1.14</b> Pénétration de NPs fluorescentes de polystyrène de différentes tailles via le follicule pileux, (peau prétraitée par colle cyanoacrylate).	<b>52</b>
<b>Figure 1.15</b> A un contenu de lipidique identique, la réduction de la taille des NPs augmente le nombre de NPs. Le film de NPs devient plus dense, augmentant ainsi le facteur d'occlusion.	<b>53</b>

<b>Figure 1.16</b> Déformabilité des Transferosomes®. A) Simulation informatique de la pénétration dans des pores de vésicules déformables (en rouge, distribution du tensioactif dans la vésicule). B) Image de microscopie électronique de vésicules déformables allongées dans des pores aqueux inter-cornéocytaires de stratum corneum humain après déposition des vésicules sur la peau	<b>55</b>
<b>Figure 1.17</b> A) LogP de dendrimères en fonction des terminaisons de surface (COOH, acétyl, NH <sub>2</sub> , et acide oléique). B) Distribution des dendrimères entre la formulation et la peau selon le log P.	<b>61</b>
<b>Figure 1.18</b> A) Pénétration de particules de PLGA fluorescentes ou B) de fluorophore libre sous massage de la peau. C) Pénétration contrôlée des particules de PLGA et D) du fluorophore libre sans massage. La fluorescence est représentée par les zones blanches sur les images de microscopie.	<b>65</b>
<b>Figure 1.19</b> Images cliniques représentatives de la condition de la peau (ligne continue peau intacte, pointillée peau lésée). La dermatite atopique est caractérisée par une confluence de papulo-vésicules. Le psoriasis est caractérisé par une hyperprolifération de l'épiderme avec des plaques caractéristiques.	<b>67</b>
<b>Figure 1.20</b> A) Pénétration des actifs dans la peau depuis les NPs qui ne pénètrent pas au-delà du stratum corneum. B) Pénétration possible des NPs sur peau lésée	<b>70</b>
<b>Figure 1.21</b> Caractéristiques de la librairie de polymères	<b>77</b>
<b>Figure 1.22</b> Variation du diamètre hydrodynamique des NPs fabriquées à partir de la librairie de polymères selon la composition hydrophile et le procédé de fabrication. Pour un même polymère, le procédé de fabrication peut en effet avoir un rôle important sur la taille finale de la particule.	<b>78</b>
<b>Figure 1.23</b> Chimie de surface des NPs étudiées ayant un diamètre hydrodynamique identique.	<b>79</b>
<b>Figure 1.24</b> Composition hydrophile (quantité de PEG) des NPs étudiées ayant un diamètre hydrodynamique identique.	<b>80</b>
<b>Figure 2.1</b> Représentation schématique des copolymères d'architecture linéaire (A) ou branchés (B)	<b>100</b>
<b>Figure 2.2</b> Structures chimiques des polymères de la librairie synthétisée	<b>101</b>
<b>Figure 2.3</b> Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA	<b>105</b>
<b>Figure 2.4</b> Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA-b-PEG (c= 12, 22, 45, 114 ou 227)	<b>105</b>
<b>Figure 2.5</b> Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA-b-PMPC	<b>106</b>
<b>Figure 2.6</b> Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA-p-PEG (h= 12, 22, 45, ou 114)	<b>108</b>
<b>Figure 2.7</b> Schéma réactionnel de la synthèse du polymère fluorescent PLA-Cy5	<b>111</b>
<b>Figure 2.8</b> Structures des polymères synthétisés et spectres RMN typiques. (A) PLA, (B) PLA-b-PEG2K 12,2 % théorique, (C) PLA-b-PMPC	<b>113</b>
<b>Figure 2.9</b> Structures des mPEG-époxyde et des polymères branchés synthétisés et spectres RMN typiques. (A) mPEG-époxyde2K, (B) PLA-p-PEG2K 12.2 % théorique	<b>117</b>
<b>Figure 2.10</b> Masse molaire du squelette PLA obtenu par synthèse en masse en fonction (A) du ratio initial PEG/AL dans le milieu réactionnel et (B) du pourcentage réel de PEG inséré dans les polymères	<b>118</b>
<b>Figure 2.11</b> Études de conversion du polymère PLA-p-PEG (12.2% de PEG 2000) synthétisé en solution dans le toluène. (A) Structure chimique des réactifs et du produit de synthèse. (B) Spectre RMN du PLA-p-PEG2K 12.2% p/p de PEG théorique après 3 heures de synthèse. (C) Conversion en fonction du temps lorsque la synthèse est réalisée par ajout du D,L-dilactide en 1 fois (D) Conversion en fonction du temps lorsque la synthèse est	<b>122</b>

réalisée par ajout du D,L-dilactide en 4 fois au cours de la synthèse. Les flèches indiquent le moment où le D,L-dilactide a été ajouté au cours de la synthèse.	
<b>Figure 2.12</b> Masse molaire du squelette PLA par synthèse en masse (ronds pleins) ou en solution (ronds vides) en fonction (A) du ratio initial PEG/AL dans le milieu réactionnel et (B) du pourcentage réel de PEG inséré dans les polymères	<b>128</b>
<b>Figure 2.13</b> Voie de synthèse de polymères PLA-PEG greffés (structure branchée) préalablement utilisée au sein du Laboratoire du Pr.Hildgen	<b>126</b>
<b>Figure 2.14</b> Schéma des polymères PLA-p-PEG avec une seule chaîne de PEG par chaîne de polymère en configuration pendante (A) ou en bout de chaîne (B)	<b>128</b>
<b>Figure 3.1</b> Schéma du procédé de fabrication de NPs par nanoprécipitation classique	<b>139</b>
<b>Figure 3.2</b> Caractérisation des NPs fabriquées en fonction de l'architecture du polymère et du contenu en bloc hydrophile PEG. A) Diamètre hydrodynamique des NPs. B) Potentiel Zêta des NPs. C) Indice de polydispersité des NPs. D) Indice de polydispersité des NPs en fonction de la polydispersité des polymères.	<b>144</b>
<b>Figure 3.3</b> Caractérisation des NPs fabriquées à partir de mélanges PLA/PLA-b-PEG A) Diamètre hydrodynamique des NPs (en nombre) B) Potentiel Zêta des NPs	<b>146</b>
<b>Figure 3.4</b> Spectres RMN de NPs fabriquées à partir de PLA-b-PEG 5K (100%), dissoutes dans CDCl <sub>3</sub> ou en suspension dans D <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O. Le standard interne (SI) présent dans D <sub>2</sub> O est le sel de sodium de l'acide 3-(triméthylsilyl) propionique-2,2,3,3-d <sub>4</sub> . La structure du polymère est indiquée en rappel pour comprendre l'attribution des protons.	<b>147</b>
<b>Figure 3.5</b> A) Organisation cœur-couronne théorique d'une NPs à base de copolymères amphiphiles PLA-PEG. B) Organisation réelle pouvant être obtenue sous certaines conditions	<b>148</b>
<b>Figure 3.6</b> % de PEG à la surface en fonction A) du contenu massique en PEG dans le mélange et B) du contenu molaire de chaînes PLA-b-PEG dans le mélange.	<b>149</b>
<b>Figure 3.7</b> Caractérisation de la surface de NPs fabriquées à partir de mélanges PLA/PLA-b-PEG. E) Densité de motifs EG à la surface des NPs. F) Densité de chaînes PEG à la surface des NPs	<b>151</b>
<b>Figure 3.8</b> Conformations possibles du PEG à la surface de NPs à base de copolymères amphiphiles PLA-PEG	<b>151</b>
<b>Figure 3.9</b> Mécanisme de formation des particules pendant la nanoprécipitation.	<b>157</b>
<b>Figure 3.10</b> Procédé de fabrication de NPs par Nanoprécipitation Flash A) Bloc de micromélange. Deux seringues sont connectées au système. Les débit d'injection, volumes et ratio phase organique : phase aqueuse peuvent être variés, soit par injection manuelle, soit en utilisant un pousse seringue, soit en utilisant le pousse seringue du système NanoAssemblr™ Benchtop™ B) Dimensions du micromélangeur utilisé C) Géométrie du système de Nanoprécipitation Flash.	<b>160</b>
<b>Figure 3.11</b> Procédé de fabrication de NPs par microfluidique. A) Appareil NanoAssemblr™ Benchtop™, composé d'un système de pousse-seringue contrôlé par ordinateur. Les seringues, remplies de phase organique et de phase aqueuse sont connectés à la cartouche de microfluidique. Les débits d'injection, volumes et ratio phase : organique phase aqueuse peuvent être variés B) Cartouche de microfluidique NanoAssemblr™. C) Géométrie du système microfluidique. Les micro-canaux sont composés de structures en chevrons qui induisent des zones de mélanges chaotiques.	<b>161</b>
<b>Figure 3.12</b> Influence des paramètres des procédés de fabrication étudiés sur la distribution de taille des NPs. A) Influence du débit total d'injection sur le diamètre hydrodynamique des NPs et B) sur leur polydispersité (ratio 5 :1, 20 mg/ml de polymère). C) Influence de la concentration en polymère dans la phase organique sur le diamètre hydrodynamique des NPs et D) sur leur polydispersité (ratio 5 :1, débit 12 mL/min).	<b>165</b>
<b>Figure 4.1</b> Chemical structure of PLA, PLA-b-PEG, and PLA-b-PMPC polymers.	<b>188</b>

<b>Figure 4.2</b> Physicochemical characteristics of NPs as a function of total flow rate and polymer. A) Hydrodynamic diameter, B) Polydispersity Index, C) Zeta Potential, and D) Drug yield.	<b>190</b>
<b>Figure 4.3</b> (A) Schematic representations of the different 100 nm-NPs under study along with (B) their representative TEM images. Black regions in the schematic represent cholecalciferol.	<b>193</b>
<b>Figure 4.4</b> Cholecalciferol percentage in supernatant after centrifugation of the NPs.	<b>194</b>
<b>Figure 4.5</b> Cholecalciferol degradation from different nanoformulations incubated at 37 °C (n = 6 ± SD). A) Cholecalciferol degradation from formulations without BHT antioxidant for 24 h. B) Percentage of remaining cholecalciferol in nanoformulations with (filled columns) or without BHT antioxidant (hatched columns) after 24 h of incubation. Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test (p < 0.05) for degradation without BHT.	<b>196</b>
<b>Figure 4.6</b> Cholecalciferol release in a model lipophilic medium (isopropyl myristate) from different nanoformulations over a period of 24 h at 37 °C (n = 3 ± SD).	<b>198</b>
<b>Figure 4.7</b> Effects of nanoformulation type on skin distribution of cholecalciferol in intact and impaired pig skin after 24 h exposure. Applied dose of cholecalciferol was 35 µg/cm <sup>2</sup> . Filled and hatched columns represent respectively absorption in intact and impaired skin. Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test (p < 0.05) for n > 6 independent experiments.	<b>200</b>
<b>Figure 4.S1</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of PLA, PLA-b-PEG and PLA-b-PMPC polymers.	<b>204</b>
<b>Figure 4.S2</b> <sup>1</sup> H-NMR signals attribution of PLA, PLA-b-PEG and PLA-b-PMPC polymers.	<b>205</b>
<b>Figure 4.S3</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of PLA-b-PEG NPs in CDCl <sub>3</sub> and D <sub>2</sub> O	<b>207</b>
<b>Figure 4.S4</b> <sup>1</sup> H NMR spectra of PLA-b-PMPC NPs in CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD and D <sub>2</sub> O	<b>209</b>
<b>Figure 5.1</b> Comparison of the dynamics of the NPs structures. A) Representative cryo-TEM images of the different NPs. B) Colloidal stability of NP suspension represented by the evolution of NPs size as a function of storage time at 4°C. C) Fraction of free polymer in the nanosuspensions after dialysis, which does not form NPs, recovered by ultracentrifugation correlated with the rate of Ostwald ripening as a function of PEG proportion in polymers	<b>235</b>
<b>Figure 5.2</b> Effects of formulation type on total skin absorption of cholecalciferol after 24 h exposure in A) intact, B) stripped pig skin and C) both compared. Applied dose was 35 µg/cm <sup>2</sup> . Data are given as mean ± SEM. Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test (p < 0.05) for n > 7 independent experiments.	<b>240</b>
<b>Figure 5.3</b> Total cholecalciferol retained in intact and stripped skin as a function of PEG content in NPs. Data are given as mean ± SEM.	<b>241</b>
<b>Figure 5.4</b> NPs hydrodynamic diameter before and after exposure to intact skin-conditioned solution or impaired skin-conditioned solution. Data are given as mean ± standard deviation.	<b>245</b>
<b>Figure 5.5</b> NPs adhesion/sedimentation onto damaged skin surface. A) Cholecalciferol quantity recovered in the first strip of impaired skin after treatment. B) Mean fluorescence intensities measured on the first strip relative to the fluorescent NPs aggregated on skin. C) Representative microscopy images of the first strip of revealing the presence of PLA polymer aggregates on damaged skin surface. Data in A) and B) are given as mean ± standard deviation.	<b>257</b>
<b>Figure 5.6</b> Difference of work of adhesion of a water droplet on a ceramide surface before and after treatment with NPs suspension. Negative values indicate an increase of surface hydrophilicity. Data are given as mean ± standard deviation.	<b>248</b>
<b>Figure 5.S1</b> PLA synthesis route	<b>251</b>

<b>Figure 5.S2</b> PEG-b-PLA synthesis route (n=22, 45, 114 or 228)	<b>252</b>
<b>Figure 5.S3</b> PLA-Cy5 synthesis route	<b>253</b>
<b>Figure 5.S4</b> Colloidal stability of NP suspension represented by the evolution of the Zeta Potential of NPs as a function of storage time at 4°C.	<b>254</b>
<b>Figure 5.S5</b> DSC curves of cholecalciferol (VD3) and VD3-loaded polymeric NPs.	<b>254</b>
<b>Figure 5.S6</b> Percentage of the remaining dose of cholecalciferol after 24 hours of incubation protected from light at 32°C (n=3).	<b>255</b>
<b>Figure 5.S7</b> Critical concentration of NaCl solution needed for the aggregation of NPs suspension, as determined by DLS. Inset: Aggregation kinetics of PLA NPs in presence of increasing NaCl concentrations as measured by DLS	<b>256</b>
<b>Figure 5.S8</b> NPs size before and after contact with Oleth-20 surfactant, as determined by DLS.	<b>256</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> Les différents types de systèmes nanoparticulaires utilisés dans le domaine biomédical.	<b>29</b>
<b>Tableau 1.2</b> Nanoformulations commercialisées ou en développement clinique (de phase II ou supérieure) pour les traitements cutanés	<b>38</b>
<b>Tableau 1.3</b> Exemples de systèmes nanoparticulaires à base de polymères biodégradables synthétiques pour la voie cutanée	<b>41</b>
<b>Tableau 1.4</b> Variabilités des techniques d'évaluation de l'absorption/pénétration cutanée	<b>48</b>
<b>Tableau 1.5</b> Effet de la charge de NPs sur la pénétration d'un actif encapsulé ou la pénétration des NPs	<b>59</b>
<b>Tableau 1.6</b> Effet de la condition de la peau sur la pénétration de NPs et/ou d'actifs encapsulés dans les NPs	<b>71</b>
<b>Tableau 2.1</b> Propriétés de la librairie de polymères linéaires synthétisée	<b>114</b>
<b>Tableau 2.2</b> Propriétés de la librairie de polymères branchés synthétisée en masse	<b>120</b>
<b>Tableau 2.3</b> Insertion de PEG dans les polymères PLA-p-PEG2K en fonction des conditions de synthèse en solution	<b>123</b>
<b>Tableau 2.4</b> Propriétés de la librairie de polymères branchés synthétisée en solution	<b>125</b>
<b>Tableau 2.5</b> Propriétés du polymère fluorescent synthétisé	<b>128</b>
<b>Tableau 2.6</b> Récapitulatif des caractéristiques des polymères utilisés dans les études suivantes	<b>130</b>
<b>Tableau 3.1</b> Propriétés des polymères linéaires PLA-b-PEG utilisés dans cette étude	<b>137</b>
<b>Tableau 3.2</b> Propriétés des polymères branchés PLA-p-PEG utilisés dans cette étude	<b>137</b>
<b>Tableau 3.3</b> Caractéristiques de la couche de PEG à la surface des NPs	<b>153</b>
<b>Tableau 3.4</b> Propriétés du polymère PLA-b-PEG2K utilisés dans cette étude	<b>159</b>
<b>Tableau 3.5</b> Avantages et inconvénients des différents procédés de fabrication basée sur la nanopréciipitation	<b>167</b>
<b>Table 4.1</b> Polymer properties characterized by <sup>1</sup> H NMR and GPC.	<b>189</b>
<b>Table 4.2</b> Physicochemical characteristics of 100 nm-diameter NPs under study. Data are reported as mean over three or more separate formulations ± SD.	<b>193</b>
<b>Table 5.1</b> Polymer characteristics	<b>233</b>
<b>Table 5.2</b> Physico-chemical characteristics of NPs. Data are reported as mean over three separate formulations ± SD	<b>234</b>
<b>Table 5.3</b> Effects of formulation type on cholecalciferol distribution in skin layers in intact and impaired pig skin after 24 h exposure. Applied dose was 35 μg/cm <sup>2</sup> . Data are given as mean ± SEM.	<b>241</b>
<b>Tableau 6.1</b> Récapitulatif du comportement des nanoformulations et influence sur la pénétration cutanée	<b>279</b>
<b>Tableau 6.2</b> Valeurs des bandes d'étirement des groupements CH <sub>2</sub> des lipides de la surface de la peau après différents traitements	<b>283</b>
<b>Tableau 6.3</b> Comparaison de différentes formulations testées dans la littérature pour véhiculer le cholécalciférol à travers la peau	<b>291</b>
<b>Tableau 6.4</b> Récapitulatif des avantages/inconvénients des NPs selon la composition polymérique et le type d'application cutanée	<b>294</b>

# Liste des abréviations

<b>AL/LA</b>	Acide lactique ( <i>lactic acid</i> en anglais)
<b>ATRP</b>	Polymérisation radicalaire par transfert d'atomes ( <i>Atom Transfer Radical Polymerization</i> en anglais)
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Méthanol deutéré
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme deutéré
<b>CIJM</b>	Confined Impigment Jet Mixer
<b>CMS</b>	Nanotransporteur multicouches ( <i>Core Multishell Nanocarrier</i> en anglais)
<b>CPG/GPC</b>	Chromatographie à perméation de gel ( <i>Gel Permeation Chromatography</i> en anglais)
<b>CSSC</b>	Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs
<b>Cy5</b>	Cyanine 5
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Eau deutérée
<b>DCC</b>	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide
<b>DCM</b>	Dichlorométhane
<b>DMAP</b>	4'-Diméthylaminopyridine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DP</b>	Degré de polymérisation
<b>DPPC</b>	Dipalmitoylphosphatidylcholine
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine tétraacétique
<b>EG</b>	Ethylène glycol
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>HPLC</b>	Chromatographie liquide haute performance ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> en anglais)
<b>IP/PI</b>	Indice de polydispersité (polymères)
<b>IPM</b>	Myristate d'Isopropyle ( <i>Isopropyl myristate</i> en anglais)
<b>LogP</b>	Log coefficient de partage <sub>octanol/eau</sub>
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>M<sub>n</sub></b>	Masse molaire en nombre
<b>MPC</b>	methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
<b>M<sub>w</sub></b>	Masse molaire en poids
<b>NLC</b>	Vecteurs lipidiques nanostructurés ( <i>Nanostructured Lipid Carriers</i> en anglais)
<b>NP</b>	Nanoparticule
<b>OCDE</b>	Organisation de Coopération et de Développement Économique
<b>PAMAM</b>	Polyamidoamine
<b>PC</b>	Phosphatidylcholine
<b>PDI</b>	Indice de polydispersité ou polydispersity index en anglais (nanoparticules)
<b>PEG</b>	Poly(éthylène glycol)
<b>PIE/TEWL</b>	Perte insensible en eau ( <i>transepidermal water loss</i> en anglais)
<b>PLA</b>	Acide poly(lactique) ( <i>poly(lactic acid)</i> en anglais)
<b>PMPC</b>	Poly(2-méthacryloyloxyethyl phosphorylcholine)

<b>PS</b>	Polystyrène
<b>QD</b>	<i>Quantum dot</i>
<b>RMN/NMR</b>	Résonance magnétique nucléaire ( <i>Nuclear Magnetic Resonance en anglais</i> )
<b>SB</b>	<i>Stratum Basale</i>
<b>SC</b>	<i>Stratum Corneum</i>
<b>SD</b>	Ecart-type ( <i>Standard Deviation en anglais</i> )
<b>SEM</b>	Erreur type de la moyenne ( <i>Standard Error of the Mean en anglais</i> )
<b>SG</b>	<i>Stratum Granulosum</i>
<b>SI</b>	Standard interne
<b>SLN</b>	Nanoparticules lipidiques solides ( <i>Solid Lipid Nanoparticles en anglais</i> )
<b>Sn(Oct)<sub>2</sub></b>	Octanoate d'étain
<b>SS</b>	<i>Stratum Spinosum</i>
<b>THF</b>	Tetrahydrofurane
<b>VD3</b>	Vitamine D3 (cholécalférol)
<b>ZP</b>	Potentiel Zêta ( <i>Zeta potential en anglais</i> )

*À Toi notre Espoir,  
Et à Toi qui veille sur nous,*

# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les directeurs et co-directeurs de cette thèse. Je remercie les Pr Patrice Hildgen et Xavier Banquy de m'avoir proposé de continuer mon cheminement à la recherche par un doctorat au sein de leurs laboratoires à l'Université de Montréal. Patrice, merci pour votre confiance, votre écoute, votre gentillesse et la liberté accordée tout au long de ce doctorat. Xavier, un grand merci pour vos idées à foison vivement appréciées pour dynamiser ce travail, vos remarques judicieuses et tout le temps passé sur ce projet. Je vous remercie également de m'avoir donné l'occasion de travailler sur d'autres projets durant ces années de thèse, me permettant de ne pas me cloisonner à mon sujet et d'élargir mes connaissances. Mes remerciements sont également adressés à ma directrice et à ma codirectrice de l'Université de Lyon, les Pr Stéphanie Briançon et Marie-Alexandrine Bolzinger. Merci de m'avoir fait l'honneur d'accepter ce projet de thèse en cotutelle et de m'avoir accueillie pendant deux années au sein de votre laboratoire. Vos expertises et conseils en pénétration cutanée étaient indispensables à la concrétisation de ce projet. Je tiens également à vous adresser tous mes remerciements pour avoir grandement contribué à ma formation de Master.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury pour l'honneur que vous me faites en prenant le temps de relire ce manuscrit de thèse. Vos remarques et commentaires sont appréciés.

Je remercie également les différents acteurs qui m'ont permis de travailler sur cette thèse dans de bonnes conditions. Merci à Patrice pour les financements, à la faculté de Pharmacie de l'UdeM pour les bourses complémentaires, et à la Région Auvergne Rhône-Alpes pour les différentes bourses de mobilité. Je remercie par ailleurs les gouvernements du Québec et du Canada, ainsi que l'Université de Montréal de nous donner la chance d'étudier à l'étranger.

Bien entendu, je tiens également à remercier profondément tous les membres du 4<sup>e</sup> étage et amis du 4<sup>e</sup> étage de la Faculté de Pharmacie de l'UdeM. Un profond merci est tout d'abord adressé aux membres de mon comité consultatif, les Pr Jeanne Leblond Chain et Gaëlle Roullin. Outre les aspects scientifiques, votre oreille attentive, votre disponibilité et votre soutien ont été plus qu'essentiels dans les moments où j'en avais besoin. Une dédicace particulière à Jeanne, sans

toi finalement cette thèse n'aurait jamais eu lieu. Merci de m'avoir donné la chance de faire un stage dans ton laboratoire à Montréal. Je te souhaite le meilleur pour ton nouveau projet de vie, personnel et professionnel. Je remercie également les autres Professeurs de l'Axe Formulation et Analyse du Médicament, et notamment les Pr Grégoire Leclair et Gaëlle Roullin pour m'avoir donné l'opportunité d'être monitrice de laboratoire, me permettant ainsi de compléter ma formation.

À tous les étudiants, présents ou ayant été présents au 4<sup>e</sup> étage, merci d'avoir fait partie, d'une manière ou d'une autre, de cette thèse et d'avoir rendu ces séjours à Montréal si agréables et inoubliables. L'entraide qui règne au sein de l'axe est très appréciée. Un merci particulier à Cloé et Mouna pour tous les petits potins partagés et les sorties extra-labo. Soudeh, un grand merci pour toutes nos discussions, les longues journées et fins de semaine au labo, ton aide à tout instant (et aussi pour aller voir le garde à ma place !). Tiens bon ! Jean-Michel, tu as été pour moi le 5<sup>e</sup> directeur de cette thèse. Un énorme Merci, vraiment, pour toute ton aide, le temps que tu as accordé à répondre à mes innombrables questions, et tous tes conseils. Mes supers stagiaires, Cyrielle et Victor, mille mercis. Travailler avec vous a été un réel plaisir et vos entrains respectifs ont été plus qu'appréciés. Bon courage pour vos carrières. Une pensée particulière à Mirza, qui m'a encadré à Montréal durant mon stage de fin de Master. Merci d'être devenu mon ami et n'oublie pas de venir nous voir avec les millions que tu vas gagner (Avec EmZee ou avec ta job!). J'adresse également tous mes sincères remerciements à mes collègues du Banquy Lab, Teresita, Araceli, Audrey, Buddha, Vahid, Nico, PLL, Jimmy et les stagiaires. Tere, merci d'avoir donné de la présence féminine au bureau et au labo et surtout merci pour ton amitié. Nico, bon courage dans tes aventures, cela me fait plaisir de te sentir maintenant épanoui. À mon ami du fond du Québec, PLL, que de chemin parcouru et de difficultés pour t'« apprivoiser » ou plutôt pour nous apprivoiser. Merci de ta disponibilité pour m'aider au labo à discuter sur mon projet, les longues soirées AoE2 ou RoN où je vous maudissais pendant que je continuais à faire des manips, tes vidéos improbables, les soirées pizza ou St Hub, le gym et ton endurance en cardio (c'était une blague...), les vacances et l'honneur de ta présence en France. Juste Merci pour cette amitié qui s'est créée. Et finalement, tes blagues me manquent... Un grand merci également aux supers membres de la plateforme, Isabelle, Mihaela, Martin. Je n'oublierai jamais votre profonde gentillesse.

Je n'oublie pas tous mes collègues de Lyon, du LAGEP, et surtout de Rock! Je remercie tout d'abord les différents Professeurs et Maitres de Conférence du LAGEP. Un merci particulier à Eyad, pour ton aide technique et tes idées pour mon projet de thèse. Zoé et Alicia, merci de m'avoir gentiment accueillie au bureau pendant ma première année à Lyon. Marion, merci pour toutes nos discussions. Margaux, Greta et Flavia, merci pour votre présence et votre amitié pour ce deuxième séjour, bon courage pour la fin de vos thèses. Un merci particulier à Joëlle, notamment pour la patience que tu m'as accordée à m'aider à retrouver mes fichiers RMN! Des grands mercis également à Géraldine pour tes formations sur les appareils, à Cynthia et Delphine pour votre aide au labo. Joce, ton amitié et ta disponibilité m'ont beaucoup apportée. Docteur Sabrina, je ne t'oublie pas. Tu as été là dans tous les moments, merci du fond du cœur pour toute l'aide, le courage et l'amitié que tu m'as apportés. Plein de bonnes choses pour toi, et j'espère que tu nous feras visiter ta belle Bretagne.

Mes plus tendres pensées sont adressées à ma famille et à ma belle-famille, pour qui les séparations ont été si difficiles pendant ces années au Québec. Maman et Papa, les mots ne seront jamais assez forts pour vous remercier de tout l'Amour que vous me donnez. Merci d'être et d'avoir toujours été présents à mes côtés et de me soutenir, quels que soient mes choix. Je suis extrêmement fière de tout ce que vous avez accompli, de tous vos sacrifices et de votre volonté pour nous avoir permis, Justine, Jeanne et moi d'être ce que nous sommes aujourd'hui. Vous êtes mes modèles. Mes (petites) grandes sœurs, je vous aime, merci pour toutes les joies de nos moments partagés et surtout d'avoir supporté mon ~~mauvais~~ caractère tout au long de ces années. À mes neveux et nièces (et j'espère aux futurs !!), votre Tata Gus sera toujours fière de vous, quoi que vous accomplissiez selon vos envies, grandes études ou non.

Pour terminer, je remercie du plus profond de mon cœur, mon camarade de classe de lycée et de Master, collègue de laboratoire, voisin de bureau, coauteur, colocataire, partenaire d'aventures et de mésaventures, meilleur ami et désormais mari, Jimmy. Merci de faire partie de ma vie et d'avoir été et d'être toujours là pour moi, dans les bons et plus difficiles moments de cette thèse et surtout de notre vie. Une nouvelle page s'écrit maintenant pour nous !

# **Avant-propos**

**“The next big thing is really small”,** Jack Uldrich <sup>1</sup>.

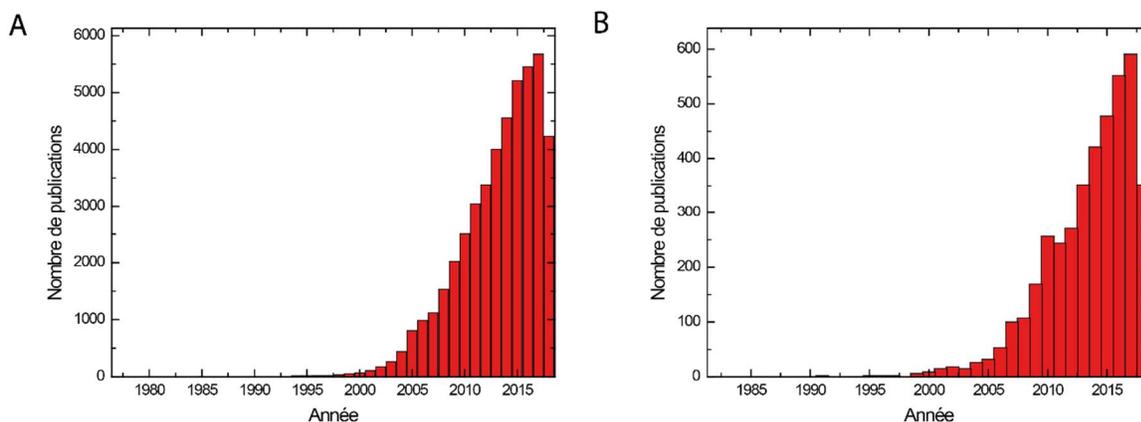
Cette citation traduit incontestablement l’engouement récent pour l’utilisation de nanotechnologies dans de très nombreux secteurs d’applications (électronique, construction, transport, biomédical, etc.). Cet engouement ne cesse de se développer depuis ces dernières dizaines d’années, comme illustré par le nombre de publications traitant des « nanoparticules » (NPs) en croissance exponentielle (**Figure A1.A**). Le marché global des nanotechnologies devrait notamment atteindre 125 milliards d’US\$ d’ici 2024<sup>i</sup>.

Les nanotechnologies sont particulièrement passionnantes dans le domaine pharmaceutique où elles sont utilisées pour modifier la biodisponibilité des médicaments dans l’organisme afin d’augmenter l’efficacité des traitements tout en diminuant leurs effets secondaires. En effet, de nombreuses molécules d’intérêt sont caractérisées par des propriétés physico-chimiques non favorables à leur formulation et/ou au passage des barrières séparant le site d’administration du site d’action de la molécule d’intérêt, diminuant ainsi leur efficacité pharmacologique finale.

Un exemple de barrière pouvant considérablement limiter la pénétration de substances exogènes est la barrière cutanée formée par la couche supérieure de la peau, *le stratum corneum*. Ainsi, la délivrance topique ou transdermique de certaines molécules actives est un véritable défi de formulation que l’utilisation de NPs pourrait relever. Le nombre de publications traitant de l’évaluation de NPs pour la voie cutanée a notamment spectaculairement augmenté depuis les années 2000 (**Figure A1.B**), traduisant l’intérêt de la recherche dermopharmaceutique pour le domaine prometteur des nanotechnologies.

---

<sup>i</sup> Global Nanotechnology Market (by Component and Applications), Funding & Investment, Patent Analysis and 27 Companies Profile & Recent Developments - Forecast to 2024



**Figure A.1** Nombre de publications dans le moteur de recherche PubMed au 08/08/2018 avec les recherches suivantes de mots-clés dans le titre ou le résumé : A) "nanoparticle" et B) "nanoparticle" et ("skin" ou "cutaneous" ou "topical" ou "transdermal").

En effet, grâce à une solubilisation de molécules actives en leur cœur (encapsulation), combinée à l'accumulation des NPs à la surface de la peau ou dans les annexes cutanées, à leurs effets de surface sur la peau, à leur pénétration ou encore au partage favorisé de la molécule active encapsulée vers la peau, les NPs ont prouvé leur efficacité pour moduler et/ou améliorer la délivrance de molécules actives dans la peau.

Néanmoins, et comme souligné dans les dernières revues de littérature du Pr. Annika Vogt<sup>2-3</sup>, l'utilisation des NPs pour la dermatopharmacie est encore au stade de l'exploration. Afin de concevoir les nanoformulations les plus performantes pour des applications en clinique, il est nécessaire de comprendre le rôle de chaque propriété physico-chimique des NPs sur leurs interactions avec le tissu cutané<sup>2-3</sup> et notamment sur le tissu pathologique. En effet, les interactions entre les NPs et une peau pathologique peuvent être totalement différentes des interactions avec une peau saine. Pourtant, et bien que la finalité des NPs pour la voie cutanée soit souvent le traitement de maladies dermatologiques, très peu d'études évaluant les interactions avec la peau pathologique sont disponibles.

Ce manuscrit de thèse vise à définir l'influence d'une caractéristique importante des NPs polymériques biodégradables, *i.e.* **leur composition hydrophile**, sur les interactions entre les NPs et la peau, et notamment lorsque la barrière cutanée est lésée. Après une introduction bibliographique (Chapitre I) présentant i) les concepts de l'administration de médicaments dans la peau, ii) le rôle de systèmes nanoparticulaires pour la voie cutanée et iii) les facteurs

influençant l'absorption cutanée à partir des NPs, ainsi que la problématique de notre projet, quatre chapitres expérimentaux permettent de comprendre l'influence de la composition hydrophile des NPs polymériques sur différents aspects de formulation et de pénétration cutanée. Le chapitre II expose la synthèse d'une librairie de polymères amphiphiles de compositions hydrophiles variables. Le chapitre III définit l'influence de la composition hydrophile des polymères et des méthodes de fabrication sur certaines propriétés physicochimiques des NPs. Le chapitre IV, présenté sous forme d'un article scientifique, décrit le rôle du type de composition hydrophile de surface sur différents aspects liés à la délivrance d'une substance active lipophile modèle dans la peau intacte ou lésée. Le chapitre V, également présenté sous forme d'un article scientifique, met en évidence certains mécanismes d'interactions entre la peau et les NPs polymériques en fonction de la quantité de bloc hydrophile dans les NPs. Enfin, la portée de ces résultats est développée dans un chapitre VI de discussion générale.

**-Chapitre I-**  
**Introduction générale**

## **1.1 Administration de médicaments par la voie cutanée**

L'administration de médicaments pour des traitements thérapeutiques peut se faire selon de nombreuses voies dont la voie parentérale, la voie orale ou la voie topique. Le choix de la voie d'administration et de la formulation à utiliser pour véhiculer les molécules actives dépend de la pathologie à traiter et du meilleur compromis entre l'efficacité thérapeutique, la tolérance, l'observance et le coût du traitement.

Pour le traitement des pathologies dermatologiques, la voie cutanée est la voie de choix, car le médicament est appliqué localement sur le site de l'affection, maximisant son efficacité pharmacologique. De plus, la diffusion locale de la substance active permet de réduire l'apparition d'effets indésirables dus à une action sur d'autres cibles. Par ailleurs, la voie cutanée peut également être utilisée pour une délivrance systémique. L'intérêt, par rapport à la voie orale, est que la voie cutanée évite le premier passage hépatique de métabolisation de la molécule active. La biodisponibilité se trouve améliorée et les doses peuvent être diminuées. De plus, contrairement à la voie injectable traumatique, la voie cutanée permet une administration simplifiée et sans douleur, sans recours à une tierce personne formée pour l'administration. Une libération prolongée sur plusieurs jours peut également être obtenue (par exemple à l'aide d'un timbre). Une telle voie est donc avantageuse pour l'administration de médicaments, et est notamment prometteuse pour des traitements chez les jeunes enfants.

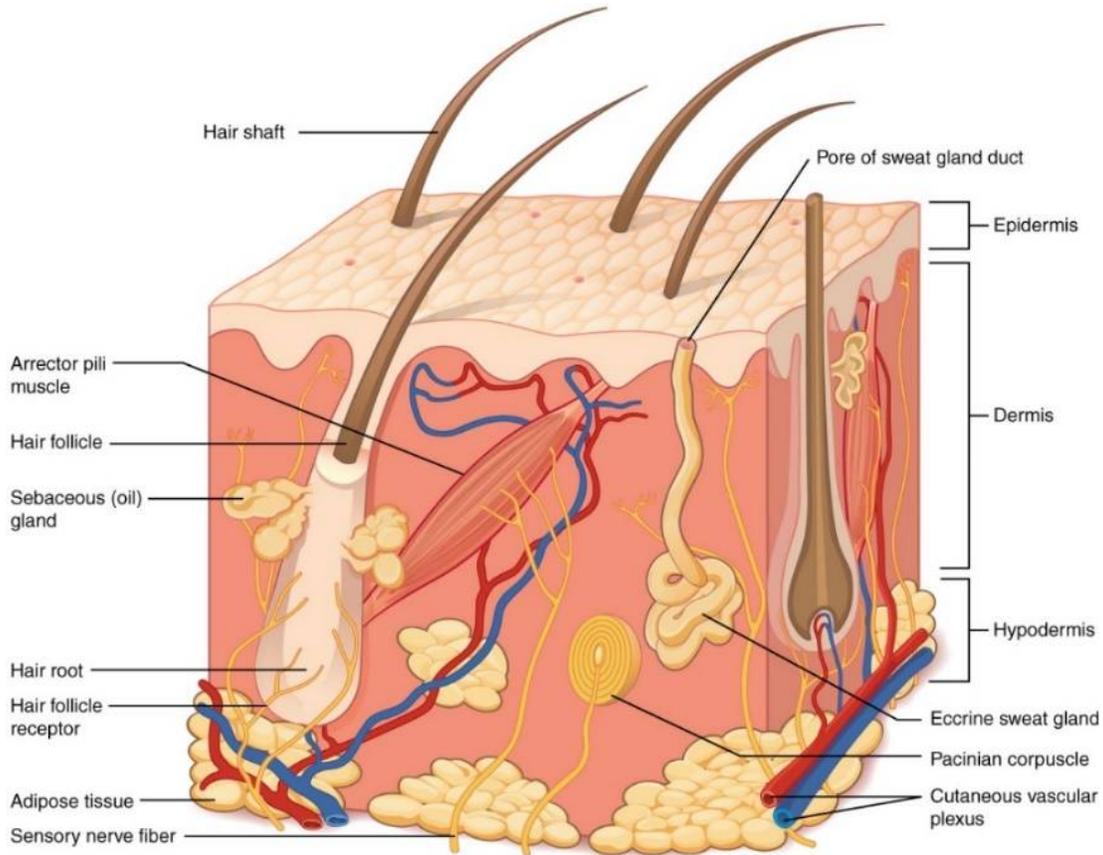
Afin de comprendre les mécanismes de la diffusion des molécules actives dans la peau et les défis associés à l'administration de médicaments par cette voie, les caractéristiques du tissu cutané seront tout d'abord détaillées.

### **1.1.1 La peau : structure et fonctions**

#### **1.1.1.1 Structure**

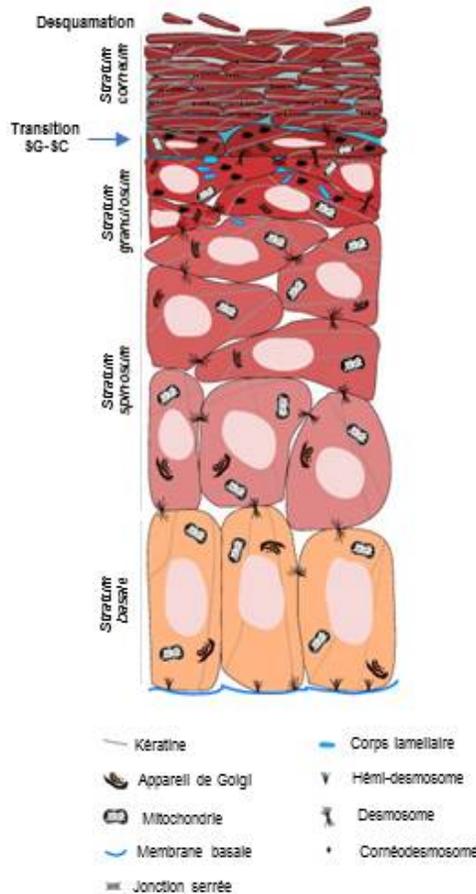
Avec une surface de 1,8 m<sup>2</sup> et un poids moyen de 4 kg pour un adulte de taille moyenne, la peau est le plus grand organe du corps humain <sup>4</sup>.

La peau est composée de différentes couches de tissus superposées: l'épiderme (couche superficielle), le derme et l'hypoderme. Différentes annexes prennent racine dans le derme ou l'hypoderme : l'appareil pilo-sébacé, l'appareil sudoripare et l'appareil unguéal (**Figure 1.1**).



**Figure 1.1** Schéma représentant la structure de la peau et ses différents constituants <sup>5</sup>

L'épiderme est la couche superficielle de la peau. Cet épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé très fin (~100 µm) se compose spécifiquement de quatre couches distinctes, qui diffèrent selon le stade de différenciation des kératinocytes, type cellulaire majeur de l'épiderme. De la plus superficielle à la plus profonde, ces couches sont le *stratum corneum* (SC), le *stratum granulosum* (SG), le *stratum spinosum* (SS) et le *stratum basale* (SB) <sup>6</sup> (**Figure 1.2**). L'épiderme n'est pas vascularisé.



**Figure 1.2** Différenciation des kératinocytes dans la couche épidermale de la peau. Figure adaptée de <sup>7</sup>

#### 1.1.1.1.1 La barrière cutanée : le stratum corneum

Le SC (couche cornée) forme la partie non viable de l'épiderme. Son taux d'hydratation est très faible (20%), contrairement aux autres couches de la peau. Il s'agit d'un système à deux compartiments composé de cellules mortes anucléées, les cornéocytes, baignant dans une matrice extracellulaire de lipides. Cette structure est classiquement représentée de manière très simplifiée comme étant en briques et mortier : les cornéocytes formant les briques et la matrice lipidique formant le mortier <sup>8</sup> (**Figure 1.3**).

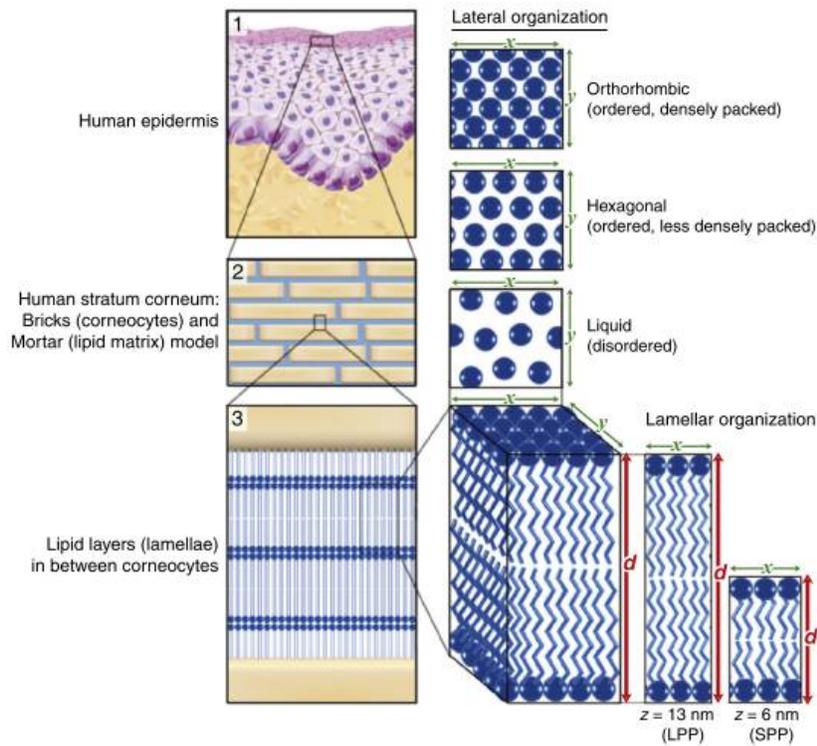
Le SC est formé par 10 à 25 couches de cornéocytes, pour une épaisseur totale de 10-20  $\mu\text{m}$  <sup>6</sup>. Les cornéocytes sont des kératinocytes au stade final de différenciation. Ces cellules hexagonales aplaties sont remplies de kératine et sont entourées d'une enveloppe cornéifiée par un réseau réticulé de protéines (fillagrine, lorcrine, involucrine) <sup>6</sup>. Des lipides sont également

présents dans les cellules et dans les membranes cellulaires. La cohésion des cornéocytes est assurée par des jonctions appelées cornéodesmosomes.

Les espaces intercornéocytaires dans le *SC* des mammifères sont caractérisés par des dimensions inférieures à 100 nm. Dans les sillons formés entre des amas de cornéocytes, les ouvertures peuvent atteindre le micromètre, tout comme dans les couches superficielles desquamantes et les régions les plus profondes <sup>9</sup>. La matrice lipidique remplissant les interstices entre les cornéocytes est composée d'un mélange de lipides en ratio quasi équimolaire : des céramides, des acides gras libres et du cholestérol. Du sulfate de cholestérol est également présent. Différentes classes d'acides gras libres et de céramides sont présentes et diffèrent selon la longueur de leurs chaînes carbonées<sup>6</sup>. Bien qu'il n'y ait pas de phospholipides, ces lipides s'ordonnent sous forme de phases lamellaires <sup>8</sup>.

La matrice lipidique n'est toutefois pas une phase homogène contrairement à ce que peut laisser penser le schéma classique simplifié de « briques et mortier ». En effet, deux types de phases lamellaires sont présents dans le *SC* humain : une phase lamellaire de périodicité de 13 nm contenant une région centrale fluide et deux régions adjacentes moins fluides (« broad-narrow-broad sequence ») et une phase lamellaire avec une périodicité de 6 nm <sup>6</sup> (**Figure 1.3**). À l'intérieur de ces phases, les lipides s'organisent latéralement principalement dans une structure orthorhombique dense et organisée, mais peuvent également s'arranger dans une structure hexagonale moins dense, voire dans une structure liquide désorganisée (**Figure 1.3**). La composition lipidique de la matrice extracellulaire et sa conformation assurent les propriétés d'imperméabilité (fonction barrière) de la peau <sup>6</sup>; la structure orthorhombique permettant la plus forte résistance à l'absorption cutanée et la structure liquide permettant la meilleure perméabilité.

Le *SC* est produit en continu, ce qui nécessite également son élimination par desquamation pour garder constamment la même épaisseur <sup>10</sup>. Le *SC* se renouvelle complètement en 2 à 4 semaines, notamment par l'action d'enzymes protéolytiques qui dégradent graduellement les cornéodesmosomes <sup>8</sup>.



**Figure 1.3** Organisation lipidique dans le *stratum corneum* humain. 1) Le *stratum corneum* est la couche supérieure de l'épiderme et 2) est constitué de cornéocytes dispersés dans une matrice lipidique (modèle brique et mortier). 3) Les lipides intercellulaires sont arrangés sous forme de phases lamellaires, qui ont une courte ou longue périodicité ( $d$ ). Les bicouches peuvent s'arranger selon trois organisations latérales : orthorhombique, hexagonal ou liquide désordonnée.<sup>6</sup>

#### 1.1.1.1.2 L'épiderme viable

Situé directement sous le SC, l'épiderme viable est composé d'une succession de couches de kératinocytes vivants qui diffèrent selon leur stade de différenciation. Des mélanocytes, des cellules de Langherans et des cellules de Merkel (rôle de récepteur sensoriel) sont également présents. Contrairement au SC très peu riche en eau, l'épiderme viable est composé à 70 % d'eau, nécessaire au fonctionnement des cellules.

À la base de l'épiderme viable se trouve la jonction dermoépidermique (ou membrane basale) qui est une région acellulaire délimitant l'épiderme du derme.

À partir de cette membrane basale se situe la couche cellulaire basale (*stratum basale*, couche germinative), constituée de cellules souches épidermales qui se divisent pour former les kératinocytes qui migreront vers les couches supérieures durant le processus de différenciation

terminale. Les cellules de la couche basale adhèrent à la membrane basale par le biais d'hémidesmosomes.

Présente au-dessus de la couche basale, la couche épineuse (*stratum spinosum*, *SS*) contient des kératinocytes qui ne peuvent plus proliférer. Ces kératinocytes sont liés entre eux par des desmosomes. Les cellules commencent à s'aplatir dans les couches supérieures du *SS*.

Située au-dessus du *SS* et juste en dessous du *SC*, la couche granuleuse (*SG*) contient des kératinocytes présentant, dans leur cytoplasme, des granules de kératohyaline, nécessaires à l'agrégation des filaments de kératine. En plus des organelles typiques des cellules, les kératinocytes de cette couche présentent des corps lamellaires (corps d'Odland) enrichis en lipides (phospholipides, cholestérol, glucosylcéramides). À l'interface *SG/SC*, les corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique des cellules granuleuses, pour libérer leur contenu lipidique dans les espaces intercellulaires, formant ainsi la matrice lipidique du *SC*. Une enzyme spécialisée, présente dans les corps lamellaires, convertit les lipides des corps lamellaires en lipides du *SC*.<sup>7, 11-12</sup>

#### 1.1.1.1.3 Le derme

Le derme est la couche de la peau la plus épaisse (1-3 mm) et est situé sous l'épiderme. Il représente 7% du poids total du corps et est composé de deux parties appelées derme papillaire (1/5<sup>e</sup> du derme) situé sous la jonction dermoépidermique, et derme réticulaire ou chorion (4/5<sup>e</sup> du derme).

Il s'agit d'un tissu conjonctif formé principalement de fibroblastes dispersés dans une matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire, synthétisée par les fibroblastes, est formée d'un réseau interconnecté de fibres de collagènes et de fibres élastiques (composées de fibrilline et élastine) déposées dans une substance interstitielle, dite fondamentale. La substance fondamentale est un gel visqueux composé d'eau et de différentes macromolécules : collagène non fibreux, protéoglycannes (glycosaminoglycannes (GAG) associés à des protéines) et glycoprotéines de structure. Les principaux GAG sont l'acide hyaluronique, le sulfate de chondroïtine, le sulfate de dermatane, et le sulfate de kératane qui assurent la rétention d'eau dans le derme. Le derme est le support des annexes cutanées (follicules pileux, glandes sébacées,

glandes sudoripares) et contrairement à l'épiderme, il contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des nerfs et des récepteurs nerveux (**Figure 1.1**).

Par cette structure, le derme joue les rôles de tissu de soutien assurant la protection mécanique de la peau, de tissu sensoriel, de réservoir d'eau, de nutrition de l'épiderme par diffusion, et possède également un rôle dans les réponses inflammatoires et immunitaires.<sup>13</sup>

#### *1.1.1.1.4 L'hypoderme*

L'hypoderme, également appelé tissu sous-cutané, forme la jonction entre le derme et les membranes entourant les organes. Il s'agit d'un tissu conjonctif graisseux formé majoritairement d'un réseau de lobules d'adipocytes. D'autres cellules le composent également telles que des cellules immunitaires, inflammatoires, et des fibroblastes<sup>14</sup>. L'hypoderme est un tissu de stockage énergétique assurant également un rôle de soutien et d'isolation thermique. La part massique de ce tissu dans la totalité du poids corporel varie selon l'âge, le mode de vie, les prédispositions génétiques et le sexe.

#### *1.1.1.1.5 Les annexes cutanées*

### **Les follicules pilo-sébacés**

Les follicules pilo-sébacés sont des invaginations de l'épithélium épidermique s'enfonçant verticalement jusque dans le derme, dans lesquelles le poil/cheveu se développe (entre 15 et 120 µm de diamètre) (**Figure 1.1**). Les follicules sont présents sur toute la surface du corps avec des densités variables (entre 20 et 300 follicules/cm<sup>2</sup><sup>15</sup>), excepté sur la paume des mains et la plante des pieds, et représentent 0,1 % de la surface cutanée. Une couche cornée intacte recouvre la partie haute du follicule, comme pour les régions cutanées interfolliculaires. Cependant, la partie plus profonde de l'*infundibulum* possède une couche cornée incomplète, et donc, plus perméable. Chaque follicule est associé à une ou plusieurs glandes sébacées et peut également être associé à des glandes sudoripares apocrines. Ils sont également associés à un réseau dense de capillaires sanguins qui les nourrissent. À proximité de la région folliculaire est localisée une variété de types cellulaires, notamment des cellules souches, des cellules immunitaires et des mélanocytes<sup>16-17</sup>.

### **Les glandes sébacées**

Les glandes sébacées, localisées dans le derme et constituées de cellules sébacées (sébocytes), sont des glandes acineuses en grappes (**Figure 1.1**), qui ont pour principale fonction de sécréter le sébum (voir partie *1.1.1.1.6 Microenvironnement de la surface cutanée*) dans le canal du follicule pileux. Elles sont présentes sur toute la surface de la peau, sauf sur la plante des pieds et la paume des mains, avec une densité et une taille plus importante sur le cuir chevelu, le front, les joues et le menton. La taille des glandes sébacées augmente également avec l'âge de l'individu <sup>18</sup>.

### **Les glandes sudoripares**

Les glandes sudoripares, de structures tubulaires enroulées (**Figure 1.1**) sont responsables de la sécrétion de la sueur (voir *1.1.1.1.6 Microenvironnement de la surface cutanée*), mais aussi de certaines hormones. Comme les glandes sébacées, ce sont des glandes exocrines puisque la sécrétion est libérée via un conduit à la surface extérieure de la peau. Elles sont classifiées selon le mode de sécrétion : eccrine, apocrine ou apoecrine. Les glandes eccrines sont actives depuis la naissance sur toute la surface cutanée du corps humain (1.6 à 4 millions de glandes avec une densité moyenne de 200 glandes/cm<sup>2</sup>). Les grandes apocrines, elles, ne s'activent qu'à la puberté et sont associées aux follicules pileux dans les régions axillaires et urogénitales. La sécrétion se fait dans le canal du poil. Les glandes apoecrines, finalement, sont des types de glandes, mélangeant les fonctions eccrines et apocrines, qui se retrouvent également dans les zones pourvues de follicules pileux <sup>19</sup>

#### *1.1.1.1.6 Microenvironnement de la surface cutanée*

Le sébum, la sueur, l'eau provenant des couches profondes de la peau (perte insensible en eau) et le microbiome cutané contribuent au microenvironnement de la surface de la peau en formant une émulsion eau/huile appelée film hydrolipidique de surface.

### **Le sébum**

Le sébum est formé d'un mélange de lipides relativement non polaires provenant de la lyse de sébocytes matures synthétisés par les glandes sébacées (triglycérides, cires, squalène, esters de cholestérol, et cholestérol libre), et a pour rôle principal de maintenir l'hydratation de la peau.

La synthèse et la libération de lipides depuis les glandes sébacées nécessitent plus d'une semaine<sup>20</sup>. Les proportions et la concentration<sup>20</sup> de chacun des constituants dépendent des espèces, de l'âge et des pathologies cutanées. L'acné, par exemple, est caractérisée par une hyperséborrhée et une modification de la composition lipidique<sup>20</sup>.

### **La sueur**

La sueur, sécrétée par les glandes sudoripares citées précédemment, est une solution saline diluée dérivée du plasma sanguin que l'on retrouve à la surface de la peau, sécrétée notamment pour réguler la température corporelle. Elle contient principalement des espèces salines (chlorure de sodium, chlorure de potassium, bicarbonate de sodium) et d'autres composés organiques tels que les ions lactates, l'urée et l'ammoniac. Des enzymes protéolytiques sont également présentes. La concentration des solutés présents dans la sueur est dépendante du taux de transpiration<sup>21</sup> et de certaines pathologies. Par exemple, la concentration en chlorure de sodium dans la sueur chez les personnes atteintes de mucoviscidose est beaucoup plus importante que chez les personnes saines<sup>22</sup>. La sueur apocrine est également composée de lipides, protéines et stéroïdes<sup>19</sup>.

### **Le microbiome cutané**

En tant qu'interface avec l'environnement extérieur, la peau est également colonisée par un milieu de microorganismes tels que les bactéries, les champignons, les virus et les acariens. Ceux-ci se retrouvent dans le film hydrolipidique à la fois en surface de la peau, mais aussi en profondeur dans les follicules pileux et les glandes. Les caractéristiques du microbiome cutané dépendent de facteurs endogènes liés à l'hôte comme l'âge, le sexe et la zone anatomique. En effet, ces facteurs conditionnent certaines caractéristiques de la peau comme le pH acide, la densité de glandes sébacées, l'humidité et la température, reconnues comme ayant un rôle important dans la formation de la flore microbienne. Des facteurs exogènes liés à l'environnement sont également liés au microbiome cutané, tels que les traitements antibiotiques, les vêtements ou les produits d'hygiène cutanée. Les microorganismes symbiotiques de la flore cutanée jouent un rôle dans la protection de l'organisme contre l'invasion de pathogènes. La prolifération de certains microorganismes commensales semble

néanmoins contribuer à la majorité des maladies de la peau, bien que les mécanismes ne soient pas tous réellement définis <sup>23</sup>.

### **La perte insensible en eau**

La perte insensible en eau est la quantité d'eau provenant du derme par diffusion passive à travers l'épiderme jusqu'à la surface de la peau où elle s'évapore. Ce flux dépend du taux d'humidité et de l'intégrité de la barrière cutanée <sup>24</sup>.

### **Le manteau acide**

Le pH de la surface de la peau se situe généralement entre 5,4-5,9 et dépend de l'âge, de la couleur de la peau, de la région anatomique, des agents nettoyants et des conditions inflammatoires de la peau <sup>25</sup>. Le manteau acide de la peau est principalement le résultat de sources endogènes telles que les acides gras libres du sébum. D'autres mécanismes endogènes sont également responsables du pH acide de la peau : acidification des domaines extracellulaires à l'interface *SG/SC* par les protéines antiports<sup>ii</sup> sodium-hydrogène, libération d'acide gras par les phospholipases sécrétoires, génération d'acides polycarboxyliques par la déimination d'acides aminées de la filaggrine, persistance et extrusion des granules de mélanine à l'interface *SG/SC*, et hydrolyse du sulfate de cholestérol. L'acidité de la peau assure la défense antimicrobienne de la peau, mais a également un rôle sur la perméabilité de la barrière épidermale (synthèse des céramides, cohésion, intégrité et desquamation du *SC*) et sur l'activation des cytokines pro-inflammatoires <sup>26</sup>.

### **La température cutanée**

La température de la surface de la peau est de 32°C en moyenne, et dépend également de facteurs propres à l'individu et de facteurs environnementaux.

#### 1.1.1.2 Fonctions de la peau.

La peau est l'organe le plus versatile du corps humain. Sa fonction première est la protection de l'organisme vis-à-vis de l'environnement extérieur grâce à des fonctions barrières mécaniques (résistance aux chocs, aux pressions, à la déformation, adhésion), chimiques (empêche la

---

<sup>ii</sup> Co-transporteur permettant de transporter deux ou plusieurs solutés dans des directions opposées

pénétration de substances étrangères, la perte de fluides et permet la résistance aux UV), microbiologiques, et thermiques, et par sa capacité d'« autoréparation ».

Elle assure un rôle d'échange en permettant les échanges thermiques par la sueur et la perte insensible en eau et assure un rôle métabolique (synthèse de vitamine D nécessaire à l'ossification, conversion de la testostérone). La peau est également dotée de ses propres propriétés immunologiques (réactions allergiques) et est le siège de la perception d'une grande quantité d'informations venant du monde extérieur par l'innervation sensitive. Par ailleurs, la condition de la peau joue un rôle social et psychologique très important puisqu'elle est en partie responsable de l'aspect physique extérieur.<sup>4</sup>

## 1.1.2 Mécanismes de diffusion de molécules dans la peau

### 1.1.2.1 Aspects théoriques

Lorsqu'une substance (perméant) est déposée sur la peau à partir d'un véhicule, elle peut, selon ses propriétés physico-chimiques, passer à travers le *SC*. Le passage d'un perméant à travers le *SC* de la peau implique 1) le partage entre le véhicule et le *SC* et 2) la diffusion dans le *SC*.

Le partage d'un perméant entre deux milieux est défini par le coefficient de partage *P*, exprimé par le ratio des concentrations dans chaque milieu. Dans le cas du partage du perméant entre le véhicule et le *SC*, le coefficient de partage peut s'exprimer selon l'**équation 1.1** suivante :

$$P = \frac{C_1}{C_v} \text{ (Équation 1.1)}$$

*Avec  $C_1$  la concentration du perméant à la surface du *SC* (ou d'une membrane) et  $C_v$  la concentration du perméant dans le véhicule. Les concentrations  $C_1$  et  $C_v$  peuvent être exprimées en  $\text{mol.m}^{-3}$ ; le coefficient de perméabilité  $P$  s'exprime sans unités.*

Le plus simple moyen de modéliser la diffusion d'un perméant dans le *SC* (ou les autres couches de la peau), est de le considérer comme une membrane lipidique inerte. La diffusion des perméants à travers une membrane est un processus passif basé sur le gradient de concentration de la région la plus concentrée à la région la moins concentrée.

Le taux de perméation peut être exprimé comme un flux, c'est-à-dire, comme une quantité de perméant par unité de surface et par unité de temps. Selon la première loi de Fick, ce flux est proportionnel au coefficient de diffusion *D* du perméant dans le milieu et du gradient de concentration selon l'axe *x* (**Équation 1.2**)

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \text{ (Équation 1.2)}$$

Le flux  $J$  peut s'exprimer en  $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , avec  $D$  en  $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ,  $\partial C$  en  $\text{mol.m}^{-3}$  et  $\partial x$  en  $\text{m}$ .

Ainsi, à l'état d'équilibre, pour une membrane d'épaisseur  $h$  et des concentrations  $C_1$  et  $C_2$  de part et d'autre de la membrane (à  $x = 0$  et  $x = h$ , selon l'axe  $x$ ), le flux peut s'exprimer selon l'équation 1.3 suivante.

$$J_{eq} = \frac{D}{h} (C_1 - C_2) \text{ (Equation 1.3)}$$

Le flux  $J_{eq}$  peut s'exprimer en  $\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , avec  $D$  en  $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ ,  $C_1$  et  $C_2$  en  $\text{mol.m}^{-3}$  et  $h$  en  $\text{m}$ .

La concentration  $C_1$  à la surface de la membrane ( $x=0$ ) dépend du coefficient de partage  $P$  du perméant entre le véhicule et la membrane (Equation 1.1). De plus, si le perméant est à une concentration maximale à  $x=0$  et que des conditions « *sink* » sont présentes à  $x=h$  ( $C_2$  négligeable devant  $C_1$ ), alors le flux dans le SC peut s'exprimer sous la forme de l'équation 1.4 suivante :

$$J_{eq} = \frac{P \cdot D}{h} C_V$$

$$J_{eq} = K_P C_V \text{ (Équation 1.4)}$$

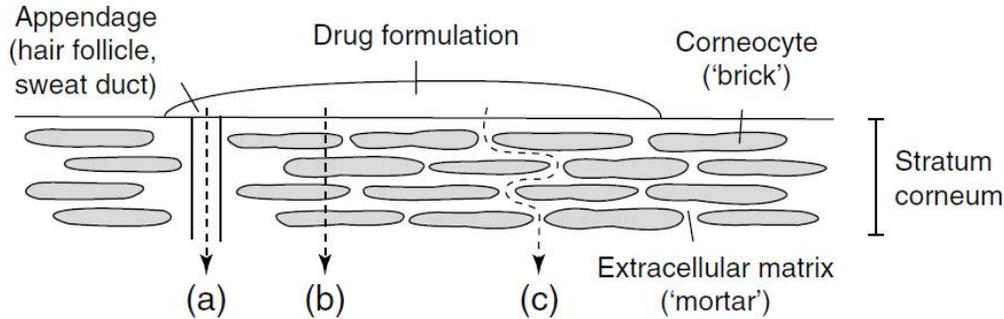
$K_P$  est le coefficient de perméabilité et peut s'exprimer en  $\text{m.s}^{-1}$ .

Après diffusion du perméant dans le SC, un deuxième partage se produit alors entre les lipides du SC et les tissus hydrophiles sous-jacents (épiderme viable et derme). Les molécules peuvent ensuite diffuser dans les couches viables de la peau. Les caractéristiques de la perméabilité sont différentes puisqu'il s'agit d'une seconde membrane avec des propriétés différentes de celles du SC.

#### 1.1.2.2 Voies de passages dans le *stratum corneum*

En condition *sink*, la diffusion à travers le SC est l'étape limitante pour la perméation des molécules dans la peau (diffusion dans les lipides, adsorption à la kératine des cornéocytes)<sup>27</sup>. Dépendamment des propriétés des molécules, de la formulation et de la structure de la barrière

cutanée, plusieurs voies de pénétration dans la peau interviennent : la voie intercellulaire, la voie transcellulaire, et la voie empruntant les annexes cutanées (**Figure 1.4**).



**Figure 1.4** Voie de pénétration des substances actives dans la peau (*stratum corneum*). a) voie des annexes cutanées, b) voie transcellulaire, c) voie intercellulaire. <sup>28</sup>

**La voie intercellulaire** est la voie de diffusion privilégiée pour les substances actives lipophiles. Dans ce cas, les molécules empruntent le chemin tortueux de la matrice lipidique sans traverser les cellules (**Figure 1.4 c**) <sup>28</sup>.

**La voie transcellulaire** est la voie de diffusion pouvant être empruntée par les substances actives hydrophiles qui traversent les cornéocytes, ceux-ci étant remplis de kératine très hydratée. Néanmoins, cela nécessite une alternance de partage à travers les domaines hydrophiles des cellules et la matrice lipidique (**Figure 1.4 b**) <sup>28</sup>.

En formant des défauts dans la continuité de la peau, les **annexes cutanées** (follicules, conduits sudoripares) sont également une voie de diffusion des molécules (**Figure 1.4 a**). Cette voie a été longtemps considérée comme négligeable puisque la proportion de la peau couverte par des follicules est seulement de 0,1 % environ <sup>28</sup>. Néanmoins, elle prend une importance lorsque les molécules sont appliquées sur des zones riches en follicules, comme le front par exemple, où la surface de l'*infundibulum* représente jusqu'à 13,7 % de la surface cutanée. Par ailleurs, les molécules qui pénètrent dans les follicules peuvent atteindre le derme et l'épiderme viable plus facilement en raison de la barrière incomplète du SC dans l'*infundibulum* <sup>15</sup>.

### 1.1.2.3 Propriétés physico-chimiques des substances influençant leur absorption dans la peau

La peau est une barrière sélective à la pénétration passive de molécules. Les propriétés physico-chimiques de ces molécules contrôlent le processus de partage/diffusion.

#### **Coefficient de partage**

Le coefficient de partage (souvent exprimé par le  $\log P_{\text{octanol/eau}}$ ) de la substance caractérise le partage 1) entre son véhicule et le *SC* (**Equation 1.1**) et 2) entre le *SC* et les couches hydrophiles sous-jacentes. Ainsi pour pénétrer dans les couches viables de la peau, la substance doit pouvoir se partager à la fois en faveur des domaines lipophiles du *SC* pour pouvoir quitter son véhicule, et dans les milieux hydrophiles de l'épiderme viable pour quitter le *SC*. Un équilibre entre une solubilité dans les lipides et dans l'eau est donc favorable à une absorption systémique.

#### **Taille/Masse moléculaire**

Selon la loi de Stokes-Einstein, le coefficient de diffusion dépend de la taille de l'objet diffusant. En analysant à la fois les composés provoquant des dermatites allergiques et les molécules utilisés dans les traitements topiques/transdermiques, il a été proposé que l'absorption de molécules à travers la peau humaine saine décroît rapidement lorsque la masse molaire (indicatrice de la taille) est supérieure à 500 daltons<sup>29</sup>.

#### **Degré d'ionisation**

Le flux de perméation dans la peau dépend du degré d'ionisation du perméant puisque l'ionisation influence à la fois la solubilité et le partage. Une espèce ionisée a un plus faible coefficient de perméabilité qu'une espèce non ionisée puisque le coefficient de partage entre les milieux hydrophobes et hydrophiles est plus faible. Néanmoins, la plus faible perméabilité des espèces ionisées peut être compensée par une solubilité accrue dans l'eau (et dans le véhicule<sup>28</sup>)

<sup>30</sup>.

D'autres propriétés caractéristiques des perméants influencent également la perméation des molécules dans la peau, telles que le point de fusion ou le nombre d'atomes disponibles pour former des liaisons hydrogène <sup>31</sup>.

La règle des 5 de C.A Lipinski, développée pour expliquer la diffusion passive de molécules à travers les barrières biologiques, s'applique également pour la diffusion dans la peau et spécifie qu'une pauvre absorption ou perméation est attendue si la masse molaire  $>500$ , le  $\log P >5$ , le nombre de donneurs de liaisons hydrogène  $>5$ , et le nombre d'accepteurs de liaisons hydrogène  $> 10$  <sup>32</sup>.

### 1.1.3 Améliorer la diffusion par la voie cutanée

Une condition essentielle à l'efficacité des formulations pharmaceutiques relatives à la voie cutanée est de maximiser le taux d'absorption des substances actives dans la cible cutanée, *i.e.*, dans des cellules spécifiques de la peau, pour des formulations topiques, ou dans la circulation systémique, pour des formulations transdermiques. Cependant, la structure dense, lipidique et ordonnée de la couche supérieure de la peau, le *SC*, forme une barrière restreignant drastiquement la pénétration des substances exogènes à celles qui possèdent les caractéristiques idéales, telles qu'une masse molaire inférieure à 500 Da, une bonne solubilité dans les milieux aqueux et lipidiques et un  $\log P$  compris entre 1 et 3. Ces propriétés restrictives se reflètent par le nombre très faible de molécules disponibles pour les traitements commerciaux transdermiques (il en existe une quinzaine actuellement<sup>33-34</sup>)

Pourtant, un grand nombre de substances intéressantes à délivrer par la voie cutanée pour des traitements topiques, transdermiques ou vaccinaux ne possèdent pas ces caractéristiques idéales. C'est notamment le cas des petites molécules trop hydrophiles ou trop lipophiles, des peptides, des protéines, des vaccins, ou encore du matériel génétique (ADN, petit ARN interférant). Faire pénétrer ces substances est donc un vrai défi de formulation et un véritable enjeu pharmaceutique. De plus, il est également très souvent nécessaire d'augmenter l'absorption des molécules actives ayant de bonnes caractéristiques de pénétration afin que l'absorption cutanée soit suffisante pour exercer l'action thérapeutique sur la cible.

D'après l'**équation 1.4** (voir partie *1.1.2 Mécanismes de diffusion de molécules dans la peau*), le flux d'une substance à travers une couche de la peau dépend de son coefficient de diffusion

dans cette couche, de sa concentration effective et de son partage entre le véhicule/*SC* ou entre les différentes couches.

Une amélioration du transfert d'une molécule à travers la peau et notamment le *SC* peut ainsi être induite par différentes techniques :

- Formulation des substances permettant d'obtenir une diffusion maximale par sursaturation (diffusion passive)
- Utilisation de promoteurs d'absorption permettant de moduler la diffusion-partage-solubilisation des substances dans la peau (diffusion passive, avec une possible altération de la fonction barrière)
- Application de forces physiques permettant d'améliorer la diffusion dans le *SC* (diffusion active, avec une possible altération de la fonction barrière)
- Utilisation de nanovecteurs

#### 1.1.3.1 Sursaturation

Une stratégie permettant d'augmenter passivement le flux de perméants dans la peau est l'utilisation de solutions sursaturées en perméants. Cette stratégie a été proposée à cette fin depuis les années 1960 par Higuchi <sup>35</sup>.

En effet, le coefficient de partage *P* entre le véhicule et la membrane, utilisé dans l'**équation 1.1** (partie 1.1.2), peut également s'exprimer comme le rapport entre la concentration dans la membrane à saturation  $C_{m,s}$  et la concentration dans le véhicule à saturation  $C_{v,s}$ . Ainsi, l'**équation 1.4** peut s'exprimer sous la forme suivante (**Équation 1.5**) :

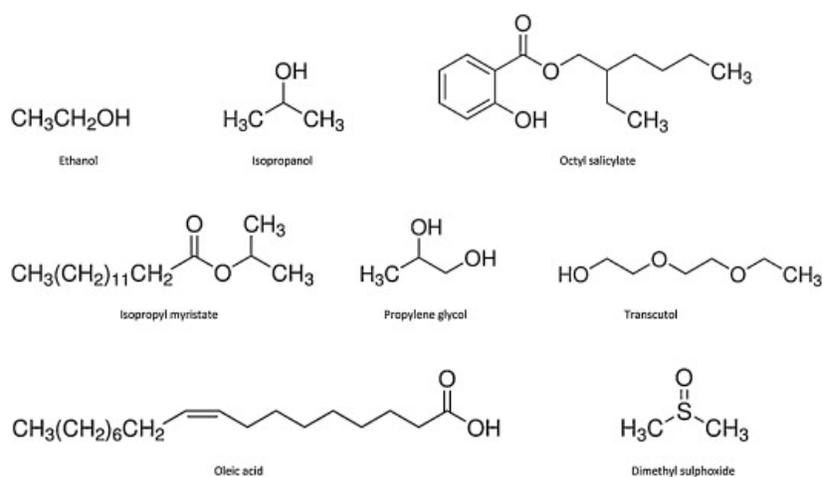
$$J_{eq} = \frac{C_v}{C_{v,s}} \frac{D}{h} C_{m,s} \text{ (Équation 1.5)}$$

Le flux est donc directement proportionnel au rapport  $\frac{C_v}{C_{v,s}}$ , pouvant être défini comme le ratio de saturation. Une sursaturation de la substance active dans son véhicule ( $\frac{C_v}{C_{v,s}} > 1$ ), c'est-à-dire une concentration de la substance active supérieure à sa limite de solubilité, a donc pour effet de maximiser le flux percutané.

Différentes solutions ont été proposées pour favoriser la sursaturation telles que l'utilisation de co-solvants (addition d'un solvant permettant de diminuer la solubilité) ou l'évaporation de solvants (augmentation de la concentration) *in situ* après déposition sur la peau. Néanmoins, les systèmes sursaturés souffrent d'une très faible stabilité en raison de la cristallisation induite par la rupture de l'équilibre métastable. L'addition d'excipients comme des polymères hydrophiles est donc nécessaire pour éviter la formation de cristaux.<sup>36</sup>

### 1.1.3.2 Promoteurs d'absorption

Des promoteurs chimiques d'absorption peuvent être utilisés pour favoriser la perméation des substances actives dans la peau. Les mécanismes d'action de ces promoteurs sont basés sur la théorie de Diffusion-Partage-Solubilisation<sup>37-38</sup>. Les structures de promoteurs d'absorption couramment utilisés dans les formulations cutanées sont présentées dans la **figure 1.5** suivante.



**Figure 1.5** Structures chimiques de principaux promoteurs chimiques d'absorption cutanée<sup>37</sup>

La diffusion peut être facilitée en raison d'interactions spécifiques entre le promoteur et les constituants de la peau. Les promoteurs peuvent favoriser la diffusion par une déstabilisation des structures lipidiques (fluidisation des bicouches lipidiques, extraction de lipides) et/ou des interactions avec la kératine intracellulaire (dénaturation ou modification de la conformation de la kératine, gonflement et hydratation). Les interactions avec les constituants de la peau sont les mécanismes privilégiés des alcools (éthanol, isopropanol), de l'Azone® (1-dodécylazacycloheptan-2-one), du diméthylsulfoxyde (DMSO), des esters de benzoate, des acides gras (acide oléique) et de certains tensioactifs<sup>37-38</sup>. Une hydratation intense (occlusion

ou agents hydratants) de la peau est le moyen le plus naturel pour causer un effet promoteur d'absorption, grâce au gonflement des cornéocytes et à la formation de vésicules aqueuses dans les régions intercellulaires.<sup>39</sup>

Les promoteurs d'absorption peuvent également agir sur le partage-solubilisation des perméants dans la peau, comme c'est le cas du Transcutol® (monoéthyléther de diéthylène glycol), des glycols (propylène glycol), du DMSO, et des esters d'acide gras (isopropyl myristate).<sup>37-38</sup>

En raison de la déstabilisation de la structure cutanée, certains promoteurs d'absorption peuvent induire de la toxicité et de l'irritation cutanée. De faibles concentrations dans la formulation sont donc préférables pour limiter l'apparition d'effets secondaires.

### 1.1.3.3 Application de forces physiques

Différentes technologies de diffusion actives ont été développées dans le but d'étendre la gamme de molécules pouvant être délivrées dans la peau, i.e. des molécules très hydrophiles ou des macromolécules. Ces techniques utilisent des forces physiques pour franchir la barrière cutanée, comme des énergies acoustiques, électriques, laser, et des fortes pressions.

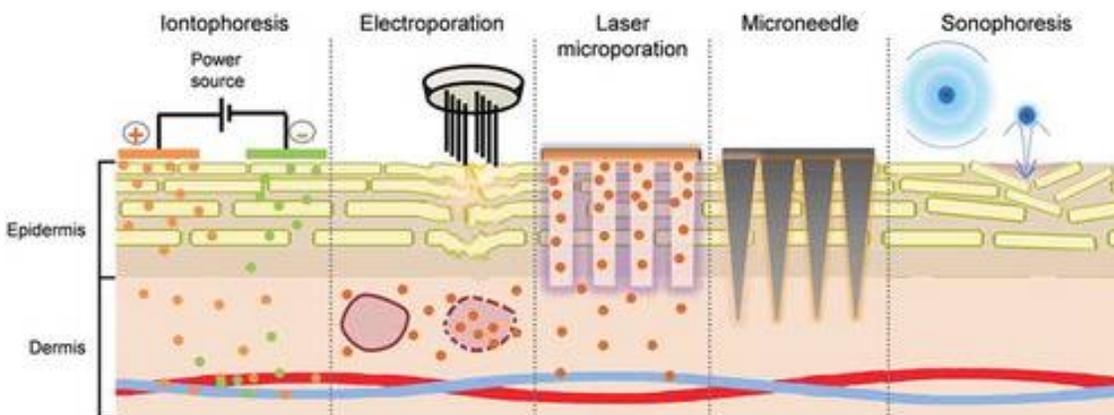
La technique de l'iontophorèse (**Figure 1.6**) est fondée sur l'application d'un faible courant électrique à travers la peau pour aider à la pénétration de molécules contenant des groupements ionisables<sup>40</sup>.

La sonophorèse (**Figure 1.6**) utilise des ultrasons de faible fréquence pour perturber l'empilement des lipides du *SC* par cavitation acoustique<sup>41</sup>.

L'électroporation (**Figure 1.6**) est une technique utilisant des impulsions électriques de haute tension pour induire des perturbations transitoires des bicouches lipidiques de la barrière cutanée. La diffusion profonde des substances actives est favorisée par la perméabilisation du *SC* en raison de la création de canaux aqueux transitoires et de l'effet électrophorétique<sup>42</sup>.

La technique de microporation laser (**Figure 1.6**) repose sur l'exposition de la peau à un rayonnement laser. L'exposition au laser permet d'exciter les molécules d'eau de la peau, causant une surchauffe rapide et leur évaporation explosive, ce qui permet une micro-ablation du *SC* et la formation de micropores dans la peau<sup>43</sup>.

Enfin, les patchs de microaiguilles (**Figure 1.6**), composés d'aiguilles de 10-2000  $\mu\text{m}$  de longueur et 10-50  $\mu\text{m}$  de largeur, permettent la micro-perforation de la peau afin de faire pénétrer directement les composés dans le derme *via* les micropores formés. Les microaiguilles peuvent avoir différentes compositions chimiques et différentes structures (aiguilles solides, aiguilles recouvertes d'une substance active, aiguilles se dissolvant dans la peau, aiguilles remplies de substances actives) <sup>44</sup>.



**Figure 1.6** Méthodes physiques pour améliorer la diffusion des substances actives dans la peau <sup>45</sup>

#### 1.1.3.4 Les nanovecteurs

L'utilisation de systèmes nanoparticulaires transportant des substances actives en leur cœur, a été récemment proposée pour moduler et/ou améliorer le transport des substances actives dans la peau, en plus de permettre leur formulation, et leur protection. Les différents types des vecteurs, leurs applications potentielles ainsi que les différents types de mécanismes de promotion de la pénétration proposés pour les nanovecteurs sont présentés dans la partie introductive suivante *1.2 Les systèmes nanoparticulaires pour la voie cutanée*.

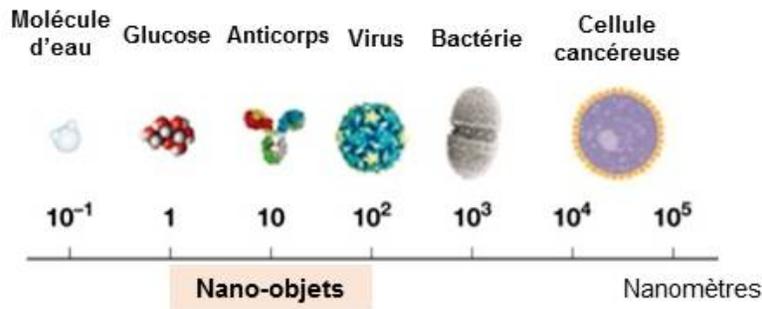
## 1.2 Les systèmes nanoparticulaires pour la voie cutanée

### 1.2.1 Les nanotechnologies et l'administration de médicaments

#### 1.2.1.1 Mise en contexte

La nanotechnologie peut être définie comme l'ingénierie de matériaux à l'échelle nanométrique pour des applications techniques ou scientifiques<sup>46</sup>. En sciences pharmaceutiques, les nanotechnologies sont utilisées pour modifier la biodisponibilité des médicaments dans l'organisme. Leur développement est en plein essor depuis les dernières dizaines d'années. Elles ont pour but d'augmenter potentiellement les rapports bénéfiques/risques des traitements, c'est-à-dire améliorer l'efficacité des traitements tout en diminuant leurs effets secondaires indésirables. Outre l'aspect thérapeutique, les nanotechnologies sont également utilisées à des fins de diagnostic<sup>47</sup> ou pour augmenter les propriétés mécaniques de biomatériaux composites<sup>48</sup>.

Les nanovecteurs sont des nano-objets destinés à véhiculer une molécule d'intérêt dans l'organisme. La norme ISO (27687 : 2008) définit l'expression « nano-objet » comme un matériau dont une, deux ou les trois dimensions externes sont à la nano-échelle, c'est-à-dire comprise entre 1 et 100 nm<sup>49</sup> (**Figure 1.7**). Dans le langage courant, les vecteurs de tailles submicroniques, i.e. < 1 µm sont également souvent définis comme étant des nanovecteurs.



**Figure 1.7** Comparaison de la taille des nano-objets à celle des principales structures biologiques. Figure adaptée de<sup>50</sup>

Le concept de vectorisation repose sur l'association d'une molécule d'intérêt à un système particulaire de propriétés physico-chimiques spécifiques, afin que le devenir de la molécule ne dépende plus uniquement de ses propres propriétés physico-chimiques, mais dépende de celles du système particulaire associé<sup>51</sup>. En effet, le site d'action de la molécule d'intérêt dans l'organisme est souvent séparé du site d'administration par des barrières biologiques, chimiques,

physiques ou enzymatiques et de nombreuses molécules d'intérêt sont caractérisées par des propriétés physico-chimiques non favorables au passage de ces barrières et/ou à leur formulation. Cela est notamment le cas des molécules trop hydrophiles ( $\text{Log } P < 0$ ) ou au contraire trop peu solubles dans l'eau ( $\text{Log } P > 3$ ), des molécules biologiques volumineuses ( $M_w > 500 \text{ g/mol}$ ) (protéines, peptides, acide nucléiques) et/ou fragiles (sensibles à la lumière, l'oxydation, l'humidité).

La stratégie de vectorisation utilise plusieurs concepts permettant d'augmenter la biodisponibilité des substances actives :

- a) **La solubilité.** Les nanovecteurs permettent tout d'abord d'augmenter la solubilité apparente de la substance active dans la formulation et/ou dans le milieu de l'organisme grâce à une incorporation de la substance active dans la matrice du vecteur. La substance active est alors présente dans les nanovecteurs, eux-mêmes dispersés dans un liquide. Cette incorporation est communément dénommée sous le terme d'encapsulation et son efficacité est dépendante des propriétés physico-chimiques du vecteur, de celles de la molécule à encapsuler et de la méthode de préparation.
- b) **La dégradation/le métabolisme.** Les molécules d'intérêt, étant encapsulées dans la matrice des vecteurs, pourront être, *a priori*, moins sensibles, voire insensibles à la dégradation à la fois dans la formulation pendant le stockage et dans les milieux biologiques.
- c) **La distribution.** La vectorisation des substances actives peut dans certains cas moduler leur passage à travers les barrières (tissulaires ou cellulaires) qui les séparent de leur site d'action
- d) **Le ciblage.** Les nanovecteurs peuvent par exemple s'accumuler préférentiellement dans les cellules tumorales par ciblage passif, en raison de l'effet rétention et perméation augmentée (« EPR effect ») dans les tumeurs. Un ciblage actif plus précis peut également être obtenu si des ligands spécifiques aux récepteurs des cellules cibles, sont mis à disposition à la surface des nanovecteurs.
- e) **L'élimination.** Encapsulée dans un nano-objet de plusieurs dizaines de nanomètres, la molécule ne devient plus sujette à la filtration rénale. Néanmoins, dépendamment de leurs propriétés physico-chimiques, les nanovecteurs peuvent être reconnus par le

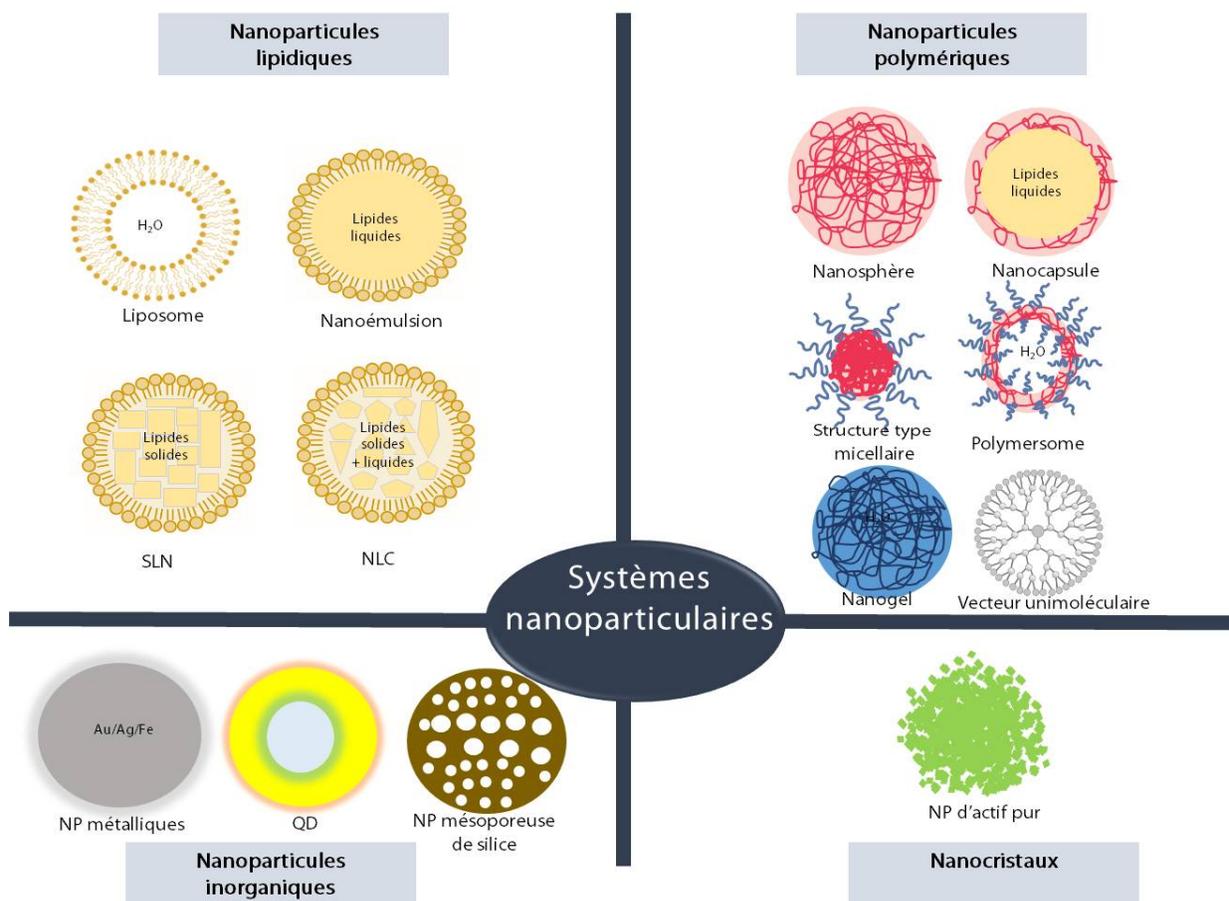
système immunitaire, conduisant ainsi à leur phagocytose, et donc à diminuer leur temps de circulation.

- f) **La toxicité.** Les propriétés de ciblage combinées à une diminution de la dose nécessaire en raison d'une meilleure biodistribution, permettent de réduire la concentration disponible dans les cellules non ciblées, limitant ainsi les effets toxiques possibles.

Les nanotechnologies ont à l'origine été exploitées pour le traitement de cancers, par administration parentérale. La cancérologie reste d'ailleurs toujours le principal domaine d'utilisation des NPs <sup>52</sup>. Néanmoins, cette stratégie thérapeutique prouve également ses bénéfices pour d'autres voies d'administration, notamment pour la voie orale <sup>53</sup> en limitant la dégradation gastro-intestinale des substances actives ou encore pour les voies vaginale <sup>54</sup> ou pulmonaire <sup>55</sup> en raison de propriétés mucoadhésives spécifiques de certains nanovecteurs.

#### 1.2.1.2 Les différents types de systèmes nanoparticulaires

Les NPs sont des objets composés de matériaux très divers. Elles peuvent notamment être composées de lipides, de polymères, ou de matières inorganiques qui conditionnent leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, surface, dureté, déformabilité) et donc leurs applications biomédicales. Les principales familles de NPs utilisées en sciences biomédicales sont les liposomes, les particules lipidiques solides, les nanoémulsions, les particules polymériques, les nanocristaux et les particules inorganiques (**Figure 1.8**). Leurs caractéristiques sont détaillées dans le **tableau 1.1**.



**Figure 1.8** Types de systèmes nanoparticulaires utilisés dans le domaine biomédical. Les systèmes ne sont pas représentés à l'échelle.

**Tableau 1.1** Les différents types de systèmes nanoparticulaires utilisés dans le domaine biomédical.

Famille	Type	Structure	Composition	Caractéristiques	Réf.
<b>NPs lipidiques liquides</b>	Nanoémulsion	Émulsion submicronique (Mini-émulsions)	Dispersion de deux liquides immiscibles (H/E ou E/H) stabilisées par des tensioactifs H/E : 5 à 20% de lipides et huiles diverses	Biphasiques ou multiphasiques Meilleure solubilisation des composés que les solutions micellaires Meilleure stabilité cinétique que les émulsions classiques.	56
<b>Vésicules lipidiques</b>	Liposome	Vésicule sphérique constituée d'une ou plusieurs bicouches lipidiques concentriques (3-6 nm) autour d'un ou plusieurs espaces aqueux	Phospholipides naturels ou dérivés neutres (phosphatidylcholine), anioniques ou cationiques	Encaps. molécules hydrophiles/lipophiles (limité) Rigidité variable selon le taux de cholestérol Toxicité minimale (biomimétisme), mais stabilité limitée Doxil® : premier « nano-médicament » approuvé en 1995 par la FDA	57-58
	Éthosome	Idem liposome	Phospholipides + éthanol (20-45%)	Éthanol : promoteur d'absorption/structures + flexibles	59
	Transferosome®	Idem liposome	Phospholipides + molécules amphiphiles	Tensioactifs réduisent le rayon de courbure des liposomes les rendant ultra-flexibles et élastiques	60
<b>NPs lipidiques solides</b>	SLN®	NP solide	Un ou plusieurs types de lipides solides (0.1 et 30% de la formulation) solides à température ambiante et à température du corps + tensioactifs	Encaps. molécules lipophiles Structure lipidique très ordonnée peut limiter l'encapsulation des substances actives + changement de structure au cours du stockage (expulsion de la substance active) Développées en alternative aux émulsions classiques et aux liposomes.	61
	NLC <sup>a</sup>	NP solide	Lipides solides + lipides liquides (jusqu'à 30%)	Structure cristalline moins ordonnée (+ d'encaps., + de stabilité)	61
<b>NPs polymériques</b>	Nanosphère	Cœur solide hydrophobe, de type matriciel	Polymères hydrophobes ou amphiphiles à base de poly(alkylcyanoacrylates), polyesters (PLA <sup>b</sup> , PLGA <sup>c</sup> , PCL <sup>d</sup> )	Encapsulation des substances actives hydrophobes dans la matrice polymérique	62
	Nanocapsule	NP vésiculaire (membrane polymérique et cœur huileux)		Encapsulation des substances actives hydrophobes dans le cœur huileux et matrice polymérique	62
	Micelle	Cœur hydrophobe /couronne de polymère hydrophile	Co-polymères amphiphiles (partie hydrophile en PEG <sup>e</sup> , PVP <sup>f</sup> , PAA <sup>g</sup> , PMPC <sup>h</sup> )	Assemblage de chaînes amphiphiles en milieu aqueux État dynamique si échanges possibles entre les micelles et les unimères en solution, (idem micelles de tensioactif), donc sensibles à la dilution (réticulation nécessaire)	62-63

				État non dynamique, cinétiquement gelé (« micelle-like »), si aucun échange ou échanges sur un temps très important	
	Polymersome	Vésicule (bicouches polymériques autour d'un réservoir aqueux)		Structure semblable aux liposomes	62
	Nanogel	Hydrogel (réseau 3D de polymères)	Dextrane, chitosane, acide hyaluronique, alginate, PMMA <sup>i</sup> , PNIPAM <sup>j</sup>	Riche en eau/ fluide physiologique. Encapsulation de molécules hydrophiles Propriétés de gonflement	64
	Structures unimoléculaires	Dendrimère, Polymère étoile/ brosse		Stabilité accrue par rapport aux assemblages supramoléculaires	65
<b>Nanocristaux</b>	NP de substance active « drug NPs »	NP solide	Majorité de substance active + tensioactif stabilisateur	Augmente le taux de dissolution des substances actives très peu solubles dans l'eau (formes orales notamment) Formulations très concentrées en substance active malgré leur faible solubilité + minimum d'excipients pour plus de sûreté	66
<b>NPs inorganiques</b>	Variable	NP solide	Matière inorganique oxyde de fer, argent, or, semi-conducteurs ( <i>quantum dots</i> ), silice	Diagnostic (imagerie) : propriétés de résonance plasmonique de surface (or), optiques ( <i>quantum dots</i> ) ou paramagnétiques (oxyde de fer). Ciblage : propriétés magnétiques Thérapeutique : résonance plasmonique (traitements photothermiques ou photodynamiques), propriétés antimicrobiennes (Ag), traitement de l'anémie (Fe), mésoporosité pour stockage de substance active et libération (Silice)	67-68
<b>Particules mixtes</b>	NP lipides-polymères	Cœur polymérique + monocouche/bicouche de phospholipides	Polymère+phospholipides	Cœur polymérique : stabilité + capacité d'encapsulation Surface lipidique : biocompatibilité	69
	NP organique-inorganique	Différentes structures	Organique+inorganique	Compo. organique : délivrance de substance active Compo. inorganique : imagerie/magnétisme	70

<sup>a</sup>NLC : Vecteurs lipidiques nanostructurés (Nanostructured lipid carriers), <sup>b</sup>PLA : acide poly(lactique), <sup>c</sup>PLGA (acide poly(glycolique-co-lactique), <sup>d</sup>PCL : poly(caprolactone), <sup>e</sup>PEG : poly(éthylène glycol), <sup>f</sup>PVP : poly(vinylpyrrolidone), <sup>g</sup>PAA : poly(acide acrylique), <sup>h</sup>PMPC : poly(2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine), <sup>i</sup>PMMA : poly(méthacrylate de méthyle), <sup>j</sup>PNIPAM : poly(N-isopropylacrylamide)

### 1.2.1.3 Cas particulier des nanoparticules polymériques

#### 1.2.1.3.1 *Quelques avantages généraux par rapport aux autres types de nanoparticules*

Parmi les types de nanovecteurs proposés, les NPs polymériques se distinguent des NPs lipidiques en raison de leur stabilité accrue (stockage plusieurs mois en suspension, stockage beaucoup plus long pour des formulations de NPs polymériques sèches, stabilité dans les milieux physiologiques), de l'encapsulation efficace des molécules lipophiles, et de leur facilité de fonctionnalisation (changement de surface, ajout de ligands, etc.). Les propriétés physico-chimiques de ces types de NPs peuvent également être finement contrôlées en fonction de l'application souhaitée en optimisant le choix du ou des polymères utilisés<sup>2</sup>. De plus, les NPs polymériques peuvent être fabriquées par une simple méthode de nanopréciipitation, avantageuse du point de vue économique pour la fabrication à grande échelle. L'optimisation de la méthode de fabrication et de la composition chimique permet également de moduler facilement la taille des NPs polymériques<sup>71</sup>, selon l'application souhaitée. De très faibles tailles de NPs sont par exemple atteignables avec l'utilisation de copolymères amphiphiles (10-100 nm)<sup>62</sup>, ce qui leur confère un avantage important par rapport aux particules lipidiques généralement caractérisées par des tailles plus élevées (>100 nm).

#### 1.2.1.3.2 *Compositions*

Un atout essentiel à l'utilisation de matériaux polymères pour la fabrication de NPs est la versatilité des structures disponibles ou faisables par synthèse. Les polymères utilisés pour la fabrication de nanovecteurs peuvent être classés en deux catégories selon leur provenance : les polymères naturels et les polymères synthétiques.

Les polymères naturels/biopolymères sont composés de polymères existants dans la nature, tels que le chitosane, l'alginate, la gélatine ou encore l'albumine. Ils sont largement utilisés pour l'encapsulation de molécules hydrophiles<sup>72</sup>. Cependant, les nanovecteurs fabriqués avec ces polymères naturels peuvent ne pas être reproductibles en raison de variabilités entre les lots de polymères (propriétés, pureté).

L'utilisation de polymères synthétiques peut donc être préférable pour gagner en reproductibilité. Par ailleurs, leurs propriétés sont plus versatiles que les polymères naturels en raison de la possibilité de contrôle de l'architecture, de la composition, de la masse molaire.

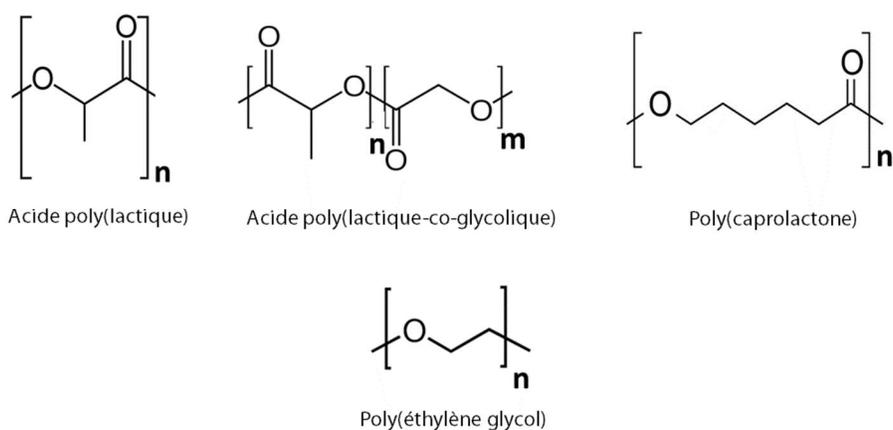
Néanmoins, l'utilisation de polymères synthétiques en vue d'une application biomédicale est conditionnée par leur caractère biocompatible et biodégradable afin d'éviter tout effet toxique lié leur accumulation dans le corps. Dans le domaine biomédical, le terme biodégradable décrit la capacité des matériaux à se cliver en plus petits fragments non toxiques et pouvant être métabolisés ou éliminés par le corps. Le caractère dégradé des polymères dépend de la nature des liaisons chimiques entre les enchainements de monomères. Les polymères peuvent se dégrader rapidement si les liaisons chimiques sont facilement clivables, notamment par un mécanisme d'hydrolyse.

Pour la délivrance de substances actives, une grande variété de structures polymériques biocompatibles et biodégradables a déjà été étudiée. Les polymères biodégradables synthétiques les plus couramment utilisés sont à base de polymères de la famille des polyesters aliphatiques, et notamment l'acide poly(lactique) (PLA), l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA), et le poly(caprolactone) (PCL) (**Figure 1.9**). Ces polymères présentent plusieurs avantages :

- i) Leur facilité de synthèse, nécessitant un monomère faiblement coûteux et facile d'obtention
- ii) Le clivage des liaisons esters par hydrolyse dans les milieux biologiques avec une vitesse dépendante des monomères et de la taille du polymère et l'obtention de produits de dégradation non toxiques et éliminables <sup>73</sup>
- iii) La possibilité d'encapsuler des molécules lipophiles dans la matrice hydrophobe.

Les polyesters lipophiles peuvent également être associés de manière covalente à un polymère hydrophile biocompatible pour former des structures polymériques amphiphiles, appelées copolymères à blocs. Ces polymères amphiphiles, sont notamment largement utilisés pour l'administration parentérale puisque, en milieu aqueux, ces polymères s'assemblent sous forme de NPs de structure cœur-couronne : le cœur de la NPs se compose du bloc polymérique hydrophobe tandis que la partie polymérique hydrophile du copolymère se dispose à la surface des NPs. Une telle structure permet d'augmenter la stabilité des NPs par encombrement stérique, d'éviter les phénomènes d'agrégation en milieu salin <sup>74</sup> ou de reconnaissance par le système réticulo-endothélial qui aboutiraient à une élimination sans avoir atteint le site d'action <sup>75-76</sup>. Le poly(éthylène glycol) (PEG) (**Figure 1.9**) est le polymère hydrophile le plus couramment utilisé,

mais d'autres polymères hydrophiles ont été étudiés, notamment le poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) ou les poly(acide acryliques). Il est néanmoins important de noter que ces blocs hydrophiles ne sont souvent pas biodégradables, mais des chaînes de taille inférieure à 30 kDa peuvent tout de même être éliminées du corps par filtration rénale <sup>77</sup>.



**Figure 1.9** Structures chimiques des unités de répétition des blocs polymériques lipophiles et hydrophiles communément utilisés dans la fabrication de NPs polymériques pour le domaine biomédical

### 1.2.1.3.3 Structures

Les polymères peuvent s'arranger sous forme de différentes structures (nanosphères, nanocapsules, polymersomes, micelles, micelles unimoléculaires, ...) selon leur composition lipophile et hydrophile et notamment selon le type de polymère, la taille des blocs polymériques, l'architecture (linéaire, branchée, Y, étoile) et la variété des combinaisons entre les blocs (monobloc A, diblocs A-B, triblocs A-B-A ou B-A-B, multiblocs, polymères en étoile, etc.; A représentant un bloc polymérique hydrophobe et B, un bloc polymérique hydrophile).

## 1.2.2 Enjeux des nanovecteurs pour la voie cutanée

### 1.2.2.1 Bénéfices des nanoparticules pour la voie cutanée

Par rapport à leur transport à l'état dissous, les nanovecteurs offrent la possibilité de contrôler la diffusion des principes actifs par la voie cutanée en raison des mécanismes spécifiques de

transport des molécules dans la peau, dépendant de leurs propriétés physico-chimiques intrinsèques :

- **Effets de surface** (formulations filmogènes permettant un effet d'occlusion) <sup>78-81</sup>
- **Effets similaires aux promoteurs d'absorption** (interactions avec les lipides) <sup>82-83</sup>
- **Effets de concentration locale** favorisant la diffusion <sup>84-87</sup>
- **Accumulation en surface ou dans le SC pour un effet réservoir** permettant une diffusion prolongée ou un effet très local <sup>88-89</sup>.
- **Accumulation dans les annexes pilo-sébacées** <sup>90-91</sup> pour une absorption plus profonde ou un effet ciblé <sup>92-94</sup> et une protection contre les facteurs extérieurs <sup>90</sup>
- **Pénétration possible des NPs** dans les couches viables (notamment pour particules déformables <sup>60</sup> ou si la fonction barrière de la peau est altérée <sup>92-93, 95-97</sup>)
- **Internalisation cellulaire** <sup>92-93</sup>

En plus du contrôle de l'absorption cutanée, les nanovecteurs peuvent assurer un certain nombre d'effets bénéfiques pour l'application cutanée :

- **Formulation de substances actives peu solubles** dans des suspensions aqueuses <sup>98</sup>
- **Effet protecteur**, notamment pour les molécules biologiques <sup>99</sup> ou les principes actifs chimiques sensibles <sup>98</sup>
- **Réduction des effets secondaires** en raison de la libération contrôlée et prolongée et/ou du ciblage cutané <sup>100-102</sup>.

Certains types de NPs peuvent également être eux-mêmes d'intérêt pharmaceutique en raison :

- De leurs propriétés **antimicrobiennes** <sup>103</sup> (ex. particules d'argent)
- De leurs propriétés **immunologiques** <sup>99</sup> (ex. pour la vaccination)

Les bénéfices des nanovecteurs pour la voie cutanée sont détaillés dans la partie 1.2.3 à travers l'exemple des NPs polymériques.

#### 1.2.2.2 Mécanismes connus d'absorption cutanée selon le type de vecteur

Les liposomes font partie des types de vecteurs les plus couramment utilisés pour la voie cutanée. De nombreux articles ont mis en évidence que la pénétration des liposomes intacts dans

la peau n'était pas envisageable, mais qu'au contraire ceux-ci adhéraient à la surface de la peau. Leur composition lipidique, proche de celle du *SC* favorise leur fusion à la surface de la peau<sup>104-105</sup>. Les principes actifs, préalablement encapsulés sont donc libérés et peuvent pénétrer la peau. Les phospholipides peuvent également pénétrer les phases lipidiques intercellulaires, déstabilisant alors leurs arrangements structuraux<sup>106</sup> et provoquant un effet promoteur d'absorption<sup>82</sup>. Ces effets sont néanmoins liés au type de phospholipides<sup>106</sup> et au type de phase cristalline des liposomes<sup>107</sup>. Par ailleurs, et en raison de leurs caractéristiques spécifiques, les structures dérivées des liposomes (éthosomes, transferosomes) favorisent des interactions complémentaires avec la peau. L'éthanol, présent dans les éthosomes, induit par exemple un effet synergique avec les phospholipides, agit comme un promoteur d'absorption et apporte de la flexibilité à la structure liposomale<sup>83</sup>. Les transferosomes quant à eux, sont plus déformables que les liposomes classiques, leur permettant plus vraisemblablement de passer à travers les espaces intercornéocytaires du *SC* sans rompre à la surface comme c'est le cas pour les liposomes classiques<sup>60</sup> (Voir partie *1.3.1.1.3 Déformabilité des particules molles*).

Les NPs lipidiques de type SLN et NLC ont également l'avantage du contenu lipidique, mimétique de la peau. Après application topique, ces NPs lipidiques semblent également ne pas pénétrer sous forme intacte, mais forment une couche lipidique à la surface en raison de leurs propriétés adhésives. Ce film lipidique hydrophobe induit un effet occlusif à la surface de la peau<sup>78-79</sup>. L'occlusion prévient la perte en eau de la peau provenant de l'évaporation naturelle, et induit un gonflement de la peau responsable d'une réduction de l'organisation compacte des cornéocytes et l'ouverture des espaces lipidiques intercornéocytaires<sup>108</sup>. Une telle occlusion peut donc potentiellement favoriser la diffusion des substances actives à travers la barrière cutanée<sup>109</sup>. Il est à noter que le contenu en lipides liquides dans les NPs lipidiques diminue leur effet d'occlusion et réduit ainsi l'absorption cutanée<sup>80-81</sup>.

Au contraire des NPs lipidiques, les NPs polymériques sont généralement reconnues pour avoir une meilleure stabilité colloïdale. La taille des NPs polymériques étant généralement bien supérieure à 20 nm, la voie intercellulaire n'est, dans la plupart des cas, pas privilégiée pour ces vecteurs (voir partie *1.3.1.1.1 Taille*). Généralement, les NPs polymériques ne peuvent donc pas passer au travers du *SC* d'une peau intacte saine, où elles restent emprisonnées. Par ailleurs, de nombreuses études ont montré que la voie de pénétration privilégiée des particules polymériques

est la voie folliculaire (ouvertures de plusieurs dizaines de micromètres), où les particules peuvent pénétrer plus ou moins profondément et s'accumuler<sup>91, 110-115</sup>. Après accumulation des NPs dans ces régions, le principe actif peut alors être libéré et atteindre plus facilement l'épiderme ou le derme, car la barrière cutanée est plus fine dans les follicules<sup>15</sup>. Dans les canaux folliculaires, les NPs sont ainsi protégées du renouvellement du SC qui les éliminerait rapidement, et peuvent prolonger la diffusion de la substance active encapsulée. Ainsi, une étude a montré une persistance de NPs polymériques dans les follicules allant jusqu'à 10 jours, permettant ainsi un traitement de longue durée<sup>90</sup>. Des accumulations de particules entre des groupements de cornéocytes (régions « interclusters ») et/ou dans les rides, qui forment des invaginations de la peau, sont également souvent visualisées<sup>87,91</sup>. Une agrégation des particules lipophiles au contact du milieu lipophile de la peau est toutefois aussi possible, comme rapportée par Rancan *et al.*<sup>116</sup>.

Bien que le type de vecteur et sa composition définissent un mode d'action générale, les mécanismes d'interactions avec la peau qui sont responsables de la modulation de la pénétration cutanée des substances actives ne sont pas uniquement dépendants de ces caractéristiques. Le rôle d'autres facteurs (liés aux propriétés des NPs, à leur application cutanée ou à l'état de la peau) sur la biodisponibilité dans la peau des NPs et/ou des principes actifs à partir de systèmes particuliers est détaillé dans la partie 1.3 « *Facteurs influençant la biodisponibilité dans la peau des NPs et/ou des principes actifs à partir de systèmes particuliers* ».

### 1.2.2.3 Applications et commercialisation

Les applications des nanovecteurs sur la peau sont multiples et incluent i) l'amélioration de la pénétration cutanée de molécules actives reconnues, et notamment les molécules présentant une faible pénétration comme les molécules très hydrophiles ou très hydrophobes, de haut poids moléculaire ou les molécules difficiles à formuler; ii) la délivrance de nouvelles classes de molécules actives, et iii) le ciblage de populations cellulaires spécifiques.

Pour le domaine dermopharmaceutique, les nanovecteurs sont donc testés pour le traitement de nombreuses pathologies cutanées (infections fongiques<sup>113</sup>, acné<sup>117</sup>, psoriasis<sup>118</sup>, dermatites<sup>119</sup>...) afin d'augmenter leur efficacité par rapport aux formulations commerciales et leur tolérance.

L'accumulation folliculaire de certains types de NPs en fait notamment un traitement de choix pour des pathologies liées à des troubles des follicules pilo-sébacés (acné<sup>100-101</sup> et alopecie<sup>120</sup>). En combinaison avec des méthodes physiques de pénétration, les NPs sont testées pour le développement de formulations innovantes pour le cancer de la peau<sup>121</sup>, et sont également attrayantes pour la vaccination cutanée<sup>99</sup>, notamment en raison de leurs propriétés immunologiques intrinsèques et à la protection des vaccins lors de leur stockage. Leur utilisation pour de la délivrance systémique (transdermique) est également reportée<sup>122-123</sup>.

Bien que largement commercialisées pour des applications cosmétiques, très peu de formulations topiques pharmaceutiques à base de NPs sont commercialisées ou en développement clinique en phase II ou supérieure (**Tableau 1.2**). Ces particules sont quasi exclusivement des particules de type lipidique (nanoémulsions ou liposomes), c'est-à-dire, fabriquées à partir d'excipients communément utilisés dans le développement de médicaments pour application cutanée. Les applications de ces particules commercialisées ou en développement clinique incluent : l'effet antimicrobien, le traitement de l'acné, d'infections fongiques, du psoriasis, de la leishmaniose, de l'herpès, de la kératose actinique et de métastases cutanées, et des thérapies hormonales (voie transdermique).

**Tableau 1.2** Nanoformulations commercialisées ou en développement clinique (de phase II ou supérieure) pour les traitements cutanés

Type de nanoformulation	Description	Principe Actif	Indication thérapeutique	Propriétaires/ Sponsors/ Collaborateurs	Statut
<b>Liposome</b>	Pevaryl Lipogel ® Gel liposomal	Econazole	Antifongique	Janssen Cilag	Commercialisé
	LMX4-gel®	Lidocaine	Anesthésiant	Ferndale Laboratories	Commercialisé
	Hydrogel liposomal Betadine	Povidone iodine	Antiseptique	MundiPharma	Commercialisé
	Repigel®/Repithel® Gel liposomal	Dithranol	Traitement du Psoriasis	Lifecare Innovations	Commercialisé
	Fugisome® gel	Amphotéricine B	Infections fongiques et Leishmaniose	Lifecare Innovations	Commercialisé
	Gel liposomal	Amphotéricine-B	Traitement de la leishmaniose	Suroka University Medical Center	Phase II NCT02656797*
<b>Nanoémulsion</b>	Nanoémulsion sous forme de mousse FMX-101	Minocycline	Traitement de l'acné	Foamix LTD	Phase III NCT02815280* (complétée)
	Délivrance transdermique	Testostérone	Thérapie Hormonale	University Potiguar Farmacias Evidence Ltda	Phase II NCT02445716*
	Oxalgin® Nanogel	Diclofenac sodium Methylsalicylate	Antiinflammatoire	Zydus Cadila Healthcare	Commercialisé
	Nioret® Nanogel	Trétinoïne	Traitement de l'acné	Zydus Cadila Healthcare	Commercialisé <sup>124</sup>
	Nanoémulsion sous forme de mousse FMX-101	Minocycline	Traitement de l'acné	Foamix LTD	Phase III NCT02815280* (complétée)
	Nanoémulsion NB-001		Traitement de l'herpès labial	Blue Willow Biologics (Nanobiocorp)	Phase III NCT01321359* (complétée)

	Délivrance transdermique	Testostérone	Thérapie hormonale dans le cadre de la ménopause	University Potiguar Farmacias Evidence Ltda	Phase II NCT02445716*
	Délivrance transdermique	Progestérone Estradiol Estriol	Thérapie hormonale	University Potiguar InBios International, Federal University of São Paulo	Phase II NCT02467673* <sup>125</sup>
	Ameluz® gel	Acide 5-aminolévulinique	Thérapie photodynamique de la kératose actinique	Biofrontera Bioscences	Commercialisé <sup>126</sup>
<b>NPs micellaires</b>	Estrasorb® Emulsion micellaire (délivrance transdermique)	Estradiol hémihydrate	Traitement des symptômes vasomoteurs liés à la ménopause	Graceway Pharmaceuticals, LLC	Commercialisé
<b>Nanocapsules polymériques</b>		Lidocaïne Prilocaine	Anesthésiant avant traitement laser CO <sub>2</sub>	Biolab Sanus Pharmaceuticals	Phase III NCT03366246* (complétée)
<b>Nanocristaux</b>	NanoPac® Pommade SOR007	Paclitaxel	Traitement des métastases cutanées ou de la kératose actinique	NanOlogy	Phase II NCT03083470*
<b>NPs inorganiques</b>	SILCRYST ou Acticoat® Pansement	Argent (nanocristaux)	Antimicrobien	NUCRYST Ou Smith&Nephew	Commercialisé
	Silvasorb® hydrogel	Argent	Antimicrobien	Medline Industries, Inc	Commercialisé

\*Identifiant ClinicalTrials.gov

### **1.2.3 Illustration des bénéfices des nanoparticules pour la voie cutanée à travers l'exemple des nanoparticules polymériques biodégradables**

Les NPs polymériques apportent de nombreux d'avantages pour le développement de formulations cutanées efficaces par rapport aux formulations conventionnelles ou encore à certains autres types de NPs. Un grand nombre de structures polymériques (nanosphères, nanocapsules, polymersomes, micelles, nanotransporteurs multicouches, micelles unimoléculaires, ...) et de compositions polymériques biodégradables et biocompatibles différentes ont déjà été testées pour la voie cutanée, et ce, pour une multitude d'applications (**Tableau 1.3**). Les polymères amphiphiles font notamment l'objet d'une attention grandissante en raison de leur capacité à s'assembler sous forme de NPs de faibles tailles (**Tableau 1.3**). Le caractère biodégradable et/ou biocompatible des nanovecteurs polymériques est primordial afin d'éviter tout effet toxique lié à leur accumulation dans la peau. En effet, bien que les nanomatériaux ne pénètrent vraisemblablement pas les couches viables de la peau saine (sauf si très faible taille et/ou déformabilité), leur pénétration est plus probable si la barrière cutanée du SC est altérée (*voir partie 1.3.3.2 Pénétration cutanée sur peau non saine*).

La multitude d'avantages liés aux NPs polymériques est illustrée dans cette partie à travers quelques exemples thérapeutiques détaillés, notamment au niveau des bénéfices du point de vue de la formulation, de l'absorption cutanée, de l'efficacité thérapeutique et de la réduction des effets secondaires.

**Tableau 1.3** Exemples de systèmes nanoparticulaires à base de polymères biodégradables synthétiques pour la voie cutanée

Architecture	Type de polymères	Dénomination des NPs	Taille	Molécule encapsulée	
<b>Monoblocs hydrophobes</b>	PLA	Nanoparticules	194-227 nm	Fluorophore Bodipy <sup>127</sup>	
			226-365 nm	Rouge de Nil/Coumarin 6 <sup>128</sup>	
			207-164 nm	4-Di-2-Asp/Bodipy <sup>116</sup>	
	PLGA	Nanoparticules	358 nm	Ovalbumine <sup>99</sup>	
			153-101 nm	Estradiol <sup>129</sup> /Indométhacine <sup>130</sup>	
			Nanocapsules	328 nm	Acide flufénamique <sup>131</sup>
	PLGA associé à du chitosane	Nanoparticules	153-217 nm	Spantide II/Kétoprofène <sup>132</sup>	
	PCL	Nanocapsules	263 nm	Octylmethoxycinnamate <sup>88</sup>	
<b>Diblocs amphiphiles linéaires</b>	PEG-PCL	Nanoparticules	40- 130 nm	Minoxidil <sup>110</sup>	
			Micelles	25 nm	Oridonin <sup>133</sup>
			Nanoparticules	60 nm	Zinc phtalocyanine <sup>134</sup>
			Nanovéhicules	40-80 nm	Rétinol <sup>135</sup>
		PEG-PLA	Nanoparticules	100 nm	Paclitaxel <sup>111</sup>
		PEG-PLGA/PLGA	Nanosphères	100 -230 nm	Flurbiprofène <sup>136</sup>
		mPEG-dihexPLA	Micelles polymériques	25-50 nm	Econazole <sup>113</sup> , Tacrolimus <sup>115</sup> Cyclosporine A <sup>87</sup>
		PEG-PCL/PEG-PLA	Micelles polymériques	65 nm	Rétinol <sup>114</sup>
	TPGS-PLGA	Nanoparticules	136 nm	Quercetine <sup>137</sup>	
<b>Triblocs amphiphiles linéaires</b>	PEG-PCL-PEG	Polymersomes	120 nm	Rouge de Nil <sup>138</sup>	
	PEG-Tyrosine-PEG (Tyrosphere®)	Micelles polymériques	35-75 nm	Paclitaxel <sup>139</sup> , Cyclosporine A <sup>140</sup> Cholécalciférol <sup>98</sup> , Adapalène <sup>100-101</sup>	
<b>Architectures amphiphiles singulières</b>	PCL-PEG-PCL (triblocs en Y)	Micelles polymériques	~60 nm	Kétoconazole/ fluoresceine <sup>141</sup>	
	PEG-propionate (diblocs)	Micelles inverses	18-160 nm	Proflavine <sup>142</sup>	
	Polymère étoile PEGylé	Micelles unimoléculaires	ND	AINS <sup>143</sup>	
	PG10000-NH <sub>2</sub> -C18-mPEG/ PG10000 hyperbranché-NH <sub>2</sub> - PCL-PEG2000 (triblocs)	Nanotransporteur multicouches (CMS)	20-240 nm (Agrégats)	Rouge de Nil <sup>97, 144 145</sup>	

TPGS : *d*- $\alpha$ -Tocopheryl polyéthylène glycol 1000 succinate, PG: Poly(glycérol)

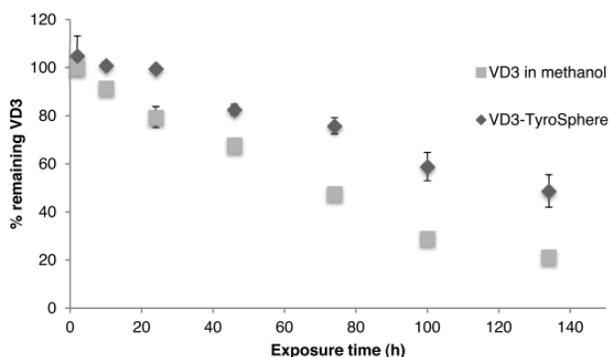
### 1.2.3.1 Encapsulation de substance active, solubilité apparente et stabilité

Comme abordé dans le paragraphe 1.1.3, un problème majeur dans la formulation de composés très lipophiles est leur très faible solubilité aqueuse. Les NPs polymériques, de cœur lipophile peuvent donc surmonter ce problème par l'encapsulation physique du composé lipophile dans le cœur lipophile grâce à des interactions favorisées (ex. interactions hydrophobes), permettant ainsi d'augmenter considérablement la solubilité aqueuse apparente de la substance active sans précipitation.

Par exemple, Lapteva *et al.* sont notamment parvenus à augmenter jusqu'à 518 fois la solubilité aqueuse de la cyclosporine A, non disponible jusqu'alors sous forme de formulation topique commerciale (passage de 0,012 mg/mL à 6,2 mg/mL)<sup>87</sup>, et 250 fois celle du tacrolimus sans précipitation de la substance active<sup>115</sup> grâce à une encapsulation dans des micelles de mPEG-hexPLA. L'ajout de groupements hexyl sur le squelette de PLA permettant d'augmenter l'incorporation de principes actifs lipophiles par rapport à un cœur de PLA non substitué<sup>113</sup>. Des études de solubilité ont également été réalisées pour des Tyrosphères® (NPs polymériques dérivées de la tyrosine). Il a par exemple été montré que ces particules amélioraient la solubilité du paclitaxel environ 4000 fois par rapport au PBS et 84 fois par rapport à une solution aqueuse à 1%<sub>p/v</sub> de polysorbate80. Ces particules permettent également d'augmenter la solubilité de la cyclosporine A 1100 fois<sup>140</sup> et plus de 25 fois celle de l'adapalène<sup>100</sup> par rapport à leur forme libre dans le PBS. La solubilité du cholécalférol a par ailleurs été augmentée jusqu'à 10 000 fois à l'aide de Tyrosphères® par rapport à leur solubilité aqueuse<sup>98</sup>.

Grâce à leur encapsulation dans le cœur polymère hydrophobe, les substances actives peuvent également être protégées par rapport à leur forme libre, et donc conserver leur efficacité pendant une plus grande période. Pour donner un aperçu de cet effet stabilisant, Ramezanli *et al.* ont montré que l'encapsulation dans des Tyrosphères® diminuait la vitesse de photodégradation du cholécalférol par rapport à sa forme libre dans le méthanol (respectivement  $-0.76 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  et  $-1.19 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) lors d'une exposition des formulations à des rayonnements UV (**Figure 1.10**). Par ailleurs, l'encapsulation a également permis d'améliorer significativement la stabilité au stockage de cette substance active par rapport à sa forme libre dans le Transcutol® (> 75 % de cholécalférol restant dans les Tyrosphères® après 2 mois de stockage à température

ambiante à l'abri de la lumière contre 2 % dans le Transcutol®) <sup>98</sup>. Les substances actives biologiques peuvent également être protégées grâce au cœur polymérique. Par exemple, dans une étude utilisant des NPs polymériques de PLGA à des fins de vaccination cutanée, Zaric *et al.* ont montré que l'encapsulation de l'antigène ovalbumine permettait de conserver son caractère antigénique au cours du stockage, même après 10 semaines à température ambiante (**Figure 1.11 B**) <sup>99</sup>.



**Figure 1.10** Stabilité du cholécalférol (VD3) encapsulé dans des Tyrosphères® ou dissout dans du méthanol (contrôle)<sup>98</sup>

### 1.2.3.2 Absorption cutanée

Les NPs polymériques permettent de moduler l'absorption des substances actives lipophiles par rapport à d'autres formulations nanoparticulaires ou à des formulations plus conventionnelles (crèmes, pommades, gel, solutions aqueuses, solutions micellaires etc.). Les premiers travaux de recherche, sur l'utilisation de NPs polymériques pour la délivrance de substances actives à travers la peau, ont par exemple montré que des NPs de 40 nm à base de polymères amphiphiles de PCL-PEG, permettaient une meilleure pénétration transdermique du minoxidil encapsulé à travers une peau de cobaye, en comparaison à des liposomes et une solution à 30 % d'éthanol <sup>110</sup>. Dans une autre étude, il a été montré que des NPs polymériques amphiphiles, de type CMS, permettaient une meilleure accumulation du fluorophore rouge de Nil dans toutes les couches de la peau en comparaison à une crème et à des NPs lipidiques de type SLN, notamment en raison de leur faible taille (20-30 nm) <sup>144</sup>. Récemment, il a également été démontré au sein du Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés de l'Université de Lyon, que des NPs à base de polymères à blocs amphiphiles favorisaient l'accumulation du rétinol *in vitro* dans la peau de porc en comparaison à une solution micellaire de tensioactif polysorbate 80 et une

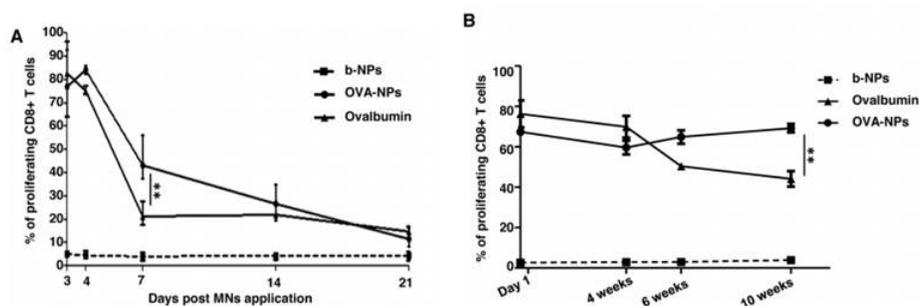
solution huileuse de triglycérides à chaînes moyennes <sup>114</sup>. Les particules totalement hydrophobes et chargées ont également montré leur intérêt. Une accumulation augmentée et localisée dans la peau d'un agent « photosensibilisant » a par exemple été remarquée grâce à son encapsulation dans des NPs de PLGA en comparaison à sa solubilisation dans du PEG300 <sup>146</sup>. La présence de charges électrostatiques sur ces types de NPs en fait également des candidats de choix pour l'iontophorèse. Tomoda *et al.* ont par exemple montré que la délivrance *in vivo* de l'indométacine par iontophorèse était favorisée grâce à l'encapsulation dans des NPs de PLGA <sup>130</sup>.

Les nanoformulations polymériques ont également largement prouvé leurs avantages par rapport aux formulations déjà disponibles commercialement, et ce pour de nombreuses applications. Une meilleure pénétration du tacrolimus pour le traitement du psoriasis (~3 fois par rapport à la formulation commerciale pommade Protopic®) <sup>87</sup> et de l'éconazole nitrate pour le traitement des infections fongiques (~13 fois par rapport à la formulation commerciale liposomale Pevaryl®) <sup>113</sup> a été observé lorsque ces substances actives étaient encapsulées dans des micelles de mPEG-hexPLA. Concernant le tacrolimus, l'hypothèse d'une plus forte concentration locale de la substance active lorsqu'encapsulée dans les particules polymériques menant à une plus grande force de diffusion dans la peau (saturation plus importante, **équation 1.5**), par rapport à la formulation commerciale, a été émise pour expliquer ces résultats. Une accumulation privilégiée entre les groupements de cornéocytes formant des invaginations de la peau a également été reportée <sup>87</sup>. Pour l'éconazole nitrate, la plus petite taille des particules polymériques par rapport à la forme commerciale liposomale a été mise en avant <sup>113</sup>, avec une accumulation privilégiée dans les follicules. Des micelles de PEG-PCL<sub>2</sub> (architecture polymérique en Y) ont également montré leur intérêt pour les traitements antifongiques en permettant une meilleure pénétration du kétoconazole dans la peau par rapport à la crème commerciale Daktarin Gold Cream (4.5 fois), avec moins de perméation dans le compartiment récepteur<sup>141</sup>. L'accumulation folliculaire des NPs polymériques en fait de prometteurs vecteurs pour les traitements des pathologies associées aux follicules pilo-sébacés, et notamment l'acné. Des micelles de Pluronic® F127 ont par exemple permis une meilleure rétention de la substance active dans la peau par rapport à la formulation commerciale gel Benzamycin® (~3 fois), notamment en raison d'une accumulation des micelles dans les follicules pileux <sup>147</sup>. Une

meilleure pénétration de l'adapalène à partir d'une formulation de NPs polymériques (Tyrosphères®) par rapport à la formulation commerciale gel Differin® (~3 fois) a également été reportée <sup>100</sup>

### 1.2.3.3 Efficacité thérapeutique

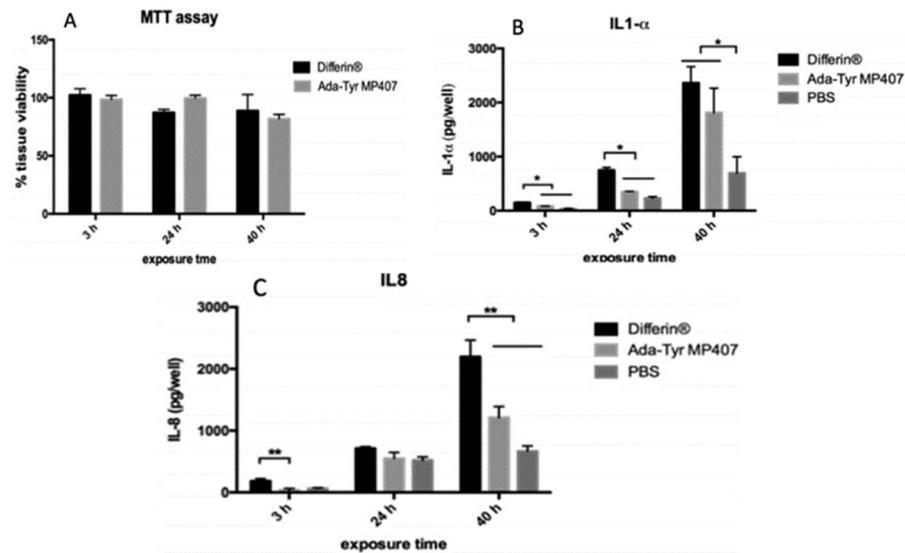
Il est attendu qu'une rétention plus importante des substances actives pharmaceutiques dans la peau permet d'améliorer l'efficacité thérapeutique des formulations. Néanmoins, cet effet final est plus rarement évalué puisqu'il nécessite très souvent des études animales *in vivo* ou cellulaire *in vitro*. Concernant les NPs polymériques, il a par exemple été rapporté que la meilleure pénétration de l'adapalène dans la peau et plus particulièrement dans les follicules à partir des Tyrosphères® a permis d'améliorer significativement l'activité comédolytique de la substance active par rapport à la formulation commerciale Differin®. *In vitro*, l'utilisation de Tyrosphères® encapsulant le paclitaxel a également permis d'améliorer l'effet anti-prolifératif de la substance active (diminution 45 % de l'IC50) <sup>139</sup>. Dans une autre étude, Zaric *et al.* ont montré que l'encapsulation d'ovalbumine dans des NPs de PLGA favorisait la prolongation de la réponse immunitaire des cellules T CD8+ après immunisation de souris *via* des microaiguilles (Figure 1.11 A) <sup>99</sup>.



**Figure 1.11** A) Pourcentage de cellules CD8+ proliférantes suivant la coculture avec cellules dendritiques présentes dans les ganglions lymphatiques drainants après 3, 4, 7, 14 ou 21 jours suivant l'immunisation avec des NPs blanches (b-NPs), des NPs chargées en ovalbumine (OVA-NPs) et l'ovalbumine seule. B) Pourcentage de cellules CD8+ proliférantes suivant la coculture avec cellules dendritiques présentes dans les ganglions lymphatiques drainants après immunisation avec les b-NPs, les OVA-NPs et l'ovalbumine seule, stockées 1 jour ou 4, 6, 10 semaines avec l'immunisation. n=3 répétitions. <sup>99</sup>

## 1.2.3.4 Réduction des effets secondaires

L'utilisation de NPs polymériques peut permettre un effet ciblé sur la peau limitant l'absorption systémique pouvant être responsable de nombreux effets secondaires. De plus, ces NPs permettent d'améliorer la rétention de la substance active dans la peau sans la nécessité d'utiliser des promoteurs chimiques d'absorption pouvant irriter la peau. Par exemple, les traitements topiques adaptés à l'acné sont principalement à base de rétinoïdes, mais l'utilisation de rétinoïdes est associée à d'importants effets secondaires (irritation, sécheresse, érythème), diminuant l'observance des patients au traitement, et donc son efficacité. Il est de plus nécessaire que la substance active soit retenue dans la peau, en raison des effets tératogènes liés à l'absorption systémique des rétinoïdes. Parmi ceux-ci, l'adapalène est un rétinoïde de 3<sup>e</sup> génération, mieux toléré sur la peau que les anciennes générations, mais qui est toujours responsable d'effets irritants importants. Son encapsulation dans des formulations polymériques sans alcools a donc été étudiée pour limiter les effets secondaires. Dans des études récentes de Ramezanli *et al.*, l'encapsulation de l'adapalène dans des micelles polymériques a permis de réduire l'irritation associée à ce principe actif, en comparaison à la formulation commerciale Differin® (**Figure 1.12**) en raison notamment d'une libération contrôlée permettant que toute la dose ne soit pas au contact direct de la peau <sup>100-101</sup>.



**Figure 1.12** A) % de viabilité tissulaire d'un épiderme reconstruit après traitement avec un gel de NPs d'adapalène (Ada-Tyr Mp407) et avec le gel commercial Differin®. B) Libération des cytokines pro-inflammatoires IL-1α et C) IL-8 à partir de l'épiderme traité avec les NPs, le gel commercial ou un tampon PBS \*P < 0.05, \*\*P < 0.01. <sup>101</sup>

## 1.2 Facteurs influençant la biodisponibilité dans la peau des nanoparticules et/ou des principes actifs à partir de systèmes particuliers

L'absorption cutanée est un des critères primordiaux définissant l'efficacité thérapeutique des formulations cutanées. Dépendamment du type de traitement à réaliser par le biais de NPs, différents effets de pénétration des substances actives et des NPs sont attendus. Pour un effet de surface, il est souhaité que les NPs et la substance active restent en surface et ne pénètrent pas la peau en profondeur. Au contraire, si la cible pharmacologique est présente dans les cellules de l'épiderme viable et du derme, une accumulation locale de la substance active dans la peau serait nécessaire, avec le moins de perméation possible. Dans ce cas la pénétration des NPs n'est pas nécessaire. Néanmoins, si par exemple le but est de la vaccination cutanée, la pénétration des NPs dans la peau et leur internalisation dans les cellules immunitaires seraient avantageuses en raison d'une possible effet immunologique « adjuvant ». Par ailleurs, si le but est de traiter une zone distincte de la peau (ex. les follicules), l'accumulation des NPs dans cette région est avantageuse pour la libération ciblée du principe actif. Enfin, si l'objectif est de délivrer un principe actif par voie transdermique pour un effet systémique, une perméation maximale de la substance active dans le sang est nécessaire. Il est néanmoins important de noter que la pénétration du vecteur dans la peau n'est pas souhaitée si le vecteur n'est pas biodégradable, en raison des effets toxiques (accumulation dans certains organes) pouvant apparaître.

Les méthodes d'évaluation de l'absorption cutanée sont notamment définies dans des recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE)<sup>148</sup> et du Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs (CSSC)<sup>149</sup>. Bien que reflétant au mieux les conditions réelles, les études *in vivo* d'absorption cutanée (sur peau humaine ou animale) sont assez rares en raison de critères éthiques, économiques et pratiques. Des alternatives *in vitro* utilisant des explants de peau ou encore de la peau reconstruite sont donc très souvent proposées. Les caractéristiques des différentes méthodes d'évaluation de l'absorption cutanée sont présentées dans le **tableau 1.4**. Il est à également à noter que l'OCDE et le CSSC préconisent d'étudier l'absorption cutanée de produits pharmaceutiques ou de cosmétiques sur la peau saine (dont l'intégrité a été démontrée); des modèles de peaux pathologiques sont toutefois également disponibles (voir partie 1.3.3.1 *Modèles de peaux pathologiques*).

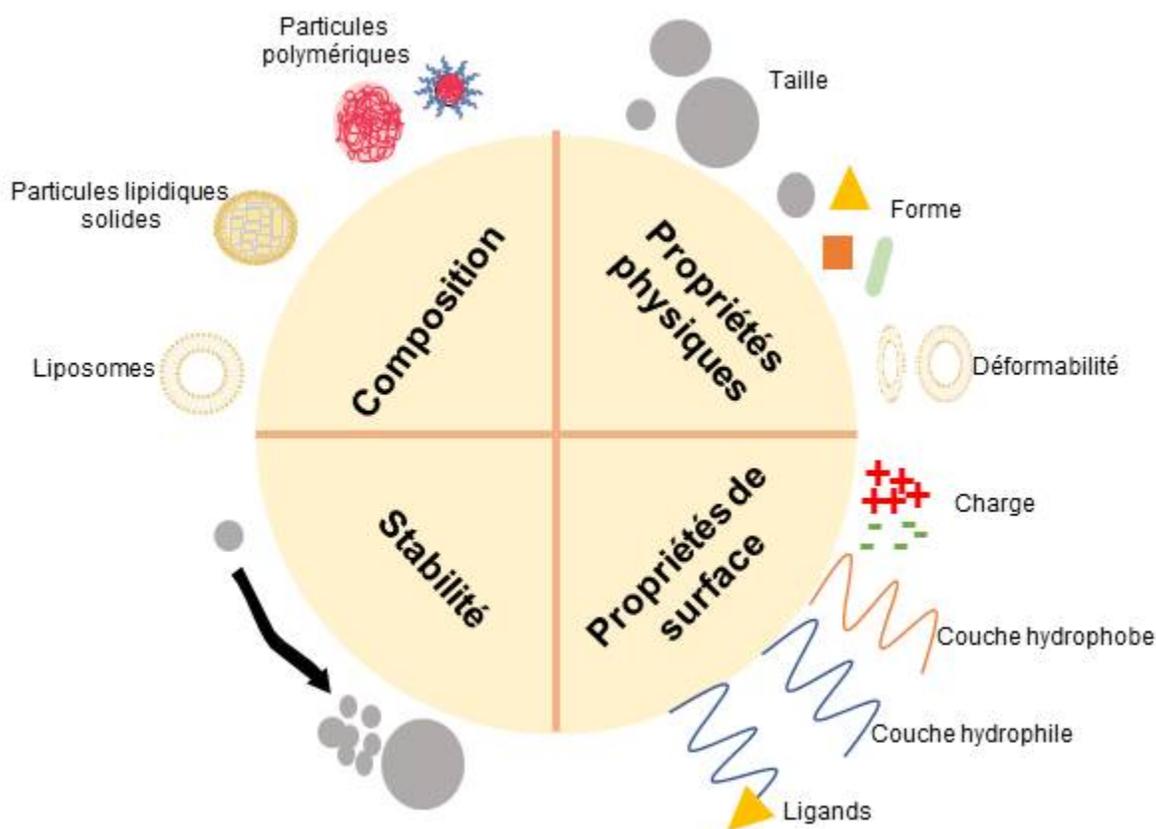
**Tableau 1.4** Variabilités des techniques d'évaluation de l'absorption/pénétration cutanée

	Modèle	<i>In vivo/In vitro</i>
<b>Technique</b>	Type de membrane	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peau humaine (« gold standard »)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ région abdominale ou poitrine</li> </ul> </li> <li>• Peau de porc (similarités avec la peau humaine)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ région auriculaire, flanc, dos</li> </ul> </li> <li>• Peau de rongeur, avec ou sans poils (plus perméable, mais modèle <i>in vivo</i>)                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ région dorsale ou ventrale</li> </ul> </li> <li>• Peau/Épiderme reconstruit (Epiderm®, Episkin®...) (plus perméable et ne possédant pas toutes les caractéristiques de la peau, notamment les annexes cutanées)</li> <li>• Membrane artificielle polymérique/lipidique (uniquement recommandée pour étudier la diffusion passive à travers une membrane)</li> </ul>
	Conditions de la peau (test <i>in vitro</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peau entière                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ peau viable (préférée) ou non viable (si intégrité démontrée, plus de reproductibilité)</li> <li>○ peau perfusée ou non</li> </ul> </li> <li>• Peau dermatomée (200-400 µm)</li> <li>• Membrane épidermale</li> <li>• Membrane de SC</li> </ul>
<b>Conditions d'application</b>	Diffusion en conditions statiques ou en flux	
	Caractéristiques physico-chimiques de la molécule/NP à tester	
	Forme galénique, présence d'additifs	
	Occlusion ou non	
	Durée	
<b>Méthode de dosage</b>	Dose appliquée (fine ou infinie)	
	Quantitative	<i>In vivo</i> : « tape stripping », biopsie microdialyse, dosage pharmacocinétique, <i>In vitro</i> : « tape stripping », dosage de la peau entière, dosage des différentes couches, cinétique d'absorption/perméation
	Qualitative	Visualisation par imagerie

Cette partie traite d'exemples de pénétration cutanée liés à tout type de nanovecteurs dans le but de détailler les facteurs influençant la biodisponibilité dans la peau des NPs et/ou des principes actifs à partir de systèmes particuliers. Il est à noter que la grande diversité des méthodes d'évaluation de l'absorption cutanée (*in vivo/in vitro*, type de peau, conditions d'applications, méthode de dosage (**Tableau 1.4**)), est un facteur pouvant expliquer la variabilité des tendances de pénétration proposées en fonctions des différents facteurs étudiés.

### 1.3.1 Facteurs relatifs aux propriétés des nanoparticules

Selon leurs propriétés physico-chimiques, les NPs interagissent différemment avec la barrière cutanée, conditionnant ainsi leur pénétration et la diffusion des substances actives encapsulées (**Figure 1.13**).



**Figure 1.13** Propriétés physico-chimiques des NPs pouvant influencer l'absorption cutanée

### 1.3.1.1 Propriétés physiques

#### 1.3.1.1.1 Taille

La taille des NPs est un paramètre essentiel contrôlant les interactions possibles entre l'organisme et les NPs assurant donc la biodistribution des NPs<sup>150-151</sup> et celles des substances actives encapsulées dans les différents organes. De plus, la taille des particules influence également la pénétration dans les tissus<sup>152-153</sup>, la diffusion dans des milieux physiologiques<sup>154</sup>, tout comme l'endocytose dans les cellules<sup>155</sup>.

Concernant le tissu cutané, la taille des particules influence leur biodistribution et celle des substances actives encapsulées en gouvernant à la fois la voie d'entrée dans la peau et la profondeur de pénétration. En effet, les espaces intercornéocytaires de tailles réduites (généralement  $\leq 100$  nm) et remplis de lipides densément structurés limite l'absorption des substances exogènes dans les couches viables de la peau, notamment celles dont la masse molaire est supérieure à 500 Da.

Des nombreuses évidences ont ainsi montré que les NPs solides traversent difficilement la barrière cutanée du SC humain par la voie intercellulaire si leurs dimensions du cœur solide sont supérieures à 20 nm. Campbell *et al.* ont par exemple reporté que des NPs de 20-200 nm fluorescentes, à base de polystyrène (PS), infiltraient uniquement les couches desquamantes de la peau de porc (*in vitro*)<sup>156</sup>. Au contraire, des NPs métalliques de taille inférieure à 10 nm pouvaient pénétrer le SC humain et occasionnellement l'épiderme viable, avec une accumulation également présente dans les follicules pileux (test *in vitro*)<sup>157</sup>. Dans une autre étude, des *quantum dots* de diamètre hydrodynamique<sup>iii</sup> allant de 15 à 45nm ont été retrouvés dans les couches épidermales viables et dans le derme de peau de porc après application *in vitro*<sup>159</sup>. Sur peau de rongeur, plus perméable, une dépendance taille-taux de perméation a été mise en évidence pour des NPs d'or (15, 102 et 198 nm), avec notamment une absence de temps de latence pour les NPs de 15 nm (test *in vitro*)<sup>160</sup>. Une dépendance taille-profondeur de pénétration a, cette fois-ci, été retrouvée pour des NPs de TiO<sub>2</sub> *in vivo* sur peau de souris glabre. Il a été démontré que des NPs de 4 et 60 nm traversaient le SC, mais que seulement les NPs de

---

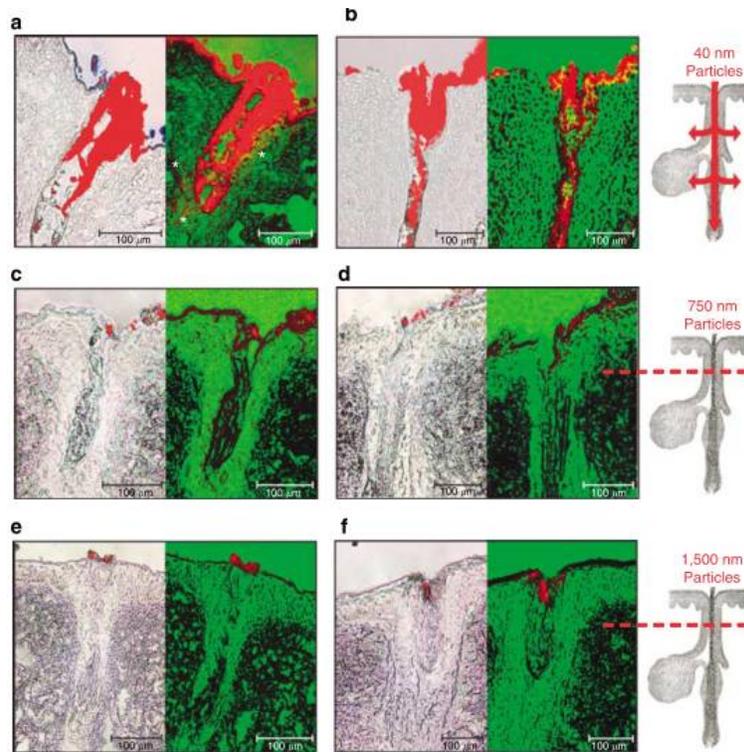
<sup>iii</sup> Le diamètre hydrodynamique correspond à la taille du cœur de la particule et de sa couronne hydratée (158) Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, 235, 337-351

taille 4 nm atteignaient la couche basale de l'épiderme <sup>161</sup>. Néanmoins, aucune pénétration n'a été démontrée *in vitro* <sup>161</sup>.

La pénétration et l'accumulation des NPs dans les follicules (diamètre 15-120 µm) est une alternative à la pénétration intercellulaire. Les premières évidences de pénétration folliculaire ont été rapportées par Schaefer *et al.*, qui ont établi que des particules polymériques de 3 à 10 µm pénétraient les conduits folliculaires tandis que celles de taille supérieure à 10 µm restaient à la surface de la peau. Les particules caractérisées par une taille inférieure à 3 µm étaient distribuées à la fois dans follicules et dans le SC <sup>162</sup>. Des résultats similaires ont également été obtenus par Rolland *et al.* <sup>163</sup>. Il a par la suite été mis en évidence que la profondeur et la quantité de particules pénétrant dans les follicules dépendaient de la taille de particules. En comparant des microsphères de tailles comprises entre 0,75 µm et 6 µm, il a été remarqué *in vitro* que les microsphères de taille moyenne (1,5 µm) permettaient d'atteindre un maximum de pénétration dans les follicules de peau humaine (> 2300 µm après traitement par colle cyanoacrylate) <sup>164</sup>. Dans une autre étude du même groupe, il a été remarqué que la profondeur de pénétration dans les follicules d'oreille de porc après un massage de 3 minutes augmentait lorsque la taille des NPs de PLGA ou de silice augmentait (entre 122 et 646 nm) jusqu'à atteindre un maximum de pénétration de particules de taille 1400 µm (test *in vitro*). La profondeur de pénétration était néanmoins diminuée pour des particules de tailles supérieures à 646 nm. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les follicules agissaient comme un système de pompage *in vivo*, favorisant la pénétration des particules de diamètre similaire aux cellules de kératine; le massage reproduisant cet effet *in vitro* <sup>165</sup>. La voie folliculaire ne doit cependant pas uniquement être associée aux « grosses » particules. En effet, il a été également montré *in vitro* dans d'autres études que l'accumulation des particules dans les follicules était plus importante lorsque les particules étaient de très faible taille (20 et 40 nm) <sup>91, 93</sup>.

Différentes zones d'intérêt pharmaceutiques étant réparties à différentes profondeurs dans les follicules (*infundibulum*, glandes sébacées, et bulge), de telles relations entre la taille et la profondeur de pénétration mettent en évidence la possibilité de cibler spécifiquement certaines régions dépendamment de la taille des particules utilisées. Par exemple, Vogt *et al.* ont démontré par des études de pénétration sur peau humaine préalablement traitée par colle cyanoacrylate, pour ouvrir les follicules, que des NPs de polystyrène de 40 nm pénétraient profondément les

follicules, migraient dans l'épiderme viable à partir des follicules et pouvaient être internalisées dans des cellules de Langherans, contrairement aux particules de 750 et 1500 nm. Une telle pénétration dans les cellules épidermales par la voie folliculaire souligne la possibilité de vaccination transcutanée<sup>93</sup>. L'effet de la taille des particules sur la pénétration dans les follicules est illustré dans la **figure 1.14**<sup>93</sup>.

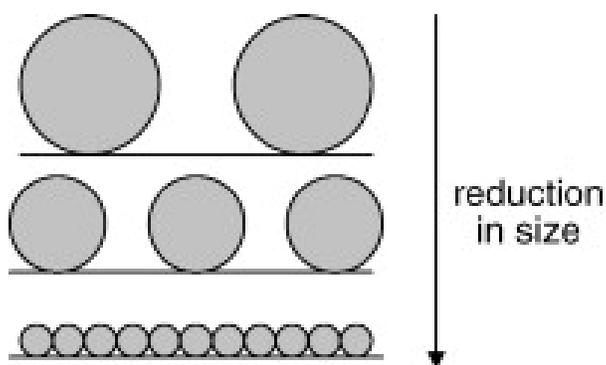


**Figure 1.14** Pénétration de NPs fluorescentes de polystyrène de différentes tailles *via* le follicule pileux (peau prétraitée par colle cyanoacrylate)<sup>93</sup>.

La taille des NPs a également une influence importante sur l'absorption des substances actives encapsulées. Shim *et al.* ont montré sur peaux de rongeur *in vitro* que des NPs de PCL-PEG de 40 nm augmentaient la rétention dans la peau et la perméation du minoxidil encapsulé en comparaison à des particules de 130 nm. L'effet de la taille n'ayant pas été observé sur peau de rongeur glabre, la contribution de la voie folliculaire semble favoriser la perméation<sup>110</sup>. Une meilleure pénétration dans le SC humain de fluorophores hydrophiles et lipophiles à partir de liposomes a également été observée lorsque la taille des liposomes diminuait (test *in vitro*)<sup>166</sup>. Une légère augmentation de la rétention du rouge de Nil dans la peau de porc (*in vitro*) a aussi été remarquée à partir de nanocapsules lipidiques lorsque la taille diminuait (60, 90 et 185 nm),

mais de manière non statistiquement significative <sup>167</sup>. Au contraire, une autre étude a montré que le fluorophore rouge de Nil était plus efficacement transféré dans le *SC* à partir de vecteurs polymériques de PCL quand leur taille augmentait (90, 260 et 630 nm).

Il a également été rapporté que les propriétés occlusives des particules étaient dépendantes de la taille des particules <sup>168-169</sup> avec une capacité d'occlusion 15 fois plus importante pour des NPs que des microparticules <sup>168</sup> (**Figure 1.15**). Ainsi même si les NPs restent à la surface de la peau, leur taille peut jouer sur l'occlusion de la peau et favoriser l'absorption des substances actives comme cela a été rapporté pour les SLN <sup>79</sup>.



**Figure 1.15** A un contenu de lipidique identique, la réduction de la taille des NPs augmente le nombre de NPs. Le film de NPs devient plus dense, augmentant ainsi le facteur d'occlusion. <sup>170</sup>

#### 1.3.1.1.2 Forme

Depuis une dizaine d'années, l'utilisation de formes particulières atypiques (cylindres, pyramides, cubes, disques...) connaît un essor remarquable dans un contexte médical et pharmaceutique. C'est ainsi que les études s'intéressant aux effets de la forme des objets sur leurs performances biologiques se sont récemment accumulées dans les dix dernières années. Les vecteurs de formes non sphériques ont montré qu'ils possédaient des propriétés de biodistribution distinctes de celles des sphères pouvant impacter leur intérêt thérapeutique (temps de résidence dans le sang <sup>171</sup>, ciblage des différents organes <sup>150</sup>, cytotoxicité <sup>172</sup>, internalisation cellulaire <sup>173</sup>). L'orientation initiale de la particule, l'aire de contact, la courbure de la particule au contact et la capacité des membranes à se courber autour des particules sont autant de facteurs gouvernant les interactions entre les particules de différentes formes et les bicouches lipidiques des membranes cellulaires, comme déterminé par le biais de simulations informatiques <sup>174-175</sup> ou expérimentalement <sup>176</sup>.

Pour la voie cutanée, la forme des particules est souvent citée comme paramètre influençant la pénétration, bien que les études évaluant ce paramètre soient rares. Les rares études ont été uniquement effectuées sur des particules dures métalliques et souvent d'un point de vue toxicologique<sup>159, 177-181</sup>. Il a notamment été montré que les formes cylindriques étaient plus profondément absorbées dans la peau humaine et de souris (*in vitro* et *in vivo*) que les formes sphériques classiques ou que des formes triangulaires<sup>177-178</sup>. Néanmoins, une autre étude a indiqué que, quelle que soit la forme de NPs d'or (cylindrique ou sphériques), il n'y avait pas de pénétration dans une peau humaine non lésée (*in vitro*)<sup>181</sup>. Des particules *quantum dots* cunéiformes (« *nail-shaped* ») ont également été étudiées<sup>180</sup>.

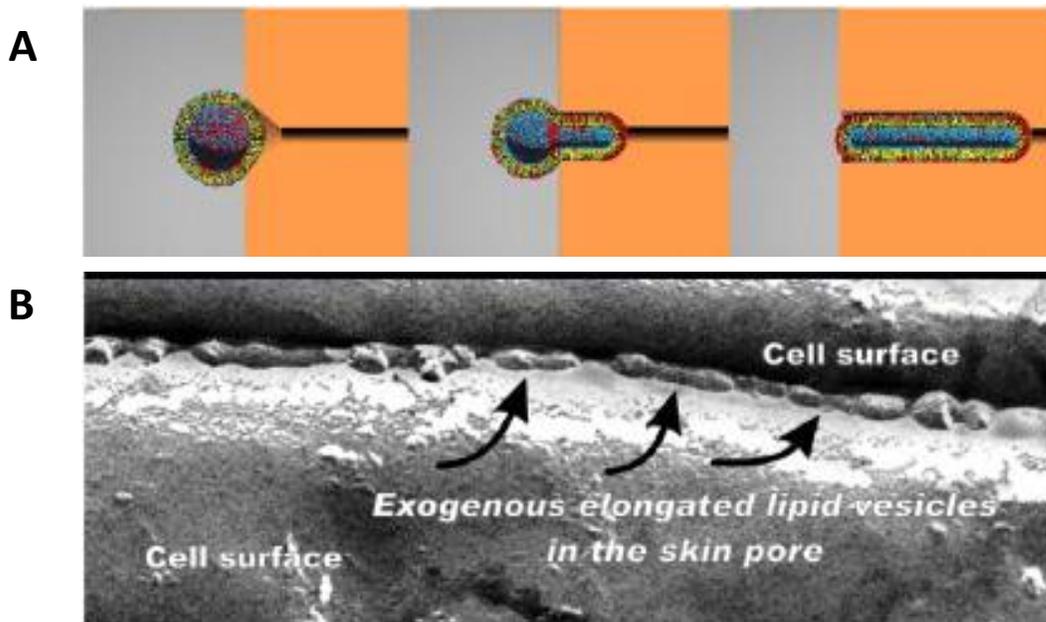
À ce jour et à notre connaissance, l'influence de la forme des NPs pour des applications de délivrance de médicaments par la voie cutanée n'a encore jamais été étudiée.

#### 1.3.1.1.3 Déformabilité des particules molles

Puisque la pénétration dans les tissus, et notamment la peau, est limitée par la taille des objets, une déformabilité des particules à la suite d'un stress mécanique pourrait aider à traverser les barrières. En effet, il a par exemple été montré que des nanocapsules déformables de taille supérieure à 200 nm étaient capables de traverser des membranes en polycarbonate avec une taille de pore de 50 nm<sup>182</sup>. Dans une autre étude, des polymersomes très hydratés par une surface de poly(2-(méthacryloyloxy)éthyl phosphorylcholine) (PMPC) pouvaient pénétrer des membranes hydrophiles dont la taille de pores était un ordre de grandeur inférieure à leur taille<sup>183</sup>. De plus, différentes études ont montré que le temps de circulation de nanogels dans le sang dépendait de leur dureté<sup>184-185</sup>; les plus flexibles ayant un temps de résidence plus long en raison d'une accumulation moins importante dans la rate lors du processus de filtration<sup>185</sup>.

Pour favoriser le passage dans la peau, la déformabilité des particules a notamment été étudiée avec des vésicules de type Transferosome®, développées par Gregor Cevc *et al.* dans les années 1990<sup>186</sup>. Ces liposomes sont plus flexibles que les liposomes classiques en raison de la présence de tensioactifs (cholate de sodium, polysorbates) dans les bicouches lipidiques pouvant se placer préférentiellement dans les régions liposomales très courbées suite à un stress mécanique<sup>60</sup>. Une telle déformabilité leur permet de traverser le SC plus facilement que des vésicules rigides<sup>187-189</sup>. Par exemple, il a été montré que des liposomes élastiques intacts étaient capables

d'atteindre la jonction entre le SC et l'épiderme viable alors que des vésicules rigides étaient uniquement retrouvées dans les couches superficielles du SC et fusionnaient avec les bicouches lipidiques dans les couches superficielles du SC humain (test *in vivo*)<sup>188</sup>. Il a été suggéré que la force motrice à la pénétration de ces vésicules déformables était la présence d'un gradient d'hydratation dans la peau (passage d'un environnement à environ 20 % d'eau à la surface de la peau à des régions très hydratées (80 % d'eau) dans l'épiderme viable). Les vésicules, très hydrophiles sont ainsi poussées à suivre le gradient osmotique transépidermique, à travers des canaux hydrophiles dans les domaines intercellulaires<sup>190-191</sup> (**Figure 1.16**).



**Figure 1.16** Déformabilité des Transfersomes®. A) Simulation informatique de la pénétration dans des pores de vésicules déformables (en rouge, distribution du tensioactif dans la vésicule). B) Image de microscopie électronique de vésicules déformables allongées dans des pores aqueux intercornéocytaires de stratum corneum humain après déposition des vésicules sur la peau<sup>9</sup>

D'autres études ont également montré que des polymersomes pouvaient se déformer, facilitant ainsi leur passage dans le SC humain (tests *in vitro*)<sup>138, 183</sup>. Une surface très hydrophile de PMPC permettait notamment de favoriser la déformation des polymersomes dans des nanopores hydrophiles, contrairement à une surface moins hydratée de PEO qui aboutissait à la rupture des vésicules dans les pores. Ainsi les polymersomes avec une surface de PMPC s'accumulaient et pénétraient plus la peau humaine que ceux de PEO et permettent de délivrer dans la peau jusqu'à

70 % de la dose de dextrane déposée contre 5 % pour le dextrane non encapsulé (test *in vitro*)<sup>183</sup>. Les propriétés déformables des particules polymériques chargées en lipides<sup>192</sup> et de nanocapsules<sup>182</sup> ont également été utilisées pour favoriser le passage de substances actives dans la peau.

#### 1.3.1.2 Propriétés de surface

Avec la taille et la forme, les propriétés de surface des NPs sont des paramètres contrôlant les interactions entre les objets nanométriques et les entités biologiques à leur contact<sup>193-195</sup>.

L'effet de la surface des NPs a été largement étudié dans le domaine de l'administration intraveineuse, car l'efficacité des NPs est souvent relative à ses interactions avec le milieu biologique (temps de résidence dans le sang, interactions cellulaires, interactions avec les protéines ...). Par exemple, une charge de surface cationique de NPs favorise leur translocation dans les cellules, contrairement aux particules neutres ou anioniques, en raison de leur habilité à se lier aux composants anioniques des membranes cellulaires. Néanmoins, des effets toxiques peuvent également apparaître en raison des charges cationiques<sup>193</sup>. D'autre part, pour des traitements par voie intraveineuse, la présence d'un recouvrement hydrophile à la surface des particules (comme le PEG) évite leur opsonisation et leur reconnaissance, étendant ainsi leur temps de résidence dans la circulation sanguine<sup>75-76</sup>. Une meilleure diffusion<sup>196-198</sup> et stabilité de NPs<sup>199-201</sup> dans des milieux biologiques ont également été reportées lorsque les NPs étaient recouvertes d'une telle surface polymérique hydrophile. Par ailleurs, la présence de ligands spécifiques à la surface des particules peut favoriser le ciblage des cellules à traiter<sup>202</sup>.

Pour la voie cutanée, l'effet de la surface des NPs a été moins expérimenté puisque les NPs testées sont souvent déposées à la surface d'une peau intacte, c'est-à-dire sur le *SC* qui est une couche de cellules mortes. Les NPs, dans ce cas, pouvant rarement atteindre les couches viables, leurs interactions avec les milieux biologiques sont souvent négligées. Pourtant, de nombreuses interactions peuvent intervenir en fonction de la chimie de surface et notamment dans des cas où l'absorption des NPs dans les couches viables de la peau peut être facilitée.

#### 1.3.1.2.1 Charge de surface

La charge de surface des nanoformulations est souvent caractérisée par le potentiel Zêta,  $\zeta$  (ZP) ou potentiel électrocinétique déterminé par la diffusion électrophorétique de la lumière (ELS, « electrophoretic light diffusion » en anglais. Le potentiel Zêta n'est pas une mesure directe de la charge à la surface des NPs et est affecté par les caractéristiques de la phase dispersante, notamment le pH et la force ionique. Cela reste néanmoins une indication de la stabilité colloïdale des nanosuspensions. En effet, un potentiel très négatif ou positif des NPs indique que les suspensions pourront être stabilisées par des répulsions électrostatiques entre les NPs. Néanmoins, un potentiel zêta proche de la neutralité n'est pas nécessairement synonyme de déstabilisation. En effet, des polymères non chargés adsorbés ou liés de manière covalente à la surface peuvent rendre le potentiel zêta proche de la neutralité, mais assurer une bonne stabilité des suspensions en raison des répulsions stériques, comme c'est le cas du PEG. De plus, les NPs avec un potentiel élevé peuvent ne pas être stables en milieu physiologique en raison de la présence d'espèces salines venant neutraliser les charges et diminuer les répulsions électrostatiques.

Pour la voie cutanée, l'influence de la charge de surface des nanoformulations, a été explorée à la fois sur l'absorption dans la peau /perméation dans le récepteur des substances actives véhiculées ou des NPs elles-mêmes. Néanmoins, comme détaillé dans le **tableau 1.5** suivant, les résultats obtenus sont contradictoires et à ce jour aucun consensus n'a été défini. Concernant l'absorption cutanée des substances actives, il semble que la présence de charges à la surface des particules favorise l'absorption des substances actives et ce quel que soit le type et la composition des particules. Néanmoins, l'influence du signe de la charge (positif ou négatif) n'est pas claire. Des études ont montré qu'une charge de surface positive favorisait l'absorption/perméation des molécules dans la peau et ont expliqué ce phénomène par l'attraction électrostatique entre les particules cationiques et la peau chargée négativement à pH physiologique<sup>203</sup>. Au contraire, d'autres études ont rapporté une meilleure pénétration à partir des particules anioniques, avec dans ce cas diverses hypothèses pour expliquer ce phénomène venant à l'encontre des principes électrostatiques. Concernant la pénétration des NPs elles-mêmes, les résultats obtenus sont également très variables, et ce pour de mêmes types de

particules (Or). Les différentes hypothèses pour expliquer ces résultats sont reportées dans le **tableau 1.5**.

De telles variabilités dans les résultats obtenus peuvent s'expliquer par la variabilité des systèmes comparés dans les études et par les moyens utilisés pour faire varier les charges de surface. En effet, des changements de composition, d'hydrophilie, de répulsion stériques, et l'ajout de tensioactifs promoteurs d'absorption peuvent fortement influencer l'absorption des substances actives et/ou les propriétés des particules étudiées comme la taille, l'encapsulation ou la libération.

**Tableau 1.5** Effet de la charge de NPs sur la pénétration d'un principe actif encapsulé ou la pénétration des NPs

Type de particule (molécule encapsulée)/ type de peau	Meilleure pénétration en fonction de la charge			Hypothèses émises	Réfs
	Positive	Neutre	Négative		
NPs de PS et PLA (fluorophore) <i>In vitro</i> peau de porc	✗			Affinité des particules cationiques pour la surface négative de la peau (Accumulation visible à l'œil nu de ces NPs à la surface)	204
Nanocapsules de PCL (avec ou sans chitosane) (benzophénone-3) <i>In vitro</i> peau de porc	✗ (SC)		✓	-	205
Nanocapsules (Coenzyme Q10) <i>In vitro</i> peau de rongeur	✗			Interactions du polymère positivement chargé avec la peau négativement chargée	206
NPs d'éthylcellulose (Rouge de Nil et betaméthasone) <i>In vivo</i> oreille souris			✗	Plus d'accumulation des particules anioniques sur une peau inflammée (pas de différence sur peau saine), expliquée par une acidification de la peau liée à l'inflammation. Néanmoins, même efficacité thérapeutique pour particules anioniques et cationiques.	207
Liposomes de PC (betaméthasone/ betaméthasone dipropionate) <i>In vitro</i> peau de porc			✗	-	208
Liposomes de PC (trétinoïne) <i>In vitro</i> peau de porc	✓		✗	Formation de paires d'ions entre la stéarylamine cationique et la trétinoïne.	105
Liposomes de PC (Amphotéricine B) <i>In vitro</i> peau de rat	✗ (SC)		✗ (épiderme)	Liposomes cationiques interagissent avec les surfaces cellulaires négatives de la peau. Les liposomes anioniques sont plus petits et pénètrent plus profondément	209
Liposomes déformables de PC, (impératorine) <i>In vitro</i> peau de rat	✓			Interactions des liposomes cationiques avec les lipides anioniques de la peau et effet promoteur d'absorption des tensioactifs cationiques (extraction lipides)	189
Liposomes déformables de PC (méloxicame)	✓		✓	Les tensioactifs chargés utilisés ont un effet promoteur d'absorption (extraction de lipides) et augmentent la déformabilité des liposomes (par rapport aux liposomes neutres)	210

<i>In vitro</i> peau serpent				
Liposomes de DPPC (acyclovir et minoxidil)	✓			Interactions des liposomes recouverts d'une surface polymérique cationique avec les charges négatives de la peau
<i>In vitro</i> oreille de porc				
Liposomes de lécithine (ethosuximide/betahistidine)		✓		Diffusion plus rapide des liposomes anioniques dans la peau
<i>In vitro/In vivo</i> peau de rat				
Dendrimère de poly(amidoamine)		✓		Les dendrimères cationiques sont internalisés dans les cellules de la peau, en raison d'interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires négativement chargées, donc pénètrent moins le récepteur
<i>In vitro</i> peau porc				
NPs de latex			✓	Forces répulsives entre particules anioniques et lipides de la peau négativement chargés permettant l'ouverture temporaire de canaux
<i>In vitro</i> peau porc				
NPs d'or PEGylées ou non		✗		PEG utilisé pour recouvrir les NPs modifie l'organisation du SC. L'ajout de lipides cationiques à la surface favorise les interactions avec les lipides anioniques de la peau
<i>In vitro</i> peau rat				
NPs d'or PEGylées	✗			Interactions des particules cationiques avec les cellules
<i>In vitro</i> peau humaine/rat				
Nanocylindres d'or			✗ ✓	Les interactions électrostatiques entre les NPs positives et la peau négativement chargée ralentissent leur diffusion
<i>In vitro</i> peau souris				
Nanocylindres d'or		✗		La présence de nombreux follicules (et du sébum) agit comme barrière au mouillage de la peau par les particules hydrophiles chargées
<i>In vitro</i> peau humaine				
QD	✓			La comparaison de deux types de QD cationiques (plus ou moins de charges) a montré que trop de charges cationiques défavorisent la pénétration.
<i>In vitro</i> peau porc				

✗ absorption des substances actives dans la peau / ✗ absorption des NPs dans la peau

✓ perméation des substances actives dans le compartiment récepteur / ✓ perméation des NPs dans le compartiment récepteur

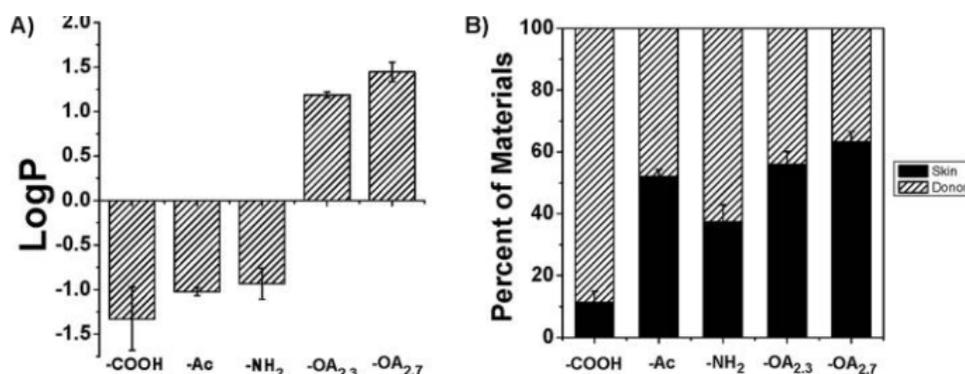
(SC) : accumulation préférentielle dans le stratum corneum, (épiderme) : accumulation préférentielle dans l'épiderme

PC : Phosphatidylcholine, DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

### 1.3.1.2.2 Hydrophobie/hydrophilie de surface

L'hydrophobie de la surface des NPs semble également avoir un effet sur l'absorption cutanée des NPs et ses interactions avec les différentes couches de la peau, puisqu'il est attendu que les NPs lipophiles aient plus d'affinités pour les milieux lipidiques (sébum, *SC*) tandis que les NPs hydrophiles pourraient s'accumuler plus facilement dans les milieux hydrophiles (couches viables de la peau). Mu *et al.*, ont notamment examiné les interactions de NPs de différentes surfaces avec une monocouche lipidique et ont montré que le taux de pénétration des NPs à travers la monocouche augmentait en augmentant l'hydrophobie de la surface <sup>219</sup>.

Néanmoins, seules de rares études ont réellement évalué l'influence de ce paramètre sur l'absorption cutanée de NPs. Par exemple, il a été remarqué que l'efficacité de pénétration dans la peau de porc de dendrimères de polyamidoamine (PAMAM) dépendait de leur hydrophobie (test *in vitro*). En effet, les dendrimères recouverts d'acide oléique, qui tend à augmenter leur hydrophobie ( $\log P = 1$ ), pénètrent plus la peau que les dendrimères nus hydrophiles ( $\log P = -1$ ), avec respectivement 60 et 40 % de pénétration (**Figure 1.17**) <sup>213</sup>.



**Figure 1.17** A) LogP de dendrimères en fonction des terminaisons de surface (COOH, acétyl, NH<sub>2</sub>, et acide oléique). B) Distribution des dendrimères entre la formulation et la peau selon le log P. <sup>213</sup>

Un tel effet promoteur a également été remarqué par Iannuccelli *et al.* Les auteurs ont montré que des NPs hydrophiles de silice, recouvertes d'une surface hydrophobe d'acide stéarique, pénétraient en plus grande quantité les couches profondes du *SC* de volontaires humains que les NPs nues, et ce, bien que la taille soit plus importante (360 et 160 nm pour les particules hydrophobes et hydrophiles, respectivement). Il a d'ailleurs été avancé que les NPs hydrophobes favorisaient la voie lipidique transépidermique plutôt que la voie folliculaire puisque plus de

pénétration a été obtenue pour les NPs hydrophobes dans les zones peu pourvues de follicules <sup>220</sup>. Néanmoins, dans une autre étude, Mahmoud *et al.* ont remarqué que des nanocylindres d'or s'accumulaient plus dans les follicules de peau humaine (*in vitro*) quand ils étaient recouverts de polystyrène hydrophobe tandis qu'une surface hydrophile de PEG favorisait la pénétration dans toutes les couches de la peau et notamment dans le derme hydrophile <sup>217</sup>. Une meilleure accumulation dans les follicules pileux a également été reportée *in vitro* lorsque des NPs de PLGA-chitosane étaient recouvertes d'une surface de phospholipides (DPPC ou DPPC : DOTAP), bien que sur peau humaine *in vivo* l'amélioration n'était pas significative <sup>221</sup>.

Tout comme l'effet de la charge des NPs, aucune tendance évidente ne peut être dressée pour rationaliser l'effet de l'hydrophobie de surface des nanoformulations sur l'absorption des substances actives. Néanmoins, en plus du caractère hydrophile/lipophile de surface, ces différences d'absorption semblent vraisemblablement dépendre des propriétés des matériaux à leur surface. En effet, il a par exemple été montré qu'un revêtement de surface lipophile d'acide oléique sur des particules de PLGA-Chitosane favorisait l'absorption *in vivo* sur peau de rat du kétoprofène encapsulé en raison de l'effet promoteur d'absorption de l'acide oléique <sup>222</sup>. Au contraire, une meilleure pénétration de la quercétine a été observée sur peau de souris (*in vitro*) lorsque des liposomes étaient recouverts d'une surface hydrophile de chitosane-acide hyaluronique ; l'acide hyaluronique favorisant théoriquement l'hydratation du SC en raison de propriétés de rétention d'eau <sup>223</sup>.

#### 1.3.1.3 Stabilité

Lors des études de pénétration cutanée, les NPs sont souvent caractérisées par leur distribution de taille dans le véhicule, *i.e.* avant l'application de la formulation sur la peau. La stabilité colloïdale des NPs en suspension sur la peau et/ou au contact direct de la peau, est donc très souvent négligée lors de l'interprétation des résultats de pénétration cutanée. Pourtant, de nombreuses évidences ont montré que l'instabilité des particules au contact des milieux physiologiques (présence de sels, de protéines), dépendante notamment de la chimie de surface des NPs, pouvait altérer les effets biologiques des NPs. En effet, l'agrégation des particules en milieu biologique modifie le nombre de particules disponibles pour les interactions avec les

membranes et la pénétration cellulaire/tissulaire. De plus, une agrégation dans les cellules ou tissus peut également donner lieu à des effets cytotoxiques inattendus <sup>199, 224-225</sup>.

Labouta *et al.* ont remarqué une agrégation de NPs d'or sur la peau humaine viable (*in vitro*) lorsque celles-ci étaient dispersées dans de l'eau, tandis qu'une telle agrégation n'a pas été observée sur la peau lorsque les NPs d'or étaient dispersées dans du toluène. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette agrégation était le résultat d'un échange des ions citrates à la surface des NPs avec les lipides/protéines. Cette agrégation dans l'eau a été corrélée à une pénétration des particules uniquement dans le SC pour les NPs dispersée dans l'eau, alors que les NPs dans le toluène (non-agrégées) pénétraient plus profondément la peau. Un effet déstabilisant de la barrière cutanée du toluène a néanmoins également été reporté pour expliquer ces résultats <sup>226</sup>. Une agrégation de nanocylindres d'or sur la peau humaine (*in vitro*) a également été montrée par Mahmoud *et al.*, et expliquée par l'adsorption de protéines provenant du derme de la peau sur les NPs <sup>227</sup>. L'agrégation des particules a été réduite par l'ajout d'une couche de PEG à la surface des NPs <sup>226</sup>, favorisant ainsi la déposition des NPs dans les couches profondes de la peau <sup>217</sup>. Dans une autre étude, Rancan *et al.* ont remarqué que l'agrégation des NPs de SiO<sub>2</sub> dans un tampon phosphate salin réduisait l'internalisation des NPs *in vitro* dans les cellules épidermales ainsi que l'absorption cutanée, notamment si la taille des agrégats était supérieure à 200 nm <sup>224</sup>.

### **1.3.2 Facteurs relatifs à l'application des NPs sur la surface cutanée**

La méthode d'administration des NPs influence également leur biodisponibilité dans la peau ainsi que celle des substances actives à délivrer. En effet, les NPs nécessitent d'être formulées (crème, gel, etc.) pour être déposées facilement sur la peau et les excipients des formulations peuvent moduler l'absorption cutanée. De plus, la méthode d'application (massage, etc.) ou l'utilisation combinée de méthodes physiques de promotion de pénétration affectent également le devenir des nanovecteurs dans la peau.

#### **1.3.2.1 Véhicule**

La majorité des formulations de nanovecteurs testées sur la peau sont des suspensions aqueuses non visqueuses. Cependant, les suspensions liquides ne sont pas appropriées dans des conditions *in vivo* puisque le liquide s'écoule sur la peau. Ainsi, pour maximiser le contact entre la formulation et la zone d'intérêt de la peau, il est donc nécessaire d'incorporer les nanovecteurs

dans des formulations semi-solides <sup>127, 139, 222, 228-232</sup>, des mousses <sup>233</sup> des patchs <sup>234</sup>, ou encore des textiles <sup>235</sup>.

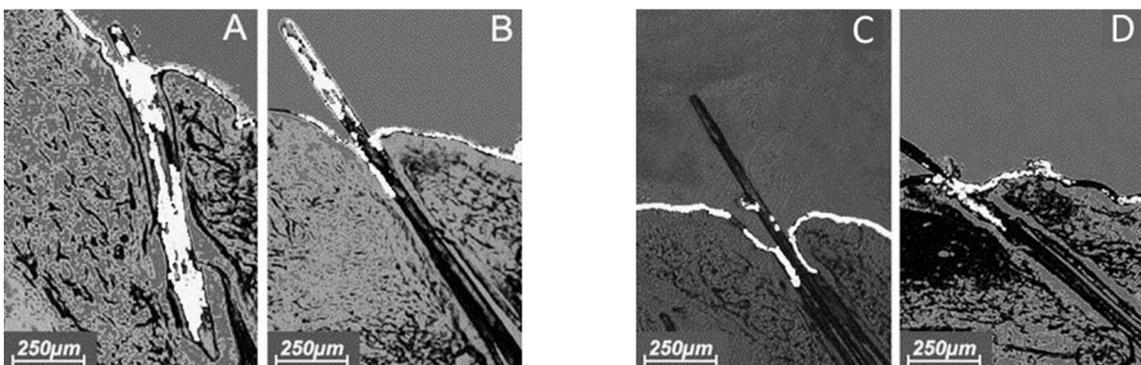
Boisgard *et al.* ont étudié l'influence de l'incorporation de NPs de PLA dans différentes formulations semi-solides sur l'absorption cutanée *in vitro* d'un fluorophore. L'incorporation des NPs dans une émulsion eau/ huile les a déstabilisées tandis que les formulations gels aqueuses à base de dérivé de cellulose ou de carraghénanes n'ont pas altéré leur structure. Bien que non statistiquement significative, une nette diminution de la perméation du fluorophore dans le liquide récepteur et de la pénétration dans des explants de peau de rat saine ou inflammée (jusqu'à 2.5 fois) a été observée pour les formulations de NPs gel en comparaison à la formulation de NPs aqueuse liquide <sup>127</sup>, certainement en raison d'une diffusion des NPs plus faible dans le gel. Une diminution de la diffusion du pranopofène dans la peau humaine a également été observée lorsque des NPs de PLGA étaient dispersées dans des hydrogels de carbomères (test *in vitro*) <sup>236</sup>. Au contraire, Shah *et al.* ont montré qu'une suspension de NPs bicouches PLGA/chitosane viscosifiées avec 0,8 %*p/v* d'HPMC augmentait 1.5 fois l'absorption cutanée sur peau humaine (*in vitro*) du kétoprofène encapsulé par rapport à une suspension aqueuse non visqueuse <sup>222</sup>. Des résultats similaires ont été obtenus par Batheja *et al.*, qui ont montré que le rouge de Nil encapsulé dans des nanosphères de PEG-tyrosine-PEG était 1.4 fois plus absorbé *in vivo* dans l'épiderme de porc à partir d'une suspension viscosifiée avec 1 % *w/v* d'HPMC en comparaison à une suspension aqueuse. Cet effet a été attribué à une hydratation importante de la peau par l'HPMC venant gonfler les cornéocytes <sup>230</sup>. Néanmoins, dans une autre étude, l'incorporation des nanosphères de PEG-tyrosine-PEG dans un gel à 1 %*p/v* d'HPMC n'avait pas d'effets sur l'absorption cutanée du paclitaxel encapsulé <sup>139</sup>.

En plus des effets d'hydratation, l'incorporation des particules dans des suspensions visqueuses peut également réduire leur agrégation dans les follicules, comme proposé par Patzelt *et al.*, permettant ainsi une pénétration plus profonde des particules dans les follicules de peau de porc (test *in vitro*) <sup>232</sup>. La viscosité du véhicule influence également la mobilité des particules dans la formulation; néanmoins *in vitro* le changement de mobilité n'a pas été corrélé avec une modification de la pénétration cutanée <sup>231</sup>. L'incorporation des particules dans des formulations de type mousse peut également modifier la libération de la molécule encapsulée depuis les particules <sup>233</sup>.

L'influence des formulations semi-solides sur l'absorption cutanée *in vitro* à partir de particules est donc variable et dépend à la fois du type de formulation, et du devenir des NPs dans la formulation au contact de la peau. Néanmoins, il est attendu *in vivo* que l'effet des formulations semi-solides soit positif, puisque les suspensions liquides ne seraient pas maintenues sur la peau (contrairement aux essais *in vitro* en conditions statiques).

### 1.3.2.2 Massage

Les formulations topiques sont couramment déposées sur la peau à l'aide d'un massage et une friction manuelle de la peau afin d'étaler efficacement le produit. De telles conditions peuvent influencer la biodisponibilité des formulations. Lademann *et al.* ont notamment démontré que des particules de PLGA de 320 nm liées de manière covalente à un fluorophore pénétraient les follicules pileux de peau de porc (*in vitro*) plus profondément que le fluorophore libre, mais uniquement lorsqu'un massage de 3 minutes était appliqué (**Figure 1.18 A et B**). Sans massage, la pénétration était similaire pour les deux formulations (**Figure 1.18 C et D**)<sup>90</sup>. L'effet du massage sur la pénétration folliculaire de liposomes a également été démontré<sup>237</sup>. L'effet pompe du mouvement du poil lors du massage a notamment été avancé comme le mécanisme permettant une profonde pénétration des particules.



**Figure 1.18** A) Pénétration de particules de PLGA fluorescentes ou B) de fluorophore libre sous massage de la peau. C) Pénétration contrôlée des particules de PLGA et D) du fluorophore libre sans massage. La fluorescence est représentée par les zones blanches sur les images de microscopie. Figure reproduite d'après les résultats de<sup>90</sup>.

Bien que le massage favorise la pénétration dans les follicules, celui-ci ne permet toutefois pas, sur peau saine, une translocation des particules dans les couches viables de la peau humaine, comme observé *in vivo* par le groupe de M. S. Roberts<sup>238</sup>.

### 1.3.2.3 Nanoparticules et méthodes physiques/chimiques

Combiner l'utilisation de NPs avec des méthodes physiques permet d'augmenter leur pénétration dans les couches de la peau, notamment pour les NPs de taille supérieure à 20 nm qui restent en surface de la peau ou s'accumulent uniquement dans les follicules pileux.

Par exemple, plusieurs études ont récemment montré la faisabilité de combiner NPs et traitement par des microaiguilles pour délivrer profondément les NPs dans la peau, puisque des pores de dizaines de  $\mu\text{m}$  de largeur sont créés. Les premières études ont été réalisées par McAllister *et al.* en 2003, qui ont remarqué que des NPs de latex de 25 et 50 nm pouvaient traverser une membrane épidermale humaine après traitement de la peau par des microaiguilles (test *in vitro*)<sup>239</sup>. Ces résultats ont été confirmés par Coulman *et al.*, qui ont montré que des particules de PS positivement chargées de 100 nm traversaient 10 fois plus une membrane épidermale humaine après perforation par des microaiguilles, en comparaison à une peau non traitée (test *in vitro*). Néanmoins, au cours du temps, une agrégation des particules a été observée, bouchant les pores créés<sup>240</sup>. Dans une autre étude, il a été reporté que des NPs de PLGA négativement chargées s'accumulaient significativement plus dans l'épiderme et le derme humain après traitement de la peau avec des microaiguilles *in vitro*, avec un effet de la taille de NPs et de la concentration (test *in vitro*). Néanmoins aucune perméation dans le compartiment récepteur n'a été observée, puisque les microaiguilles ne créent pas de micropores au-delà de l'épiderme<sup>241</sup>. Il est également à noter que le prétraitement de la peau par des microaiguilles n'induit pas systématiquement une amélioration de l'absorption cutanée des substances actives, comme observé par Vitorino *et al.* avec des NLC sur peau de rat *in vivo*<sup>242</sup>.

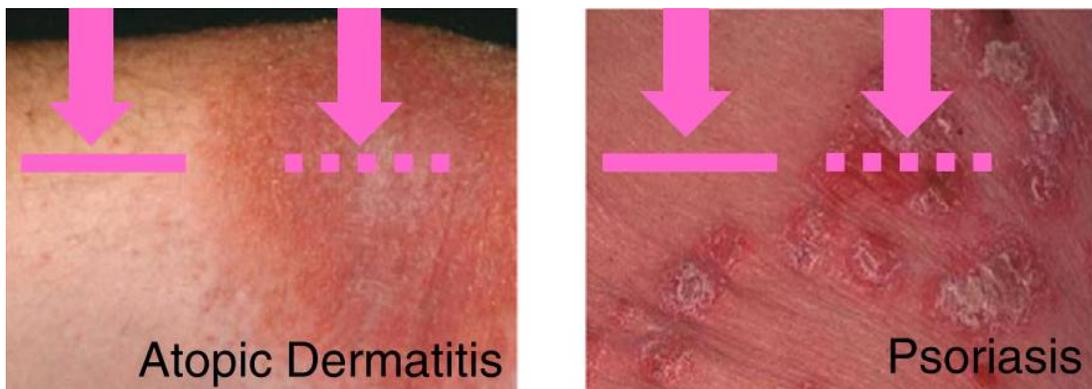
D'autres méthodes physiques et chimiques ont également été testées en combinaison des NPs pour améliorer la pénétration des NPs dans la peau et des substances actives encapsulées, comme la sonophorèse<sup>218</sup>, l'iontophorèse<sup>130, 243-244</sup>, l'électroporation<sup>245</sup>, la microporation laser<sup>246-248</sup>, ou encore l'utilisation de différents promoteurs d'absorption<sup>111, 218, 236, 242, 249</sup>.

### 1.3.3 Influence de la condition pathologique de la peau

Malgré les efforts croissants, peu de données sont pour l'instant disponibles sur l'absorption cutanée des NPs ou d substances actives pharmaceutiques à partir de NPs à travers la peau endommagée. En effet, l'OCDE<sup>148</sup> et le SCCS<sup>149</sup> préconisent d'utiliser des modèles de peau

intacte pour étudier l'absorption cutanée de produits pharmaceutiques ou de cosmétiques (voir partie 1.3 *Facteurs influençant la biodisponibilité dans la peau des NPs et/ou des principes actifs à partir de systèmes particuliers*).

Pourtant, les produits cutanés pharmaceutiques sont très souvent des produits topiques destinés à traiter des pathologies cutanées et donc à être utilisés sur des peaux non intactes. En effet, un grand nombre de pathologies dermatologiques sont caractérisées par une modification de la fonction barrière cutanée (**Figure 1.19**). Par exemple, la peau présentant des blessures, des égratignures de l'inflammation ou encore des modifications de la composition lipidique, comme cela peut être le cas pour la dermatite atopique, est caractérisée par une fonction barrière endommagée. Dans d'autres cas, des perturbations de la différenciation épidermique sont responsables d'un épaissement du SC, modifiant également les propriétés barrières (psoriasis, ichtyose, cancer de la peau). Par ailleurs, la peau des nouveau-nés est également caractérisée par une barrière cutanée moins efficace. L'influence du type de peau prend également tout son sens pour l'absorption des écrans solaires puisque ceux-ci sont souvent déposés sur une peau préalablement lésée par le soleil.



**Figure 1.19** Images cliniques représentatives de la condition de la peau (ligne continue peau intacte, pointillée peau lésée). La dermatite atopique est caractérisée par une confluence de papulo-vésicules. Le psoriasis est caractérisé par une hyperprolifération de l'épiderme avec des plaques caractéristiques. <sup>3</sup>

### 1.3.3.1 Modèles de peaux pathologiques

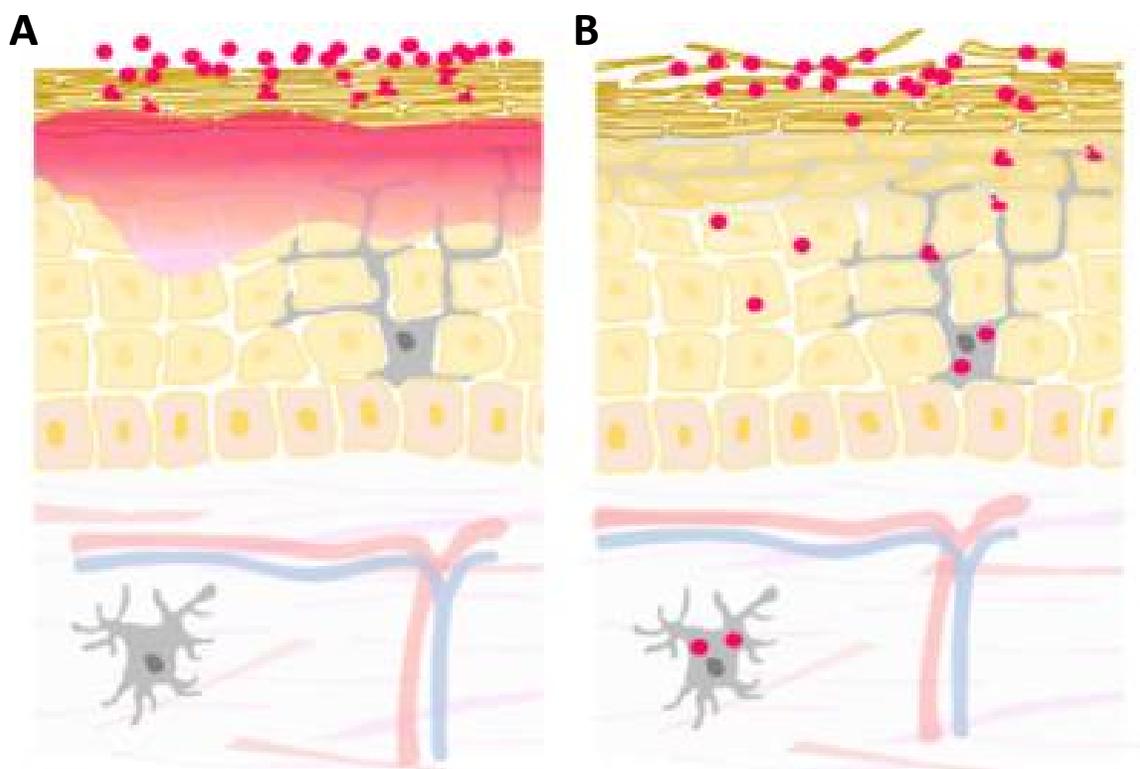
Puisque le passage du SC est le facteur limitant à l'absorption des substances actives et des NPs, un SC modifié, de l'inflammation ou encore la rapidité du renouvellement des kératinocytes ont vraisemblablement un effet important sur l'absorption cutanée et le devenir des NPs.

L'utilisation de modèles *in vitro* et *in vivo* proches de la pathologie à traiter est donc nécessaire pour mimer plus précisément l'absorption dans la peau non intacte. Le modèle le plus simple et le plus courant pour mimer une peau dont la barrière cutanée est endommagée (ex : dermatite atopique) est le « tape-stripping » de la peau, pouvant se réaliser *in vivo* ou *in vitro* sur des explants de peau. Cette méthode, couramment utilisée pour quantifier l'absorption des substances actives dans les différentes couches du SC,<sup>250</sup> consiste à retirer graduellement les couches du SC par action d'adhésifs sur la peau. Le nombre de décollements (« strips ») successifs et la pression exercée sur la peau par les adhésifs déterminent la proportion de cornéocytes retirée<sup>251</sup>. Le retrait du SC peut être visualisé par des coupes histologiques de la peau<sup>252</sup> ou par mesure de la PIE<sup>251, 253</sup>. Il a par exemple été défini qu'une PIE de 10-20, 20-30 et 30-40 g.m<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, correspondaient respectivement à une perturbation de la barrière cutanée légère, modérée et intense. L'acétone ou le SDS peuvent également être utilisés pour solubiliser les lipides intercornéocytaires de la peau, moduler l'arrangement lipidique et obtenir une condition de peau sèche<sup>253-256</sup>.

Des lésions plus profondes la peau (retrait de la totalité de l'épiderme) peuvent également être obtenues par abrasion de la peau, ce qui permet de mimer plus précisément la peau présentant des plaies. Les formulations peuvent alors être au contact du derme<sup>255, 257-258</sup>. Des modifications de la peau liées à l'exposition solaire (coup de soleil) peuvent être reproduites par irradiation UV *in vivo* sur des modèles murins ou porcins<sup>259-262</sup>. Des modèles animaux plus spécifiques d'un certain nombre de pathologies cutanées sont actuellement disponibles, telles que la dermatite<sup>263</sup>, le psoriasis<sup>264</sup>, l'acné<sup>265</sup>, les plaies<sup>266</sup> ou encore les cancers de la peau<sup>267-268</sup>. Une alternative à l'utilisation d'animaux pour le criblage pharmaceutique est l'utilisation de modèles de peaux reconstruites *in vitro*. De nombreux modèles *in vitro* de maladies de peau sont actuellement disponibles<sup>269</sup> même si leur utilisation reste limitée, car ils ne comportent pas toutes les spécificités de la peau (notamment les annexes cutanées) ou des pathologies. Néanmoins, à ce jour, il n'existe pas encore de standardisation quant à l'utilisation de modèles de peau où la condition de la peau est endommagée.

## 1.3.3.2 Pénétration cutanée sur peau non saine

Les études réalisées comparant la pénétration de NPs et des substances actives encapsulées sur des modèles de pathologies *in vivo* ou *in vitro* montrent dans la plupart des cas que les lésions cutanées modulent l'absorption des substances actives et des NPs dans la peau (**Tableau 1.6** et **Figure 1.20**).



**Figure 1.20** A) Pénétration des substances actives dans la peau depuis les NPs qui ne pénètrent pas au-delà du *stratum corneum*. B) Pénétration possible des NPs sur peau lésée<sup>3</sup>.

Les lésions mécaniques favorisent l'absorption/perméation des substances actives encapsulées<sup>252, 270-272</sup>, mais souvent le simple « tape stripping » de la peau ne permet pas aux particules entières de pénétrer les couches viables de la peau<sup>255, 257-258, 261, 273</sup> ; leur accumulation à la surface peut toutefois être modifiée<sup>274</sup>. Des lésions plus profondes par dermabrasion sont quant à elles responsables de la pénétration des NPs dans le derme viable et la circulation sanguine<sup>255, 257-258</sup>. L'augmentation de l'absorption sur peau lésée mécaniquement n'est toutefois pas systématique<sup>275</sup>. L'exposition préalable de la peau à des radiations UV a également des effets non négligeables sur l'absorption cutanée en modifiant les espacements intercornéocytaires<sup>259-260, 262</sup>, même si une augmentation de la pénétration cutanée n'est pas toujours remarquée<sup>261</sup>. De

plus, le type de rayonnement (UVA ou UVB) induit également des effets différents sur la peau et donc sur l'absorption cutanée <sup>262</sup>.

La condition inflammatoire de la peau joue également un rôle non négligeable sur l'absorption cutanée en raison du gonflement du *SC* et/ou de la libération de composants inflammatoires. Une augmentation de l'absorption des substances actives encapsulées <sup>207, 276</sup> et de NPs polymériques <sup>96</sup> est alors possible. Néanmoins, la condition inflammatoire ne semble pas affecter la pénétration de NPs inorganiques solides <sup>274, 277</sup>.

Il a également été montré que les caractéristiques de cancer de la peau (non mélanome, non hyperkératinisée) favorisaient l'absorption cutanée de particules ou de substances actives encapsulées en comparaison à un modèle de peau reconstruit sain. Au contraire l'hyperkératinisation d'un modèle desquamant défavorisait à la fois l'absorption des substances actives et des NPs <sup>97</sup>.

**Tableau 1.6** Effet de la condition de la peau sur la pénétration de NPs et/ou des substances actives encapsulées dans les NPs

Type de lésion	Modèle de peau	NPs/substances actives testées	Conclusions de l'étude	Réf.
<b>Lésions mécaniques de la peau (stripping, abrasion)</b>	<i>In vitro</i> Peau de rat intacte, contractée, strippée pour enlever le SC ou abrasée (papier sablé) pour retirer tout l'épiderme	Acide carboxylique-QDs	Les QDs restent à la surface du SC pour peau intacte ou contractée, ou à la surface de l'épiderme viable pour la peau strippée. Au contraire, si la peau est abrasée, les QDs pénètrent légèrement dans le derme	257
	<i>In vivo</i> Dos de souris (SKH-1 sans poils) intact ou strippé pour enlever le SC (10x) ou dermabrasé pour retirer SC+épiderme ou traitée par de l'acétone (1 app/jr pendant 4 jours) pour mimer une peau sèche	PEG-QDs (37 nm) dans une émulsion huile/eau	Les QDs appliqués sur peau dermabrasée sont retrouvés dans le foie (2% de la dose appliquée) et les ganglions lymphatiques. Pas de pénétration à partir des autres traitements de la peau.	255
	<i>In vitro</i> Peau abdominale humaine entière intacte ou abrasée avec une aiguille	NPs d'argent recouvertes de PVP dispersées dans une sueur synthétique	Une augmentation de la concentration en argent a été observée dans le compartiment récepteur pour la peau abimée (5x), par rapport à la peau intacte. Les NPs pénètrent dans le SC et à la surface de l'épiderme.	258
	<i>In vitro</i> peau humaine intacte ou strippée (30 strips)	NC acryliques chargées en rhodamine-B (150 nm)	Le fluorophore est retrouvé dans l'épiderme et le derme sur peau lésée	271
	<i>In vitro</i> peau d'oreille de porc intacte ou strippée (25 strips)	SLN-radioactifs de différentes compositions lipidiques (entre 150 et 210 nm), chargés en betamethasone valérate	Le stripping de la peau est responsable d'une plus forte pénétration des lipides et de la substance active dans la peau et le récepteur	252
	<i>In vitro</i> peau de rat sans poils intacte ou strippée (10 strips)	Liposomes de différentes tailles et surfaces chargées en doxorubicine	1.5 fois plus de diffusion sur peau strippée que sur peau intacte pour les liposomes (mais pas de différences pour une solution de doxorubicine)	272
	<i>In vitro</i> peau humaine intacte ou strippée (40 strips)	NPs d'acrylonitrile-NVP (35-244 nm de différentes surfaces) chargées en rouge de Nil.	Sur peau intacte, les NPs s'accumulent sur la surface du SC quelles que soit leurs propriétés, mais sur peau lésée, le fluorophore pénètre le derme pour les plus petites et les plus hydrophiles NPs.	270

<b>Exposition de la peau à des radiations UV</b>	<i>In vitro</i> peau humaine intacte ou strippée (50 strips)	Nanogels thermosensibles de polyglycérol (156 nm) fluorescents	Sur peau strippée, les nanogels pénètrent dans l'épiderme et le derme et peuvent être internalisés dans les cellules dendritiques du derme. Effet amplifié par activation thermique.	95
	<i>In vitro</i> peau humaine intacte ou strippée (20 strips)	Différentes NPs lipidiques chargées en cypoterone acétate.	Pas d'augmentation significative de la substance active sur peau lésée en comparaison à la peau intacte	275
	<i>In vivo</i> Souris (SKH-1 <sup>iv</sup> ) préalablement traitée ou non <i>in vivo</i> par des radiations UVA- UVB	QD-carboxylate (30 nm)	Plus de pénétration dans l'épiderme viable et le derme dans la peau de souris traitée (sûrement en raison d'une modification de l'organisation lipidique et un des espaces intercornéocytaires)	259
	<i>In vitro</i> et <i>in vivo</i> sur peau de porc préalablement traitée ou non par des radiations UVB	NPs de TiO <sub>2</sub> (agrégats d'~200 nm) et de ZnO (agrégats d'~140 nm) dans différents véhicules	L'exposition de la peau aux UVB augmente la pénétration des NPs testées, mais sans pénétration transdermique	260
	<i>In vitro</i> Peau d'oreille de porc lésée par stripping (10 strips) ou irradiée par exposition à une exposition solaire simulée (couvrant UVA et UVB)	NPs de TiO <sub>2</sub> en aiguille (20-30 * 50-150 nm)	Quel que soit le type de lésion, les NPs restent à la surface de la peau	261
	<i>In vitro</i> sur peau de souris nude préalablement traitée ou non <i>in vivo</i> par des radiations UVA ou UVB	NLC et NPs de PLGA chargées en acide rétinoïque (AR) (>200 nm)	Les UV sont responsables d'une perte des corps d'Odland et des desmosomes <i>in vivo</i> . Les UVA augmentent la déposition de l'AR dans la peau contrairement aux UVB pour les 2 types de NPs (4.2 et 4.9 fois) en raison d'un relâchement des espaces intercornéocytaires (par rapport peau non traitée)	262

<sup>iv</sup> Souris glabre immunocompétente.

<b>Modèles de peaux pathologiques</b>	<i>In vivo</i> peau humaine intacte, strippée, ou présentant des lésions de dermatite atopique ou psoriasis	NPs de ZnO	Augmentation de l'accumulation des NPs sur peau lésée, mais sans pénétration dans l'épiderme viable	274
	<i>In vivo</i> peau humaine intacte, strippée (15 strips) ou avec lésions psoriatiques	NPs de TiO <sub>2</sub> et de ZnO	Les NPs restent à la surface de la peau quel que soit le type de lésion	278
	<i>In vivo</i> sur peau de souris SKH-1 intacte, strippée (PIE 40 g.m <sup>-2</sup> .h <sup>-1</sup> ) ou inflammée (traitée par oxazolone)	NPs de AHAPS-SiO <sub>2</sub> fluorescentes	Pas de pénétration des NPs au-delà du SC quelle que soit la condition de la peau	277
	<i>In vivo</i> sur oreille de souris (BALB/c <sup>v</sup> ) traitée ou non par une solution de dithranol dans l'acétone pour induire une dermatite inflammatoire	NPs d'éthylcellulose entre chargées en rouge de Nil (50-100-500 et 1000 nm)	Sur peau intacte, la taille n'influence pas la pénétration du fluorophore encapsulé, au contraire de la peau inflammée où les plus petites tailles de NPs favorisent une pénétration plus profonde. L'inflammation de la peau désorganise l'organisation des cornéocytes (gonflement)	276
	<i>In vivo</i> sur oreille de souris (BALB/c) traitée ou non par une solution de dithranol dans l'acétone pour induire une dermatite inflammatoire	NPs d'éthylcellulose négatives, positives et neutres chargées en rouge de Nil (~100 nm)	Augmentation de la pénétration du fluorophore (plus d'accumulation dans les unités pilosébacées), notamment pour les NPs chargées négativement (3 fois plus) sur peau inflammée	207
	<i>In vivo</i> sur peau de porc ou de souris traitées ou non par oxazolone pour induire une dermatite inflammatoire	NPs de PLGA fluorescentes (70 et 300 nm)	Sur peau intacte, les NPs restent à la surface de la peau (5-17 µm de pénétration). Sur peau inflammée de porc, les NPs de 70 nm pénètrent jusqu'à 100 µm (5 fois plus de fluorescence dans la peau que pour les NPs de 300 nm).	96
	<i>In vitro</i> sur peau humaine intacte ou strippée ou <i>in vitro</i> sur modèles de peau reconstruite intacte, ou modèles de cancer de la peau (non mélanome, coculture avec des cellules cancéreuses) ou de syndrome de peau desquamante (« silencing » génique)	Nanotransporteurs CMS fluorescents (unimères de 16 nm formant des agrégats allant jusqu'à 240 nm) et chargés en rouge de Nil	La peau strippée facilite la pénétration du fluorophore et des CMS dans les couches viables. La pénétration est également favorisée sur modèle de cancer de la peau par rapport au modèle sain. Au contraire, une diminution de la pénétration a été observée sur modèle de peau desquamante	97

<sup>v</sup> Souris albinos

## 1.4 Définition du projet de thèse

### 1.4.1 Problématique de la vectorisation de substances actives dans la peau à partir de nanoparticules polymériques biodégradables

Les NPs polymériques biodégradables sont couramment évaluées en recherche dermatopharmaceutique. Elles sont notamment reconnues pour la versatilité de leur structure, leur stabilité, leur grande capacité d'encapsulation de principes actifs hydrophobes, permettant de les formuler dans des formulations aqueuses et surtout leur capacité de contrôler voire augmenter et cibler l'absorption de substances actives hydrophobes dans la peau (voir partie 1.2.3 *Illustration des bénéfices des nanoparticules pour la voie cutanée à travers l'exemple des nanoparticules polymériques biodégradables*). Bien que ces NPs aient démontré leur supériorité *in vitro* et *in vivo* par rapport à des formulations commerciales ou d'autres types de nanovecteurs, et ce, pour des applications cutanées diverses, leur utilisation reste encore au stade exploratoire. En effet, à ce jour, leur succès clinique en dermatopharmacie est limité : un seul type de NP polymérique a complété la phase III d'essai clinique (**Tableau 1.2**) et aucun produit pharmaceutique n'est commercialisé. Afin de dépasser ce stade exploratoire et développer des nanoformulations polymériques cliniquement viables, il est maintenant nécessaire de définir rationnellement quelles seraient les caractéristiques physico-chimiques les plus intéressantes de ces vecteurs selon la molécule active choisie et l'application thérapeutique visée<sup>3</sup>. Une telle conception rationnelle est néanmoins sujette à la fine compréhension du rôle de la composition chimique des polymères sur les propriétés de ces particules et sur les mécanismes d'interactions spécifiques avec la peau.

La plupart de particules polymériques testées en dermatopharmacie sont fabriquées soit : i) à base de polyesters totalement hydrophobes (ex. PLA ou PLGA ou PCL) et arborent donc un cœur polymérique et une surface hydrophobe souvent chargée ou au contraire ii) à base de polymères amphiphiles (ex. PLA-PEG ou PLGA-PEG ou PCL-PEG) et arborent un cœur polymérique lipophile avec une surface hydrophile souvent neutre en suspension aqueuse (**Tableau 1.3**). L'intérêt du choix de la composition polymérique des NPs est pourtant très rarement défini.

Concernant la composition polymérique du cœur hydrophobe des particules, quelques rares études ont montré l'influence du choix des matériaux pour l'encapsulation des substances actives lipophiles<sup>113</sup> et leur pénétration dans la peau<sup>114, 279</sup>. Récemment, il a par exemple été

démontré que l'accumulation du rétinol *in vitro* dans la peau de porc à partir de micelles fabriquées à partir de copolymères à blocs amphiphiles dépendait de la nature du bloc hydrophobe. Un cœur polymérique de PLA solubilisant moins bien le rétinol qu'un cœur de PCL, les micelles de PLA-PEG favorisaient l'absorption de la substance active dans le *SC* lipophile de la peau par rapport aux micelles de PCL-PEG (> 5.5 fois)<sup>114</sup>.

L'influence de la composante hydrophile de ces vecteurs polymériques sur l'absorption cutanée n'est, quant à elle, pas encore établie. Il est pourtant reconnu que la composante hydrophile des polymères peut modifier :

- **la structure** des particules formées (nanoparticules solides ou particules de type micellaire caractérisées notamment par une plus faible taille<sup>74</sup> (**Tableau 1.3**))
- **leur surface** (lipophile ou hydrophile, charges électrostatiques ou non)
- **leur stabilité** (ex. une meilleure stabilité colloïdale dans les milieux physiologiques est obtenue grâce à l'ajout d'une surface polymérique hydrophile<sup>199-201</sup>, venant masquer les charges liées au cœur polymérique et stabiliser la suspension colloïdale par répulsions stériques)
- **leurs interactions avec les milieux biologiques** (ex. une surface dense en polymère hydrophile limite l'opsonisation de la surface des NPs par les protéines plasmatiques<sup>74</sup>, améliorant ainsi le temps de circulation sanguine<sup>75-76</sup>)
- **leur diffusion** dans certains milieux complexes<sup>196-198</sup>.

Par ailleurs, il est attendu que les NPs lipophiles aient plus d'affinités pour les milieux lipidiques (sébum, *SC*) tandis que les NPs de surface hydrophile pourraient s'accumuler plus facilement dans les milieux hydrophiles (couches viables de la peau) (voir paragraphe 1.3.1.2.2 *Hydrophobie/Hydrophilie*). La présence de charges sur les NPs permet également souvent une meilleure pénétration cutanée (voir paragraphe 1.3.1.2.1 *Charge de surface*).

Au vu des différentes conséquences liées au choix de la composition polymérique hydrophile, il est donc attendu que les interactions des NPs polymériques avec la surface cutanée, leur devenir et donc l'absorption cutanée de la substance active soient également affectés par cette composition hydrophile. Par ailleurs, la peau pathologique ayant notamment une composition et une structure différentes de la peau saine, les interactions avec les NPs polymériques peuvent

également être différentes de la peau saine selon la composition polymérique hydrophile. Dans le but de développer des vecteurs polymériques efficaces pour la voie cutanée, il est donc important de définir précisément le rôle de la composition hydrophile des polymères sur l'absorption cutanée des substances actives et les interactions peau-particules par des études systématiques à la fois sur peau intacte et sur peau pathologique. Ce rôle doit toutefois être préférablement défini pour des tailles identiques de NPs afin d'éviter que les résultats soient uniquement corrélés à l'effet crucial de la taille des NPs sur l'absorption cutanée.

#### **1.4.2 Hypothèse**

Puisque la composition polymérique hydrophile des particules polymériques influence un certain nombre d'interactions avec les milieux biologiques, il est probable que cette caractéristique conditionne également les interactions avec les composants de la peau, intacte ou pathologique. L'hypothèse de recherche de ce projet est donc la suivante :

**La composition hydrophile des polymères influence la structure des nanoparticules et leurs propriétés de surface et, par conséquent, conditionne les interactions peau-particules et l'absorption d'une substance active encapsulée, selon la condition de la peau.**

#### **1.4.3 Objectifs du projet de thèse**

Afin de tester l'hypothèse de recherche, l'objectif principal de ce projet de thèse est de : **déterminer, par des études systématiques structure – activité, quelle est l'influence de la composition hydrophile des NPs polymériques pour l'administration cutanée d'une substance active lipophile, à taille égale de NPs.**

Il sera ainsi possible de déterminer si une composition amphiphile des particules (outre l'effet de la taille) apporte des avantages spécifiques pour l'administration cutanée sur peau intacte ou pathologique en comparaison à des particules hydrophobes.

Différents objectifs de travail ont été mis en place afin de tester l'hypothèse de recherche et de répondre à l'objectif principal. Ces objectifs, correspondants aux différentes étapes méthodologiques de cette thèse, sont résumés dans les points ci-dessous.

➤ **Objectif 1 : Développement d'une librairie de polymères amphiphiles à blocs**

Le premier objectif porte sur la synthèse d'une librairie de polymères à blocs à base de PLA qui servira de matériel pour la fabrication d'une librairie de NPs polymériques. Le PLA constituera le bloc hydrophobe du polymère. La librairie de polymère variera selon : i) le type de bloc hydrophile (PEG ou PMPC), ii) la quantité de bloc hydrophile PEG (taille du bloc PEG) et iii) l'architecture du polymère (linéaire ou branchée) (**Figure 1.21**).

Le PEG a été choisi comme bloc hydrophile, car il s'agit de la composition hydrophile de NPs la plus reconnue dans le domaine biomédical et la plus utilisée pour la délivrance cutanée (**Tableau 1.3**). Le PMPC, initialement conçu pour mimer et avoir des affinités avec les bicouches lipidiques des membranes cellulaires et possédant des propriétés hygroscopiques remarquables du PMPC provenant de la nature très hydrophile des groupes phosphorylcholines<sup>280-282</sup>, a quant à lui été choisi, car il a démontré son potentiel comme alternative au PEG<sup>283</sup>. Quelques études ont par ailleurs montré que le PMPC pouvait modifier la structure du SC en modifiant l'organisation des phases lamellaires de la peau et en améliorant la rétention en eau<sup>284-286</sup>, ce qui pourrait permettre d'augmenter l'absorption cutanée.



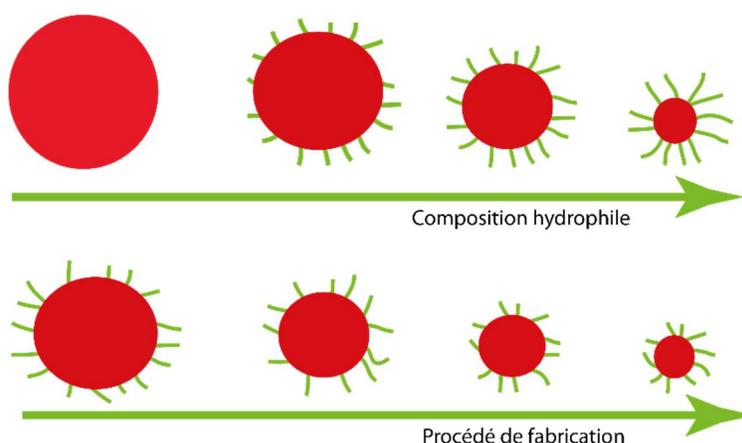
**Figure 1.21** Caractéristiques de la librairie de polymères

Ce premier objectif est détaillé dans le chapitre II de cette thèse : « **Synthèse d'une librairie de copolymères biocompatibles** ».

➤ **Objectif 2 : Choix d'un procédé de fabrication permettant de contrôler la taille des nanoparticules polymériques**

Le second objectif de ce travail consiste en la fabrication de NPs blanches à partir des polymères préalablement développés. L'influence de la quantité de bloc hydrophile et de l'architecture des

polymères sur les propriétés structurales basiques des NPs (diamètre hydrodynamique, potentiel Zêta, PEG de surface) seront tout d’abord étudiées (**Figure 1.22**). Une attention particulière sera ensuite portée à la définition du rôle des paramètres de fabrication de NPs sur le contrôle du diamètre hydrodynamique (**Figure 1.22**). En effet, le but est de déterminer l’influence de la composition hydrophile des polymères sur l’absorption cutanée à partir des NPs à taille constante, afin que les conclusions ne soient pas biaisées par l’influence très importante de la taille des NPs. Différentes méthodes de fabrication de NPs polymériques utilisant le procédé de déplacement de solvant seront ainsi comparées (nanoprécipitation classique, nanoprécipitation Flash et procédé de microfluidique).



**Figure 1.22** Variation du diamètre hydrodynamique des NPs fabriquées à partir de la librairie de polymères selon la composition hydrophile et le procédé de fabrication. Pour un même polymère, le procédé de fabrication peut en effet avoir un rôle important sur la taille finale de la particule.

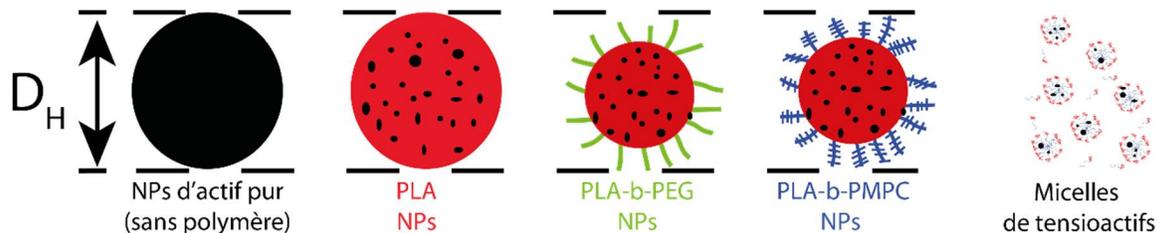
Ce second objectif est détaillé dans le chapitre III de cette thèse : « **Fabrication de nanoparticules : comment contrôler leurs propriétés physico-chimiques ?** »

- **Objectif 3 : Évaluation de l’influence de la chimie de surface de NPs polymériques sur différents aspects liés à la délivrance d’une substance active modèle lipophile dans la peau intacte ou lésée**

Le troisième objectif de ce travail consiste à déterminer l’influence de la nature du bloc hydrophile (pas de recouvrement hydrophile, recouvrement de PEG, recouvrement de PMPC) en surface des NPs polymériques sur différents aspects liés à la délivrance d’une substance

active modèle lipophile dans la peau (**Figure 1.23**). Les formulations polymériques seront comparées à un contrôle particulière de substance active pure sans polymère et à une formulation micellaire à base de tensioactif non ionique.

Le cholécalciférol a été choisi comme molécule modèle très lipophile, sensible et peu coûteuse, en raison de sa similarité avec le calcitriol, principe actif pharmaceutique utilisé pour le traitement du psoriasis. L'effet de la composition hydrophile sur les propriétés des NPs (taille, surface, encapsulation), sur la dégradation chimique de la substance active, sur la libération *in vitro* de la substance active et sur l'absorption cutanée *in vitro* de la substance active, sera étudié. L'absorption cutanée dans deux types de peaux sera évaluée (peau intacte ou lésée par retrait d'une partie du *SC*) afin de mettre en évidence le rôle de la physiopathologie de la peau.

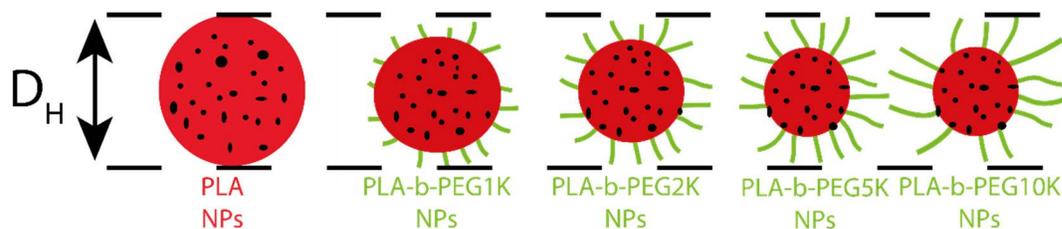


**Figure 1.23** Chimie de surface des NPs étudiées ayant un diamètre hydrodynamique identique. Ce troisième objectif est détaillé dans le chapitre IV de cette thèse : « **Influence de la chimie de surface de nanoparticules polymériques sur la délivrance dans la peau d'une substance active modèle lipophile** ». Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique, intitulé « **Effect of Surface Chemistry of Polymeric Nanoparticles on Cutaneous Penetration of Cholecalciferol** » et publié dans *International Journal of Pharmaceutics* (article disponible en ligne le 11/10/2018. Doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.046).

➤ **Objectif 4 : Détermination de mécanismes d'interactions entre les nanoparticules et la peau intacte ou lésée**

Le quatrième objectif vise à déterminer les mécanismes spécifiques d'interactions entre les NPs et les composants de la peau selon la composition hydrophile des NPs. Dans ce cas, la librairie de NPs testée variera selon la quantité de bloc hydrophile (variée par la taille du bloc PEG) dans les polymères (**Figure 1.24**).

En fonction de la composition hydrophile des NPs (surface et structure), l'absorption du cholécalférol sera corrélée à la stabilité colloïdale au contact de la peau et aux interactions avec les lipides cutanés.



**Figure 1.24** Composition hydrophile (quantité de PEG) des NPs étudiées ayant un diamètre hydrodynamique identique.

Ce quatrième objectif est détaillé dans le chapitre V de cette thèse : « **Approfondissement des mécanismes d'interactions nanoparticules-peau liés à la surface et la structure de nanoparticules polymériques** ». Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article scientifique, intitulé « **Subtle and unexpected role of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nano-formulations into intact and impaired skin** », soumis pour publication dans *International Journal of Pharmaceutics* le 20/11/2018.

Ces différents objectifs permettront d'adresser un certain nombre de questions qui seront abordées dans un chapitre de Discussion Générale (Chapitre VI).

- ✓ Quel est le rôle de la composition hydrophile (type, architecture et quantité) sur les propriétés des nanoparticules ?
- ✓ Comment contrôler facilement la taille et la surface des NPs ?
- ✓ Quelles sont les interactions spécifiques entre la peau et les NPs polymériques pouvant influencer la pénétration cutanée du cholécalférol, selon leur composition hydrophile et l'état de la peau ?
- ✓ Quelle est l'efficacité d'absorption cutanée des NPs polymériques testées pour l'absorption du cholécalférol dans la peau en comparaison à d'autres systèmes de la littérature ?

- ✓ Est-ce qu'une composition polymérique hydrophile apporte un intérêt supplémentaire pour l'administration cutanée en comparaison à des particules hydrophobes plus simples ?

## Références Avant-Propos et Chapitre I

- (1) Uldrich, J.; Newberry, D. *The next big thing is really small: How nanotechnology will change the future of your business*, Random House: 2010.
- (2) Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Utilization of biodegradable polymeric materials as delivery agents in dermatology. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology* **2014**, *7*, 23
- (3) Vogt, A.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Ma, N.; Alexiev, U.; Lendlein, A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? *Journal of Controlled Release* **2016**, *242*, 3-15
- (4) Agache, P.; Lihoreau, T.; Mac-Mary, S.; Fanian, F.; Humbert, P. The human skin: an overview. *Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants* **2017**, 1-4
- (5) BC Campus Anatomy and Physiology. Chapter 5 : The Integumentary System. 5.1 Layers of the Skin. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/5-1-layers-of-the-skin/> (accessed Date d'accès [2018/10/15]).
- (6) van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 295-313
- (7) Eckhart, L.; Lippens, S.; Tschachler, E.; Declercq, W. Cell death by cornification. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2013**, *1833* (12), 3471-3480
- (8) Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 44s-49s
- (9) Cevc, G.; Vierl, U. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. *Journal of Controlled Release* **2010**, *141* (3), 277-299
- (10) Egelrud, T. Desquamation in the stratum corneum. *Acta Dermato Venereologica-Supplement* **2000**, (208), 44-45
- (11) Menon, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, S3-S17
- (12) Madison, K. C. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* **2003**, *121* (2), 231-241
- (13) Agache, P. Dermis Connective Tissue Histopathology. In *Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*; Humbert, P.; Fanian, F.; Maibach, H. I.; Agache, P., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2017; pp 443-446.
- (14) Mohsen, I. M. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews* **2010**, *11* (1), 11-18
- (15) Otberg, N.; Richter, H.; Schaefer, H.; Blume-Peytavi, U.; Sterry, W.; Lademann, J. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. *Journal of Investigative Dermatology* **2004**, *122* (1), 14-19
- (16) Harkey, M. R. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Science International* **1993**, *63* (1), 9-18
- (17) Knorr, F.; Lademann, J.; Patzelt, A.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71* (2), 173-180
- (18) Zouboulis, C. C. Acne and sebaceous gland function. *Clinics in Dermatology* **2004**, *22* (5), 360-366
- (19) K., W.; A., M.; L., T.; S., B. S. A short history of sweat gland biology. *International Journal of Cosmetic Science* **2007**, *29* (3), 169-179
- (20) Zouboulis, C.; Jourdan, E.; Picardo, M. Acne is an inflammatory disease and alterations of sebum composition initiate acne lesions. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2014**, *28* (5), 527-532
- (21) Sato, K.; Kang, W. H.; Saga, K.; Sato, K. T. Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1989**, *20* (4), 537-563
- (22) Quinton, P. M. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* **1983**, *301* (5899), 421
- (23) Grice, E. A.; Segre, J. A. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology* **2011**, *9*, 244

- (24) Levin, J.; Maibach, H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2005**, *103* (2), 291-9
- (25) Schmid-Wendtner, M. H.; Korting, H. C. The pH of the Skin Surface and Its Impact on the Barrier Function. *Skin Pharmacology and Physiology* **2006**, *19* (6), 296-302
- (26) Elias, P. M. Stratum corneum acidification: how and why? *Experimental Dermatology* **2015**, *24* (3), 179-180
- (27) Bolzinger, M.-A.; Briançon, S.; Pelletier, J.; Chevalier, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2012**, *17* (3), 156-165
- (28) Ng, K. W.; Lau, W. M. Skin deep: the basics of human skin structure and drug penetration. In *Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement*; Springer: 2015; pp 3-11.
- (29) Bos, J. D.; Meinardi, M. M. H. M. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology* **2000**, *9* (3), 165-169
- (30) Hadgraft, J. Skin deep. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58* (2), 291-299
- (31) Magnusson, B. M.; Pugh, W. J.; Roberts, M. S. Simple Rules Defining the Potential of Compounds for Transdermal Delivery or Toxicity. *Pharmaceutical Research* **2004**, *21* (6), 1047-1054
- (32) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1997**, *23* (1), 3-25
- (33) Wiedersberg, S.; Guy, R. H. Transdermal drug delivery: 30+ years of war and still fighting! *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 150-156
- (34) Watkinson, A. C.; Kearney, M.-C.; Quinn, H. L.; Courtenay, A. J.; Donnelly, R. F. Future of the transdermal drug delivery market – have we barely touched the surface? *Expert opinion on drug delivery* **2016**, *13* (4), 523-532
- (35) Higuchi, T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process from creams and ointments. *J. Soc. Cosmet. Chem* **1960**, *11*, 85-97
- (36) Lane, M. E.; Santos, P.; Watkinson, A. C.; Hadgraft, J. Passive skin permeation enhancement. *Topical and transdermal drug delivery*. Wiley, Hoboken **2012**, 23-42
- (37) Lane, M. E. Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics* **2013**, *447* (1), 12-21
- (38) Williams, A. C.; Barry, B. W. Penetration enhancers. *Advanced drug delivery reviews* **2012**, *64*, 128-137
- (39) Roberts, M. S.; Bouwstra, J.; Pirot, F.; Falson, F. Skin hydration—a key determinant in topical absorption. *Dermatologic, Cosmeceutic, and Cosmetic Development: Therapeutic and Novel Approaches* **2007**, 115-128
- (40) Kalia, Y. N.; Naik, A.; Garrison, J.; Guy, R. H. Iontophoretic drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (5), 619-658
- (41) Park, D.; Park, H.; Seo, J.; Lee, S. Sonophoresis in transdermal drug delivery. *Ultrasonics* **2014**, *54* (1), 56-65
- (42) Denet, A.-R.; Vanbever, R.; Pr at, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56* (5), 659-674
- (43) Banga, A. K. Microporation applications for enhancing drug delivery. *Expert opinion on drug delivery* **2009**, *6* (4), 343-354
- (44) Hao, Y.; Li, W.; Zhou, X.; Yang, F.; Qian, Z. Microneedles-Based Transdermal Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2017**, *13* (12), 1581-1597
- (45) Singhal, M.; Lapteva, M.; Kalia, Y. N. Formulation challenges for 21st century topical and transdermal delivery systems. *Expert opinion on drug delivery* **2017**, *14* (6), 705-708

- (46) Rittner, M. N.; Abraham, T. Nanostructured materials: An overview and commercial analysis. *JOM Journal of the Minerals, Metals and Materials Society* **1998**, *50* (1), 37-38
- (47) Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chemical reviews* **2016**, *116* (5), 2826-2885
- (48) Balazs, A. C.; Emrick, T.; Russell, T. P. Nanoparticle Polymer Composites: Where Two Small Worlds Meet. *Science* **2006**, *314* (5802), 1107-1110
- (49) Organisation Internationale de Normalisation, Nanotechnologies -- Vocabulaire -- Partie 2: Nano-objets. In *ISO/TS 80004-2:2015* 2015.
- (50) Office of Cancer Genomics (National Cancer Institute) NCI Genomic Program Highlights <https://ocg.cancer.gov/e-newsletter-section/nci-genomic-program-highlights> (accessed Date d'accès [2018-10-15]).
- (51) Frédéric, L. Devenir des nanoparticules utilisées comme médicament dans l'organisme. *Techniques de l'ingénieur Nanotechnologies pour l'énergie, l'environnement et la santé* **2014**, base documentaire : TIB514DUO (ref. article : med5050),
- (52) Shi, J.; Kantoff, P. W.; Wooster, R.; Farokhzad, O. C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nature Reviews Cancer* **2017**, *17* (1), 20
- (53) Roger, E.; Lagarce, F.; Garcion, E.; Benoit, J.-P. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. *Nanomedicine* **2010**, *5* (2), 287-306
- (54) Ensign, L. M.; Cone, R.; Hanes, J. Nanoparticle-based drug delivery to the vagina: a review. *Journal of Controlled Release* **2014**, *190*, 500-514
- (55) Mansour, H. M.; Rhee, Y.-S.; Wu, X. Nanomedicine in pulmonary delivery. *International journal of nanomedicine* **2009**, *4*, 299
- (56) Singh, Y.; Meher, J. G.; Raval, K.; Khan, F. A.; Chaurasia, M.; Jain, N. K.; Chourasia, M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2017**, *252*, 28-49
- (57) Kraft, J. C.; Freeling, J. P.; Wang, Z.; Ho, R. J. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems. *Journal of pharmaceutical sciences* **2014**, *103* (1), 29-52
- (58) Sercombe, L.; Veerati, T.; Moheimani, F.; Wu, S. Y.; Sood, A. K.; Hua, S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Frontiers in pharmacology* **2015**, *6*, 286
- (59) Elsayed, M. M. A.; Abdallah, O. Y.; Naggar, V. F.; Khalafallah, N. M. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *332* (1), 1-16
- (60) Cevc, G.; Chopra, A. Deformable (Transfersome®) vesicles for improved drug delivery into and through the skin. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Springer: 2016; pp 39-59.
- (61) Pardeike, J.; Hommoss, A.; Müller, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *366* (1-2), 170-184
- (62) Letchford, K.; Burt, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *65* (3), 259-269
- (63) Nicolai, T.; Colombani, O.; Chassenieux, C. Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers. *Soft Matter* **2010**, *6* (14), 3111-3118
- (64) Raemdonck, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. Advanced nanogel engineering for drug delivery. *Soft Matter* **2009**, *5* (4), 707-715
- (65) Inoue, K. Functional dendrimers, hyperbranched and star polymers. *Progress in Polymer Science* **2000**, *25* (4), 453-571
- (66) Möschwitzer, J. P. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *International journal of pharmaceutics* **2013**, *453* (1), 142-156

- (67) Anselmo, A. C.; Mitragotri, S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. *The AAPS Journal* **2015**, *17* (5), 1041-1054
- (68) Feliu, N.; Docter, D.; Heine, M.; del Pino, P.; Ashraf, S.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Macchiarini, P.; Nielsen, P.; Alloyeau, D.; Gazeau, F. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2016**, *45* (9), 2440-2457
- (69) Raemdonck, K.; Braeckmans, K.; Demeester, J.; De Smedt, S. C. Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43* (1), 444-472
- (70) Sailor, M. J.; Park, J.-H. Hybrid Nanoparticles for Detection and Treatment of Cancer. *Advanced Materials* **2012**, *24* (28), 3779-3802
- (71) Hickey, J. W.; Santos, J. L.; Williford, J.-M.; Mao, H.-Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *J. Controlled Release* **2015**, *219*, 536-547
- (72) Bhatia, S. Natural Polymers vs Synthetic Polymer. In *Natural Polymer Drug Delivery Systems: Nanoparticles, Plants, and Algae*; Springer International Publishing: Cham, 2016; pp 95-118.
- (73) Gupta, A. P.; Kumar, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (10), 4053-4074
- (74) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG–PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**,
- (75) Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoj, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **1994**, *263* (5153), 1600-1603
- (76) Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. ‘Stealth’ corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf., B* **2000**, *18* (3–4), 301-313
- (77) Yamaoka, T.; Tabata, Y.; Ikada, Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1994**, *83* (4), 601-606
- (78) Wissing, S. A.; Müller, R. H. Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *254* (1), 65-68
- (79) Müller, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, Supplement (0), S131-S155
- (80) Teeranachaideekul, V.; Boonme, P.; Souto, E. B.; Müller, R. H.; Junyaprasert, V. B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release* **2008**, *128* (2), 134-141
- (81) Souto, E. B.; Wissing, S. A.; Barbosa, C. M.; Müller, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *278* (1), 71-77
- (82) El Maghraby, G. M. M.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Skin delivery of oestradiol from lipid vesicles: importance of liposome structure. *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *204* (1), 159-169
- (83) Dayan, N.; Touitou, E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials* **2000**, *21* (18), 1879-1885
- (84) Alvarez Rom#x, E.; n, R. x. E. D.; Naik, A.; Kalia, Y.; Guy, R.; Fessi, H. Enhancement of Topical Delivery from Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* **2004**, *21* (10), 1818-1825
- (85) Alves, M. P.; Scarrone, A. L.; Santos, M.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *341* (1), 215-220

- (86) Zhang, Z.; Tsai, P. C.; Ramezanli, T.; Michniak-Kohn, B. B. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2013**, *5* (3), 205-18
- (87) Lapteva, M.; Santer, V.; Mondon, K.; Patmanidis, I.; Chiriano, G.; Scapozza, L.; Gurny, R.; Möller, M.; Kalia, Y. N. Targeted cutaneous delivery of ciclosporin A using micellar nanocarriers and the possible role of inter-cluster regions as molecular transport pathways. *J. Controlled Release* **2014**, *196*, 9-18
- (88) Weiss-Angeli, V.; Bourgeois, S.; Pelletier, J.; Guterres, S. S.; Fessi, H.; Bolzinger, M.-A. Development of an original method to study drug release from polymeric nanocapsules in the skin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2010**, *62* (1), 35-45
- (89) Vettor, M.; Bourgeois, S.; Fessi, H.; Pelletier, J.; Perugini, P.; Pavanetto, F.; Bolzinger, M. Skin absorption studies of octyl-methoxycinnamate loaded poly (D, L-lactide) nanoparticles: estimation of the UV filter distribution and release behaviour in skin layers. *Journal of microencapsulation* **2010**, *27* (3), 253-262
- (90) Lademann, J.; Richter, H.; Teichmann, A.; Otberg, N.; Blume-Peytavi, U.; Luengo, J.; Weiß, B.; Schaefer, U. F.; Lehr, C.-M.; Wepf, R.; Sterry, W. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2007**, *66* (2), 159-164
- (91) Alvarez-Roman, R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *99* (1), 53-62
- (92) Mahe, B.; Vogt, A.; Liard, C.; Duffy, D.; Abadie, V.; Bonduelle, O.; Boissonnas, A.; Sterry, W.; Verrier, B.; Blume-Peytavi, U.; Combadiere, B. Nanoparticle-Based Targeting of Vaccine Compounds to Skin Antigen-Presenting Cells By Hair Follicles and their Transport in Mice. *Journal of Investigative Dermatology* **2009**, *129* (5), 1156-1164
- (93) Vogt, A.; Combadiere, B.; Hadam, S.; Stieler, K. M.; Lademann, J.; Schaefer, H.; Autran, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U. 40[thinsp]nm, but not 750 or 1,500[thinsp]nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a+ Cells after Transcutaneous Application on Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126* (6), 1316-1322
- (94) Mak, W. C.; Patzelt, A.; Richter, H.; Renneberg, R.; Lai, K. K.; Rühl, E.; Sterry, W.; Lademann, J. Triggering of drug release of particles in hair follicles. *Journal of controlled release* **2012**, *160* (3), 509-514
- (95) Rancan, F.; Giulbudagian, M.; Jurisch, J.; Blume-Peytavi, U.; Calderón, M.; Vogt, A. Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 4-11
- (96) Try, C.; Moulari, B.; Béduneau, A.; Fantini, O.; Pin, D.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Size dependent skin penetration of nanoparticles in murine and porcine dermatitis models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *100*, 101-108
- (97) Alnasif, N.; Zoschke, C.; Fleige, E.; Brodewolf, R.; Boreham, A.; Rühl, E.; Eckl, K.-M.; Merk, H.-F.; Hennies, H. C.; Alexiev, U.; Haag, R.; Kuchler, S.; Schäfer-Korting, M. Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core–multishell nanotransporters. *J. Controlled Release* **2014**, *185*, 45-50
- (98) Ramezanli, T.; Kilfoyle, B. E.; Zhang, Z.; Michniak-Kohn, B. B. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516* (1), 196-203
- (99) Zaric, M.; Lyubomska, O.; Touzelet, O.; Poux, C.; Al-Zahrani, S.; Fay, F.; Wallace, L.; Terhorst, D.; Malissen, B.; Henri, S.; Power, U. F.; Scott, C. J.; Donnelly, R. F.; Kissenpfennig, A. Skin Dendritic Cell Targeting via Microneedle Arrays Laden with Antigen-Encapsulated Poly-d,l-lactide-co-Glycolide Nanoparticles Induces Efficient Antitumor and Antiviral Immune Responses. *ACS nano* **2013**, *7* (3), 2042-2055
- (100) Ramezanli, T.; Zhang, Z.; Michniak-Kohn, B. B. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2017**, *13* (1), 143-152

- (101) Ramezanli, T.; Michniak-Kohn, B. B. Development and characterization of a topical gel formulation of adapalene-TyroSpheres and its clinical efficacy assessment. *Mol. Pharm.* **2018**,
- (102) Shah, K. A.; Date, A. A.; Joshi, M. D.; Patravale, V. B. Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *345* (1), 163-171
- (103) Jain, J.; Arora, S.; Rajwade, J. M.; Omay, P.; Khandelwal, S.; Paknikar, K. M. Silver Nanoparticles in Therapeutics: Development of an Antimicrobial Gel Formulation for Topical Use. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1388-1401
- (104) Bouwstra, J.; Hofland, H.; Spies, F.; Gooris, G.; Junginger, H. Changes in the structure of the human stratum corneum induced by liposomes. In *Liposome Dermatics*; Springer: 1992; pp 121-136.
- (105) Sinico, C.; Manconi, M.; Peppi, M.; Lai, F.; Valenti, D.; Fadda, A. M. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. *Journal of Controlled Release* **2005**, *103* (1), 123-136
- (106) Kirjavainen, M.; Urtti, A.; Jääskeläinen, I.; Suhonen, T. M.; Paronen, P.; Valjakka-Koskela, R.; Kiesvaara, J.; Mönkkönen, J. Interaction of liposomes with human skin in vitro—the influence of lipid composition and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1996**, *1304* (3), 179-189
- (107) Bouwstra, J. A.; Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Ponc, M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research* **2003**, *42* (1), 1-36
- (108) Zhai, Y.; Zhai, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *Journal of Controlled Release* **2014**, *193*, 90-99
- (109) Zhai, H.; Maibach, H. I. Effects of Skin Occlusion on Percutaneous Absorption: An Overview. *Skin Pharmacology and Physiology* **2001**, *14* (1), 1-10
- (110) Shim, J.; Seok Kang, H.; Park, W. S.; Han, S. H.; Kim, J.; Chang, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *97* (3), 477-84
- (111) Li, J.; Zhai, Y.; Zhang, B.; Deng, L.; Xu, Y.; Dong, A. Methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(D,L-lactic acid) copolymer nanoparticles as carriers for transdermal drug delivery. *Polymer International* **2008**, *57* (2), 268-274
- (112) Wu, X.; Griffin, P.; Price, G. J.; Guy, R. H. Preparation and in Vitro Evaluation of Topical Formulations Based on Polystyrene-poly-2-hydroxyl Methacrylate Nanoparticles. *Mol. Pharm.* **2009**, *6* (5), 1449-1456
- (113) Bachhav, Y.; Mondon, K.; Kalia, Y.; Gurny, R.; Möller, M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J. Controlled Release* **2011**, *153* (2), 126-132
- (114) Laredj-Bourezg, F.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Rovère, M.-R.; Smatti, B.; Chevalier, Y. Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). *Int. J. Pharm.* **2015**, *496* (2), 1034-1046
- (115) Lapteva, M.; Mondon, K.; Moller, M.; Gurny, R.; Kalia, Y. N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (9), 2989-3001
- (116) Rancan, F.; Todorova, A.; Hadam, S.; Papakostas, D.; Luciani, E.; Graf, C.; Gernert, U.; Rühl, E.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Stability of polylactic acid particles and release of fluorochromes upon topical application on human skin explants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80* (1), 76-84
- (117) Garg, T. Current nanotechnological approaches for an effective delivery of bio-active drug molecules in the treatment of acne. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2016**, *44* (1), 98-105
- (118) Pradhan, M.; Singh, D.; Singh, M. R. Novel colloidal carriers for psoriasis: Current issues, mechanistic insight and novel delivery approaches. *Journal of Controlled Release* **2013**, *170* (3), 380-395

- (119) Abdel-Mottaleb, M. M. A. Chapter 13 - Nanoparticles for Treatment of Atopic Dermatitis. In *Nanoscience in Dermatology*; Hamblin, M. R.; Avci, P.; Prow, T. W., Eds.; Academic Press: Boston, 2016; pp 167-175.
- (120) Matos, B. N.; Reis, T. A.; Gratieri, T.; Gelfuso, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. *International journal of biological macromolecules* **2015**, *75*, 225-229
- (121) Labala, S.; Jose, A.; Venuganti, V. V. K. Transcutaneous iontophoretic delivery of STAT3 siRNA using layer-by-layer chitosan coated gold nanoparticles to treat melanoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *146*, 188-197
- (122) Ammar, H. O.; Ghorab, M.; El-Nahhas, S. A.; Higazy, I. M. Proniosomes as a carrier system for transdermal delivery of tenoxicam. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *405* (1), 142-152
- (123) Santander-Ortega, M.; Stauner, T.; Loretz, B.; Ortega-Vinuesa, J. L.; Bastos-González, D.; Wenz, G.; Schaefer, U. F.; Lehr, C.-M. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *Journal of controlled release* **2010**, *141* (1), 85-92
- (124) Chandrashekar, B. S.; Anitha, M.; Ruparelia, M.; Vaidya, P.; Aamir, R.; Shah, S.; Thilak, S.; Aurangabadkar, S.; Pal, S.; Saraswat, A.; Sanmukhani, J. J. Tretinoin Nanogel 0.025% Versus Conventional Gel 0.025% in Patients with Acne Vulgaris: A Randomized, Active Controlled, Multicentre, Parallel Group, Phase IV Clinical Trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR* **2015**, *9* (1), WC04-WC09
- (125) Botelho, M. A.; Queiroz, D. B.; Barros, G.; Guerreiro, S.; Fechine, P.; Umbelino, S.; Lyra, A.; Borges, B.; Freitas, A.; de Queiroz, D. C.; Ruela, R.; Almeida, J. G.; Quintans, L. Nanostructured transdermal hormone replacement therapy for relieving menopausal symptoms: a confocal Raman spectroscopy study. *Clinics* **2014**, *69* (2), 75-82
- (126) Reinhold, U. A review of BF-200 ALA for the photodynamic treatment of mild-to-moderate actinic keratosis. *Future Oncology* **2017**, *13* (27), 2413-2428
- (127) Boisgard, A. S.; Lamrayah, M.; Dzikowski, M.; Salmon, D.; Kirilov, P.; Primard, C.; Pirot, F.; Fromy, B.; Verrier, B. 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**, *116*, 51-60
- (128) Rancan, F.; Papakostas, D.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Delair, T.; Primard, C.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Investigation of Polylactic Acid (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (8), 2027-2036
- (129) Tomoda, K.; Watanabe, A.; Suzuki, K.; Inagi, T.; Terada, H.; Makino, K. Enhanced transdermal permeability of estradiol using combination of PLGA nanoparticles system and iontophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *97*, 84-89
- (130) Tomoda, K.; Terashima, H.; Suzuki, K.; Inagi, T.; Terada, H.; Makino, K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin using combination of PLGA nanoparticles and iontophoresis in vivo. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2012**, *92*, 50-54
- (131) Luengo, J.; Weiss, B.; Schneider, M.; Ehlers, A.; Stracke, F.; König, K.; Kostka, K.-H.; Lehr, C.-M.; Schaefer, U. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin Pharmacology and Physiology* **2006**, *19* (4), 190-197
- (132) P. Shah, P.; R. Desai, P.; Singh, M. Effect of oleic acid modified polymeric bilayered nanoparticles on percutaneous delivery of spantide II and ketoprofen. *Journal of Controlled Release* **2012**, *158* (2), 336-345
- (133) Xue, B.; Wang, Y.; Tang, X.; Xie, P.; Wang, Y.; Luo, F.; Wu, C.; Qian, Z. Biodegradable self-assembled MPEG-PCL micelles for hydrophobic oridonin delivery in vitro. *Journal of biomedical nanotechnology* **2012**, *8* (1), 80-89
- (134) Conte, C.; Costabile, G.; d'Angelo, I.; Pannico, M.; Musto, P.; Grassia, G.; Ialenti, A.; Tirino, P.; Miro, A.; Ungaro, F.; Quaglia, F. Skin transport of PEGylated poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles assisted by (2-hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *454* (0), 112-120

- (135) Park, D.; Lee, J. Y.; Cho, H. K.; Hong, W. J.; Kim, J.; Seo, H.; Choi, I.; Lee, Y.; Kim, J.; Min, S.-J.; Yoon, S.-H.; Hwang, J. S.; Cho, K. J.; Kim, J. W. Cell-Penetrating Peptide-Patchy Deformable Polymeric Nanovehicles with Enhanced Cellular Uptake and Transdermal Delivery. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2682-2690
- (136) Vega, E.; Egea, M. A.; Garduño-Ramírez, M. L.; García, M. L.; Sánchez, E.; Espina, M.; Calpena, A. C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: Role of hydroxy- $\beta$ -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surf., B* **2013**, *110* (0), 339-346
- (137) Zhu, X.; Zeng, X.; Zhang, X.; Cao, W.; Wang, Y.; Chen, H.; Wang, T.; Tsai, H.-I.; Zhang, R.; Chang, D.; He, S.; Mei, L.; Shi, X. The effects of quercetin-loaded PLGA-TPGS nanoparticles on ultraviolet B-induced skin damages in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2016**, *12* (3), 623-632
- (138) Rastogi, R.; Anand, S.; Koul, V. Flexible polyerosomes—An alternative vehicle for topical delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, *72* (1), 161-166
- (139) Kilfoyle, B. E.; Sheihet, L.; Zhang, Z.; Laohoo, M.; Kohn, J.; Michniak-Kohn, B. B. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. *J. Controlled Release* **2012**, *163* (1), 18-24
- (140) Goyal, R.; Macri, L.; Kohn, J. Formulation Strategy for the Delivery of Cyclosporine A: Comparison of Two Polymeric Nanospheres. *Sci Rep* **2015**, *5*, 13065
- (141) Deng, P.; Teng, F.; Zhou, F.; Song, Z.; Meng, N.; Liu, N.; Feng, R. Y-shaped methoxy poly (ethylene glycol)-block-poly (epsilon-caprolactone)-based micelles for skin delivery of ketoconazole: in vitro study and in vivo evaluation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *78*, 296-304
- (142) Kosakowska, K. A.; Casey, B. K.; Kurtz, S. L.; Lawson, L. B.; Grayson, S. M. Evaluation of Amphiphilic Star/Linear–Dendritic Polymer Reverse Micelles for Transdermal Drug Delivery: Directing Carrier Properties by Tailoring Core versus Peripheral Branching. *Biomacromolecules* **2018**,
- (143) Djordjevic, J.; Michniak, B.; Uhrich, K. E. Amphiphilic star-like macromolecules as novel carriers for topical delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *AAPS pharmSci* **2003**, *5* (4), E26
- (144) Küchler, S.; Radowski, M. R.; Blaschke, T.; Dathe, M.; Plendl, J.; Haag, R.; Schäfer-Korting, M.; Kramer, K. D. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71* (2), 243-250
- (145) Du, F.; Hönzke, S.; Neumann, F.; Keilitz, J.; Chen, W.; Ma, N.; Hedtrich, S.; Haag, R. Development of biodegradable hyperbranched core-multishell nanocarriers for efficient topical drug delivery. *Journal of Controlled Release* **2016**, *242*, 42-49
- (146) Da Silva, C. L.; Del Ciampo, J. O.; Rossetti, F. C.; Bentley, M. V.; Pierre, M. B. Improved In vitro and In vivo Cutaneous Delivery of Protoporphyrin IX from PLGA-based Nanoparticles. *Photochemistry and photobiology* **2013**, *89* (5), 1176-1184
- (147) Kahraman, E.; ýzhan, G.; ýzsoy, Y.; Güngör, S. Polymeric micellar nanocarriers of benzoyl peroxide as potential follicular targeting approach for acne treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2016**, *146*, 692-699
- (148) OCDE. *Test No. 428: Skin Absorption: In Vitro Method*, OECD Publishing.
- (149) Scientific Committee on Consumer Safety, Basic criteria for the in vitro assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. In *SCSS/1358/10*, 2010.
- (150) Decuzzi, P.; Godin, B.; Tanaka, T.; Lee, S. Y.; Chiappini, C.; Liu, X.; Ferrari, M. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles. *Journal of Controlled Release* **2010**, *141* (3), 320-327
- (151) He, C.; Hu, Y.; Yin, L.; Tang, C.; Yin, C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* **2010**, *31* (13), 3657-3666
- (152) Wong, C.; Stylianopoulos, T.; Cui, J.; Martin, J.; Chauhan, V. P.; Jiang, W.; Popović, Z.; Jain, R. K.; Bawendi, M. G.; Fukumura, D. Multistage nanoparticle delivery system for deep penetration into tumor tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (6), 2426-2431

- (153) Cabral, H.; Matsumoto, Y.; Mizuno, K.; Chen, Q.; Murakami, M.; Kimura, M.; Terada, Y.; Kano, M. R.; Miyazono, K.; Uesaka, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nature Nanotechnology* **2011**, *6*, 815
- (154) Schuster, B. S.; Suk, J. S.; Woodworth, G. F.; Hanes, J. Nanoparticle diffusion in respiratory mucus from humans without lung disease. *Biomaterials* **2013**, *34* (13), 3439-46
- (155) Yin Win, K.; Feng, S.-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* **2005**, *26* (15), 2713-2722
- (156) Campbell, C. S. J.; Contreras-Rojas, L. R.; Delgado-Charro, M. B.; Guy, R. H. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. *Journal of Controlled Release* **2012**, *162* (1), 201-207
- (157) Baroli, B.; Ennas, M. G.; Loffredo, F.; Isola, M.; Pinna, R.; Arturo López-Quintela, M. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *Journal of Investigative Dermatology* **2007**, *127* (7), 1701-1712
- (158) Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337-351
- (159) Ryman-Rasmussen, J. P.; Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N. A. Penetration of Intact Skin by Quantum Dots with Diverse Physicochemical Properties. *Toxicological Sciences* **2006**, *91* (1), 159-165
- (160) Sonavane, G.; Tomoda, K.; Sano, A.; Ohshima, H.; Terada, H.; Makino, K. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008**, *65* (1), 1-10
- (161) Wu, J.; Liu, W.; Xue, C.; Zhou, S.; Lan, F.; Bi, L.; Xu, H.; Yang, X.; Zeng, F.-D. Toxicity and penetration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology Letters* **2009**, *191* (1), 1-8
- (162) Schaefer, H.; Watts, F.; Brod, J.; Illel, B. Follicular penetration. *Prediction of Percutaneous Penetration. Methods, Measurements, Modelling* **1990**, *163*, 732
- (163) Rolland, A.; Wagner, N.; Chatelus, A.; Shroot, B.; Schaefer, H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres. *Pharmaceutical research* **1993**, *10* (12), 1738-1744
- (164) Toll, R.; Jacobi, U.; Richter, H.; Lademann, J.; Schaefer, H.; Blume-Peytavi, U. Penetration Profile of Microspheres in Follicular Targeting of Terminal Hair Follicles. *J Investig Dermatol* **2003**, *123* (1), 168-176
- (165) Patzelt, A.; Richter, H.; Knorr, F.; Schäfer, U.; Lehr, C.-M.; Dähne, L.; Sterry, W.; Lademann, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J. Controlled Release* **2011**, *150* (1), 45-48
- (166) Verma, D. D.; Verma, S.; Blume, G.; Fahr, A. Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *258* (1), 141-151
- (167) Kuchler, S.; Abdel-Mottaleb, M.; Lamprecht, A.; Radowski, M. R.; Haag, R.; Schäfer-Korting, M. Influence of nanocarrier type and size on skin delivery of hydrophilic agents. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *377* (1-2), 169-172
- (168) De Vringer, T., Topical preparation containing a suspension of solid lipid particles. Google Patents: 1999.
- (169) Wissing, S.; Lippacher, A.; Müller, R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci* **2001**, *52* (5), 313-324
- (170) Müller, R. H.; Petersen, R. D.; Hommoss, A.; Pardeike, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59* (6), 522-530
- (171) Geng, Y.; Dalhaimer, P.; Cai, S.; Tsai, R.; Tewari, M.; Minko, T.; Discher, D. E. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery. *Nat Nano* **2007**, *2* (4), 249-255
- (172) Huang, X.; Teng, X.; Chen, D.; Tang, F.; He, J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* **2010**, *31* (3), 438-448

- (173) Chithrani, B. D.; Ghazani, A. A.; Chan, W. C. W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Letters* **2006**, *6* (4), 662-668
- (174) Dasgupta, S.; Auth, T.; Gompper, G. Shape and orientation matter for the cellular uptake of nonspherical particles. *Nano letters* **2014**, *14* (2), 687-693
- (175) Yang, K.; Ma, Y.-Q. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature nanotechnology* **2010**, *5* (8), 579-583
- (176) Tree-Udom, T.; Seemork, J.; Shigyou, K.; Hamada, T.; Sangphech, N.; Palaga, T.; Insin, N.; Pan-In, P.; Wanichwecharungruang, S. Shape Effect on Particle-Lipid Bilayer Membrane Association, Cellular Uptake, and Cytotoxicity. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (43), 23993-24000
- (177) Fernandes, R.; Smyth, N. R.; Muskens, O. L.; Nitti, S.; Heuer-Jungemann, A.; Ardern-Jones, M. R.; Kanaras, A. G. Interactions of skin with gold nanoparticles of different surface charge, shape, and functionality. *Small* **2015**, *11* (6), 713-721
- (178) Tak, Y. K.; Pal, S.; Naoghare, P. K.; Rangasamy, S.; Song, J. M. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci. Rep.* **2015**, *5*,
- (179) Wang, S.; Lu, W.; Tovmachenko, O.; Rai, U. S.; Yu, H.; Ray, P. C. Challenge in understanding size and shape dependent toxicity of gold nanomaterials in human skin keratinocytes. *Chemical Physics Letters* **2008**, *463* (1-3), 145-149
- (180) Zhang, L. W.; William, W. Y.; Colvin, V. L.; Monteiro-Riviere, N. A. Biological interactions of quantum dot nanoparticles in skin and in human epidermal keratinocytes. *Toxicology and applied pharmacology* **2008**, *228* (2), 200-211
- (181) Graf, C.; Nordmeyer, D.; Ahlberg, S.; Raabe, J.; Vogt, A.; Lademann, J.; Rancan, F.; Rühl, E. In *Penetration of spherical and rod-like gold nanoparticles into intact and barrier-disrupted human skin*, Colloidal Nanoparticles for Biomedical Applications X, International Society for Optics and Photonics: 2015; p 93381L.
- (182) Teixeira, Z.; Zanchetta, B.; Melo, B. A. G.; Oliveira, L. L.; Santana, M. H. A.; Paredes-Gamero, E. J.; Justo, G. Z.; Nader, H. B.; Guterres, S. S.; Durán, N. Retinyl palmitate flexible polymeric nanocapsules: Characterization and permeation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2010**, *81* (1), 374-380
- (183) Pegoraro, C.; Cecchin, D.; Madsen, J.; Warren, N.; Armes, S. P.; MacNeil, S.; Lewis, A.; Battaglia, G. Translocation of flexible polymersomes across pores at the nanoscale. *Biomaterials science* **2014**, *2* (5), 680-692
- (184) Anselmo, A. C.; Zhang, M.; Kumar, S.; Vogus, D. R.; Menegatti, S.; Helgeson, M. E.; Mitragotri, S. Elasticity of Nanoparticles Influences Their Blood Circulation, Phagocytosis, Endocytosis, and Targeting. *ACS nano* **2015**, *9* (3), 3169-3177
- (185) Zhang, L.; Cao, Z.; Li, Y.; Ella-Menye, J.-R.; Bai, T.; Jiang, S. Softer Zwitterionic Nanogels for Longer Circulation and Lower Splenic Accumulation. *ACS nano* **2012**, *6* (8), 6681-6686
- (186) Cevc, G.; Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1992**, *1104* (1), 226-232
- (187) Loan Honeywell-Nguyen, P.; de Graaff, A. M.; Wouter Groenink, H. W.; Bouwstra, J. A. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2002**, *1573* (2), 130-140
- (188) Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123* (5), 902-910
- (189) Lin, H.; Xie, Q.; Huang, X.; Ban, J.; Wang, B.; Wei, X.; Chen, Y.; Lu, Z. Increased skin permeation efficiency of imperatorin via charged ultradeformable lipid vesicles for transdermal delivery. *International Journal of Nanomedicine* **2018**, *13*, 831-842

- (190) Cevc, G.; Blume, G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1992**, *1104* (1), 226-232
- (191) Cevc, G.; Gebauer, D. Hydration-Driven Transport of Deformable Lipid Vesicles through Fine Pores and the Skin Barrier. *Biophysical Journal* **2003**, *84* (2), 1010-1024
- (192) Park, D.; Lee, J. Y.; Cho, H. K.; Hong, W. J.; Kim, J.; Seo, H.; Choi, I.; Lee, Y.; Kim, J.; Min, S. J.; Yoon, S. H.; Hwang, J. S.; Cho, K. J.; Kim, J. W. Cell-Penetrating Peptide-Patchy Deformable Polymeric Nanovehicles with Enhanced Cellular Uptake and Transdermal Delivery. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2682-2690
- (193) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small* **2010**, *6* (1), 12-21
- (194) Venkataraman, S.; Hedrick, J. L.; Ong, Z. Y.; Yang, C.; Ee, P. L. R.; Hammond, P. T.; Yang, Y. Y. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63* (14–15), 1228-1246
- (195) Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1-16
- (196) Xu, Q.; Ensign, L. M.; Boylan, N. J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.-C.; Lamb, N. W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E. Impact of surface polyethylene glycol (PEG) density on biodegradable nanoparticle transport in mucus ex vivo and distribution in vivo. *ACS nano* **2015**, *9* (9), 9217-9227
- (197) Tang, B. C.; Dawson, M.; Lai, S. K.; Wang, Y. Y.; Suk, J. S.; Yang, M.; Zeitlin, P.; Boyle, M. P.; Fu, J.; Hanes, J. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (46), 19268-73
- (198) Forier, K.; Messiaen, A. S.; Raemdonck, K.; Deschout, H.; Rejman, J.; De Baets, F.; Nelis, H.; De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Coenye, T.; Braeckmans, K. Transport of nanoparticles in cystic fibrosis sputum and bacterial biofilms by single-particle tracking microscopy. *Nanomedicine* **2013**, *8* (6), 935-49
- (199) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287-6305
- (200) Graf, C.; Gao, Q.; Schütz, I.; Noufele, C. N.; Ruan, W.; Posselt, U.; Korotianskiy, E.; Nordmeyer, D.; Rancan, F.; Hadam, S. Surface functionalization of silica nanoparticles supports colloidal stability in physiological media and facilitates internalization in cells. *Langmuir* **2012**, *28* (20), 7598-7613
- (201) Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B. J.; Dixon, D. Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media. *Gold bull.* **2011**, *44* (2), 99-105
- (202) Zhong, Y.; Meng, F.; Deng, C.; Zhong, Z. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (6), 1955-1969
- (203) Marro, D.; Guy, R. H.; Delgado-Charro, M. B. Characterization of the iontophoretic permselectivity properties of human and pig skin. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70* (1-2), 213-217
- (204) Wu, X.; Landfester, K.; Musyanovych, A.; Guy, R. H. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2010**, *23* (3), 117-123
- (205) Siqueira, N. M.; Contri, R. V.; Paese, K.; Beck, R. C. R.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. *Skin Pharmacology and Physiology* **2011**, *24* (3), 166-174
- (206) Kim, J.; Shim, J.; Kim, Y. J.; Char, K.; Suh, K. D.; Kim, J. W. The design of polymer-based nanocarriers for effective transdermal delivery. *Macromolecular bioscience* **2010**, *10* (10), 1171-1176
- (207) Abdel-Mottaleb, M. M.; Moulari, B.; Beduneau, A.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Surface-charge-dependent nanoparticles accumulation in inflamed skin. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (11), 4231-9

- (208) Gillet, A.; Compère, P.; Lecomte, F.; Hubert, P.; Ducat, E.; Evrard, B.; Piel, G. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *411* (1), 223-231
- (209) Manosroi, A.; Kongkaneromit, L.; Manosroi, J. Stability and transdermal absorption of topical amphotericin B liposome formulations. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, *270* (1), 279-286
- (210) Duangjit, S.; Pamornpathomkul, B.; Opanasopit, P.; Rojanarata, T.; Obata, Y.; Takayama, K.; Ngawhirunpat, T. Role of the charge, carbon chain length, and content of surfactant on the skin penetration of meloxicam-loaded liposomes. *International Journal of Nanomedicine* **2014**, *9*, 2005-2017
- (211) Hasanovic, A.; Winkler, R.; Resch, G. P.; Valenta, C. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of aciclovir. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (1), 76-81
- (212) Ogiso, T.; Yamaguchi, T.; Iwaki, M.; Tanino, T.; Miyake, Y. Effect of Positively and Negatively Charged Liposomes on Skin Permeation of Drugs. *Journal of Drug Targeting* **2001**, *9* (1), 49-59
- (213) Yang, Y.; Sunoqrot, S.; Stowell, C.; Ji, J.; Lee, C.-W.; Kim, J. W.; Khan, S. A.; Hong, S. Effect of size, surface charge, and hydrophobicity of poly (amidoamine) dendrimers on their skin penetration. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2154-2162
- (214) Kohli, A. K.; Alpar, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int. J. Pharm.* **2004**, *275* (1-2), 13-7
- (215) Hsiao, P. F.; Peng, S.; Tang, T.-C.; Lin, S.-Y.; Tsai, H.-C. Enhancing the in vivo transdermal delivery of gold nanoparticles using poly(ethylene glycol) and its oleylamine conjugate. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 1867-1878
- (216) Lee, O.; Jeong, S. H.; Shin, W. U.; Lee, G.; Oh, C.; Son, S. W. Influence of surface charge of gold nanorods on skin penetration. *Skin Research and Technology* **2013**, *19* (1), e390-e396
- (217) Mahmoud, N. N.; Alkilany, A. M.; Dietrich, D.; Karst, U.; Al-Bakri, A. G.; Khalil, E. A. Preferential accumulation of gold nanorods into human skin hair follicles: Effect of nanoparticle surface chemistry. *Journal of Colloid and Interface Science* **2017**, *503*, 95-102
- (218) Lopez, R. F. V.; Seto, J. E.; Blankschtein, D.; Langer, R. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate. *Biomaterials* **2011**, *32* (3), 933-941
- (219) Mu, L.; Seow, P. H. Application of TPGS in polymeric nanoparticulate drug delivery system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2006**, *47* (1), 90-97
- (220) Iannuccelli, V.; Bertelli, D.; Romagnoli, M.; Scalia, S.; Maretta, E.; Sacchetti, F.; Leo, E. In vivo penetration of bare and lipid-coated silica nanoparticles across the human stratum corneum. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *122*, 653-661
- (221) Raber, A. S.; Mittal, A.; Schafer, J.; Bakowsky, U.; Reichrath, J.; Vogt, T.; Schaefer, U. F.; Hansen, S.; Lehr, C. M. Quantification of nanoparticle uptake into hair follicles in pig ear and human forearm. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2014**, *179*, 25-32
- (222) Shah, P. P.; Desai, P. R.; Patel, A. R.; Singh, M. S. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. *Biomaterials* **2012**, *33* (5), 1607-1617
- (223) Jeon, S.; Yoo, C. Y.; Park, S. N. Improved stability and skin permeability of sodium hyaluronate-chitosan multilayered liposomes by Layer-by-Layer electrostatic deposition for quercetin delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *129*, 7-14
- (224) Rancan, F.; Gao, Q.; Graf, C.; Troppens, S.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Kembuan, C.; Blume-Peytavi, U.; Rühl, E.; Lademann, J. r. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS nano* **2012**, *6* (8), 6829-6842
- (225) Soenen, S. J.; Parak, W. J.; Rejman, J.; Manshian, B. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2109-2135

- (226) Labouta, H. I.; Liu, D. C.; Lin, L. L.; Butler, M. K.; Grice, J. E.; Raphael, A. P.; Kraus, T.; El-Khordagui, L. K.; Soyer, H. P.; Roberts, M. S.; Schneider, M.; Prow, T. W. Gold Nanoparticle Penetration and Reduced Metabolism in Human Skin by Toluene. *Pharmaceutical Research* **2011**, *28* (11), 2931
- (227) Mahmoud, N. N.; Al-Qaoud, K. M.; Al-Bakri, A. G.; Alkilany, A. M.; Khalil, E. A. Colloidal stability of gold nanorod solution upon exposure to excised human skin: Effect of surface chemistry and protein adsorption. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 223-231
- (228) Khurana, S.; Bedi, P. M.; Jain, N. K. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chemistry and physics of lipids* **2013**, *175-176*, 65-72
- (229) Schwarz, J. C.; Weixelbaum, A.; Pagitsch, E.; Low, M.; Resch, G. P.; Valenta, C. Nanocarriers for dermal drug delivery: influence of preparation method, carrier type and rheological properties. *Int J Pharm* **2012**, *437* (1-2), 83-8
- (230) Batheja, P.; Sheihet, L.; Kohn, J.; Singer, A. J.; Michniak-Kohn, B. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2011**, *149* (2), 159-67
- (231) Moddarese, M.; Brown, M. B.; Zhao, Y.; Tamburic, S.; Jones, S. A. The role of vehicle-nanoparticle interactions in topical drug delivery. *Int J Pharm* **2010**, *400* (1-2), 176-82
- (232) Patzelt, A.; Richter, H.; Dähne, L.; Walden, P.; Wiesmüller, K.-H.; Wank, U.; Sterry, W.; Lademann, J. Influence of the Vehicle on the Penetration of Particles into Hair Follicles. *Pharmaceutics* **2011**, *3* (2), 307
- (233) Zhao, Y.; Moddarese, M.; Jones, S. A.; Brown, M. B. A dynamic topical hydrofluoroalkane foam to induce nanoparticle modification and drug release in situ. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *72* (3), 521-528
- (234) Vijayan, V.; Reddy, K. R.; Sakthivel, S.; Swetha, C. Optimization and characterization of repaglinide biodegradable polymeric nanoparticle loaded transdermal patches: In vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *111*, 150-155
- (235) Hossain, M. A.; Lalloz, A.; Benhaddou, A.; Pagniez, F.; Raymond, M.; Le Pape, P.; Simard, P.; Théberge, K.; Leblond, J. Econazole imprinted textiles with antifungal activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *101*, 137-144
- (236) Abrego, G.; Alvarado, H.; Souto, E. B.; Guevara, B.; Bellowa, L. H.; Garduño, M. L.; Garcia, M. L.; Calpena, A. C. Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles for skin administration: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, *501* (1), 350-361
- (237) Trauer, S.; Richter, H.; Kuntsche, J.; Büttemeyer, R.; Liebsch, M.; Linscheid, M.; Fahr, A.; Schäfer-Korting, M.; Lademann, J.; Patzelt, A. Influence of massage and occlusion on the ex vivo skin penetration of rigid liposomes and invasomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, *86* (2), 301-306
- (238) Leite-Silva, V. R.; Liu, D. C.; Sanchez, W. Y.; Studier, H.; Mohammed, Y. H.; Holmes, A.; Becker, W.; Grice, J. E.; Benson, H. A.; Roberts, M. S. Effect of flexing and massage on in vivo human skin penetration and toxicity of zinc oxide nanoparticles. *Nanomedicine* **2016**, *11* (10), 1193-1205
- (239) McAllister, D. V.; Wang, P. M.; Davis, S. P.; Park, J.-H.; Canatella, P. J.; Allen, M. G.; Prausnitz, M. R. Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (24), 13755-13760
- (240) Coulman, S. A.; Anstey, A.; Gateley, C.; Morrissey, A.; McLoughlin, P.; Allender, C.; Birchall, J. C. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *366* (1-2), 190-200
- (241) Zhang, W.; Gao, J.; Zhu, Q.; Zhang, M.; Ding, X.; Wang, X.; Hou, X.; Fan, W.; Ding, B.; Wu, X. Penetration and distribution of PLGA nanoparticles in the human skin treated with microneedles. *International journal of pharmaceutics* **2010**, *402* (1-2), 205-212

- (242) Vitorino, C.; Almeida, A.; Sousa, J.; Lamarche, I.; Gobin, P.; Marchand, S.; Couet, W.; Olivier, J.-C.; Pais, A. Passive and active strategies for transdermal delivery using co-encapsulating nanostructured lipid carriers: In vitro vs. in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2014**, *86* (2), 133-144
- (243) Tomoda, K.; Terashima, H.; Suzuki, K.; Inagi, T.; Terada, H.; Makino, K. Enhanced transdermal delivery of indomethacin-loaded PLGA nanoparticles by iontophoresis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *88* (2), 706-710
- (244) Huber, L. A.; Pereira, T. A.; Ramos, D. N.; Rezende, L. C.; Emery, F. S.; Sobral, L. M.; Leopoldino, A. M.; Lopez, R. F. Topical skin cancer therapy using doxorubicin-loaded cationic lipid nanoparticles and iontophoresis. *Journal of biomedical nanotechnology* **2015**, *11* (11), 1975-1988
- (245) Rastogi, R.; Anand, S.; Koul, V. Electroporation of polymeric nanoparticles: an alternative technique for transdermal delivery of insulin. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2010**, *36* (11), 1303-1311
- (246) Genina, E. A.; Dolotov, L. E. e.; Bashkatov, A. N.; Terentyuk, G. S.; Maslyakova, G. N.; Zubkina, E. A.; Tuchin, V. V.; Yaroslavsky, I.; Altshuler, G. B. Fractional laser microablation of skin aimed at enhancing its permeability for nanoparticles. *Quantum Electronics* **2011**, *41* (5), 396
- (247) Genina, E. A.; Bashkatov, A. N.; Dolotov, L. E.; Maslyakova, G. N.; Kochubey, V. I.; Yaroslavsky, I. V.; Altshuler, G. B.; Tuchin, V. V. Transcutaneous delivery of micro-and nanoparticles with laser microporation. *Journal of biomedical optics* **2013**, *18* (11), 111406
- (248) Ramadan, S.; Guo, L.; Li, Y.; Yan, B.; Lu, W. Hollow copper sulfide nanoparticle-mediated transdermal drug delivery. *Small* **2012**, *8* (20), 3143-3150
- (249) Kuo, T.-R.; Wu, C.-L.; Hsu, C.-T.; Lo, W.; Chiang, S.-J.; Lin, S.-J.; Dong, C.-Y.; Chen, C.-C. Chemical enhancer induced changes in the mechanisms of transdermal delivery of zinc oxide nanoparticles. *Biomaterials* **2009**, *30* (16), 3002-3008
- (250) Patel, P.; Schmieder, S.; Krishnamurthy, K. Research Techniques Made Simple: Drug Delivery Techniques, Part 2: Commonly Used Techniques to Assess Topical Drug Bioavailability. *Journal of Investigative Dermatology* **2016**, *136* (5), e43-e49
- (251) Jui-Chen, T.; Weiner, N. D.; Flynn, G. L.; Ferry, J. Properties of adhesive tapes used for stratum corneum stripping. *International Journal of Pharmaceutics* **1991**, *72* (3), 227-231
- (252) Jensen, L. B.; Petersson, K.; Nielsen, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (1), 68-75
- (253) Tsai, J.-C.; Shen, L.-C.; Sheu, H.-M.; Lu, C.-C. Tape stripping and sodium dodecyl sulfate treatment increase the molecular weight cutoff of polyethylene glycol penetration across murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* **2003**, *295* (4), 169-174
- (254) Tsai, J.-C.; Sheu, H.-M.; Hung, P.-L.; Cheng, C.-L. Effect of barrier disruption by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities: Implications for the permeability of compromised skin. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (9), 1242-1254
- (255) Gopee, N. V.; Roberts, D. W.; Webb, P.; Cozart, C. R.; Siitonen, P. H.; Latendresse, J. R.; Warbitton, A. R.; Yu, W. W.; Colvin, V. L.; Walker, N. J. Quantitative determination of skin penetration of PEG-coated CdSe quantum dots in dermabrased but not intact SKH-1 hairless mouse skin. *Toxicological sciences* **2009**, *111* (1), 37-48
- (256) Döge, N.; Hönzke, S.; Schumacher, F.; Balzus, B.; Colombo, M.; Hadam, S.; Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Schäfer-Korting, M.; Schindler, A.; Rühl, E.; Skov, P. S.; Church, M. K.; Hedtrich, S.; Kleuser, B.; Bodmeier, R.; Vogt, A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J. Controlled Release* **2016**, *242*, 25-34
- (257) Monteiro-Riviere, N.; Zhang, L. Assessment of quantum dot penetration into skin in different species under different mechanical actions. In *Nanomaterials: risks and benefits*; Springer: 2009; pp 43-52.

- (258) Larese, F. F.; D'Agostin, F.; Crosera, M.; Adami, G.; Renzi, N.; Bovenzi, M.; Maina, G. Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin. *Toxicology* **2009**, *255* (1), 33-37
- (259) Mortensen, L. J.; Oberdörster, G.; Pentland, A. P.; DeLouise, L. A. In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. *Nano letters* **2008**, *8* (9), 2779-2787
- (260) Monteiro-Riviere, N. A.; Wiench, K.; Landsiedel, R.; Schulte, S.; Inman, A. O.; Riviere, J. E. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an in vitro and in vivo study. *Toxicological Sciences* **2011**, *123* (1), 264-280
- (261) Miquel-Jeanjean, C.; Crépel, F.; Raufast, V.; Payre, B.; Datas, L.; Bessou-Touya, S.; Duplan, H. Penetration study of formulated nanosized titanium dioxide in models of damaged and sun-irradiated skins. *Photochemistry and photobiology* **2012**, *88* (6), 1513-1521
- (262) Hung, C.-F.; Chen, W.-Y.; Hsu, C.-Y.; Aljuffali, I. A.; Shih, H.-C.; Fang, J.-Y. Cutaneous penetration of soft nanoparticles via photodamaged skin: Lipid-based and polymer-based nanocarriers for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2015**, *94*, 94-105
- (263) Jin, H.; He, R.; Oyoshi, M.; Geha, R. S. Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* **2009**, *129* (1), 31-40
- (264) Nakajima, K.; Sano, S. Mouse models of psoriasis and their relevance. *J Dermatol* **2018**, *45* (3), 252-263
- (265) Mirshahpanah, P.; Maibach, H. I. Models in acneogenesis. *Cutaneous and ocular toxicology* **2007**, *26* (3), 195-202
- (266) Ansell, D. M.; Holden, K. A.; Hardman, M. J. Animal models of wound repair: Are they cutting it? *Exp Dermatol* **2012**, *21* (8), 581-5
- (267) Rofstad, E. K.; Lyng, H. Xenograft model systems for human melanoma. *Molecular Medicine Today* **1996**, *2* (9), 394-403
- (268) Amberg, N.; Holcman, M.; Glitzner, E.; Novoszel, P.; Stulnig, G.; Sibilja, M. Mouse models of nonmelanoma skin cancer. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2015**, *1267*, 217-50
- (269) Semlin, L.; Schäfer-Korting, M.; Borelli, C.; Korting, H. C. In vitro models for human skin disease. *Drug Discovery Today* **2011**, *16* (3), 132-139
- (270) Zhang, N.; Said, A.; Wischke, C.; Kral, V.; Brodwolf, R.; Volz, P.; Boreham, A.; Gerecke, C.; Li, W.; Neffe, A. T.; Kleuser, B.; Alexiev, U.; Lendlein, A.; Schäfer-Korting, M. Poly[acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles – Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, *116*, 66-75
- (271) Contri, R. V.; Fiel, L. A.; Alnasif, N.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Schäfer-Korting, M. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. *Int. J. Pharm.* **2016**, *507* (1), 12-20
- (272) Boakye, C. H. A.; Patel, K.; Singh, M. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. *Int. J. Pharm.* **2015**, *489* (1), 106-116
- (273) Senzui, M.; Tamura, T.; Miura, K.; Ikarashi, Y.; Watanabe, Y.; Fujii, M. Study on penetration of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles into intact and damaged skin in vitro. *The Journal of toxicological sciences* **2010**, *35* (1), 107-113
- (274) Lin, L. L.; Grice, J. E.; Butler, M. K.; Zvyagin, A. V.; Becker, W.; Robertson, T. A.; Soyer, H. P.; Roberts, M. S.; Prow, T. W. Time-correlated single photon counting for simultaneous monitoring of zinc oxide nanoparticles and NAD (P) H in intact and barrier-disrupted volunteer skin. *Pharmaceutical research* **2011**, *28* (11), 2920
- (275) Štecová, J.; Mehnert, W.; Blaschke, T.; Kleuser, B.; Sivaramakrishnan, R.; Zouboulis, C. C.; Seltmann, H.; Korting, H. C.; Kramer, K. D.; Schäfer-Korting, M. Cyproterone Acetate Loading to Lipid Nanoparticles for Topical Acne Treatment: Particle Characterisation and Skin Uptake. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (5), 991-1000

- (276) Abdel-Mottaleb, M. M. A.; Moulari, B.; Beduneau, A.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Nanoparticles enhance therapeutic outcome in inflamed skin therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2012**, *82* (1), 151-157
- (277) Ostrowski, A.; Nordmeyer, D.; Boreham, A.; Brodewolf, R.; Mundhenk, L.; Fluhr, J. W.; Lademann, J.; Graf, C.; Rühl, E.; Alexiev, U.; Gruber, A. D. Skin barrier disruptions in tape stripped and allergic dermatitis models have no effect on dermal penetration and systemic distribution of AHAPS-functionalized silica nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2014**, *10* (7), 1571-1581
- (278) Filipe, P.; Silva, J. N.; Silva, R.; Cirne de Castro, J. L.; Marques Gomes, M.; Alves, L. C.; Santos, R.; Pinheiro, T. Stratum Corneum Is an Effective Barrier to TiO<sub>2</sub> and ZnO Nanoparticle Percutaneous Absorption. *Skin Pharmacology and Physiology* **2009**, *22* (5), 266-275
- (279) Du, F.; Hönzke, S.; Neumann, F.; Keilitz, J.; Chen, W.; Ma, N.; Hedtrich, S.; Haag, R. Development of biodegradable hyperbranched core-multishell nanocarriers for efficient topical drug delivery. *Journal of Controlled Release*,
- (280) Ishihara, K.; Nakabayashi, N. Specific interaction between water-soluble phospholipid polymer and liposome. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1991**, *29* (6), 831-835
- (281) Kojima, M.; Ishihara, K.; Watanabe, A.; Nakabayashi, N. Interaction between phospholipids and biocompatible polymers containing a phosphorylcholine moiety. *Biomaterials* **1991**, *12* (2), 121-124
- (282) Feng, W.; Zhu, S.; Ishihara, K.; Brash, J. L. Protein resistant surfaces: Comparison of acrylate graft polymers bearing oligo-ethylene oxide and phosphorylcholine side chains. *Biointerphases* **2006**, *1* (1), 50-60
- (283) Jin, Q.; Chen, Y.; Wang, Y.; Ji, J. Zwitterionic drug nanocarriers: A biomimetic strategy for drug delivery. *Colloids Surf., B* **2014**, *124*, 80-86
- (284) Chrit, L.; Bastien, P.; Biatry, B.; Simonnet, J. T.; Potter, A.; Minondo, A. M.; Flament, F.; Bazin, R.; Sockalingum, G. D.; Leroy, F.; Manfait, M.; Hadjur, C. In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: Assessment of a new moisturizing agent, pMPC. *Biopolymers* **2007**, *85* (4), 359-369
- (285) Kanekura, T.; Nagata, Y.; Miyoshi, H.; Ishihara, K.; Nakabayashi, N.; Kanzaki, T. Beneficial effects of synthetic phospholipid polymer, poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate), on stratum corneum function. *Clin. Exp. Dermatol.* **2002**, *27* (3), 230-234
- (286) Lee, A.-R. C. Phospholipid polymer, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine and its skin barrier function. *Archives of pharmacal research* **2004**, *27* (11), 1177-1182

# **-Chapitre II-**

## **Synthèse d'une librairie de copolymères biocompatibles**

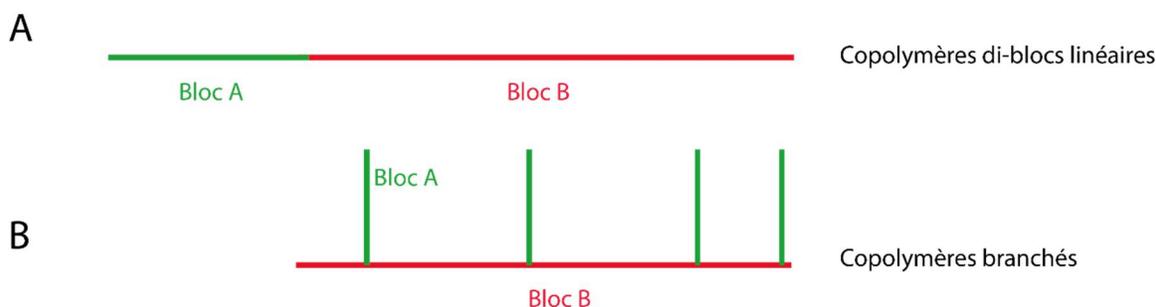
## 2.1 Introduction

Ce projet de thèse vise à étudier l'influence de la composition hydrophile de NPs polymériques sur la pénétration cutanée d'une molécule active hydrophobe modèle et sur les mécanismes d'interactions peau-NPs. Le but de cette partie préliminaire est donc de présenter la synthèse d'une librairie de copolymères à base de PLA. Les polymères synthétisés comportant différentes compositions hydrophiles servent de matériel à la fabrication des NPs. Le bloc lipophile PLA a été choisi en raison de la facilité de sa synthèse, de son caractère biodégradable et de sa capacité à encapsuler des molécules hydrophobes.

Les polymères synthétisés varieront par :

- la nature du polymère hydrophile lié au bloc PLA hydrophobe : PEG ou PMPC
- leur caractère amphiphile : différentes tailles de bloc hydrophile
- leur architecture : polymères linéaires ou « branchés »

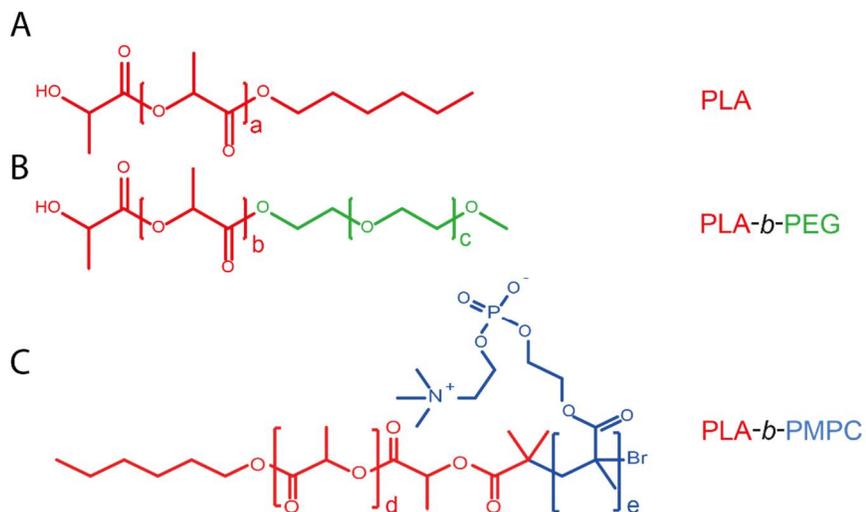
Différentes architectures de copolymères amphiphiles à base de PLA sont en effet envisageables pour leur utilisation sous forme de NPs. L'architecture polymérique de copolymères amphiphiles la plus commune est une structure linéaire en diblocs ou en multiblocs<sup>1</sup> (**Figure 2.1A**) pouvant être obtenue soit par couplage des blocs hydrophobes et hydrophiles<sup>2</sup>, soit par polymérisation de PLA par ouverture de cycle en utilisant le PEG comme macroinitiateur<sup>1</sup>. Des structures multiblocs linéaires sont également disponibles<sup>3</sup>. Néanmoins, cette architecture linéaire limite le nombre de fonctionnalisations possibles des polymères et/ou le nombre de blocs hydrophiles dans les chaînes polymériques, car seuls les groupements chimiques aux extrémités sont réactifs et donc fonctionnalisables. Des architectures de type « branché » ont ainsi été développées pour permettre plus de fonctionnalisations des poly(esters) et/ou d'insertion de blocs hydrophiles. Cette architecture se base sur une copolymérisation d'acide lactique avec d'autres monomères cycliques possédant les fonctions souhaitées et/ou possédant des groupements fonctionnalisables<sup>4-5</sup>. Des « branches » sont ainsi formées sur un squelette linéaire de polyester (**Figure 2.1B**).



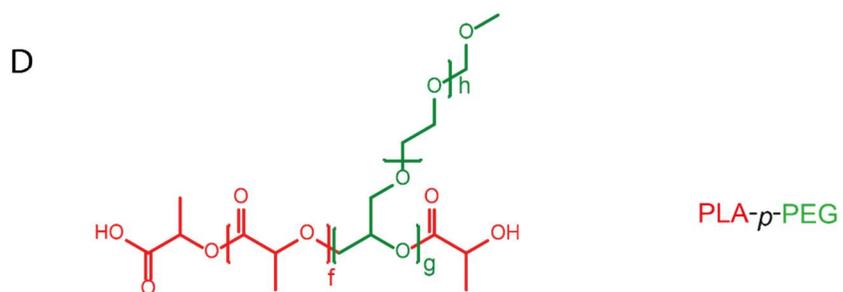
**Figure 2.1** Représentation schématique des copolymères d'architecture linéaire (A) ou branchée (B). Le bloc A représente le bloc hydrophile et le bloc B le bloc hydrophobe.

Dans cette étude, les polymères d'architecture « linéaire » ont été synthétisés selon les techniques couramment utilisées dans le laboratoire du Pr. Hildgen (copolymérisation par ouverture de cycle en utilisant le PEG comme amorceur). Concernant la synthèse des polymères d'architecture branchée, une voie de synthèse alternative, nécessitant moins d'étapes que les méthodes synthèses préalablement développées au laboratoire<sup>4-12</sup>, a été utilisée. Les méthodes de synthèse ont été choisies et optimisées pour obtenir des masses molaires de squelettes lipophiles PLA entre 10 et 40 kDa, c'est-à-dire suffisamment élevées pour que les polymères ne soient pas solubles dans l'eau et forment des particules solides, mais également assez faibles pour permettre la libération des substances encapsulées en un et assurer la dégradation *in vivo* des polymères en un temps suffisamment court<sup>5</sup>. De plus, pour s'assurer du devenir et de la distribution des NPs dans les milieux biologiques, il est important de pouvoir les visualiser par une technique simple. Pour les NPs polymériques, l'utilisation de la fluorescence est par exemple possible à condition d'avoir des groupements fluorescents liés de manière covalente au polymère. Un polymère fluorescent a donc été développé à cette fin. La structure des différents polymères synthétisés est présentée dans la **figure 2.2** suivante.

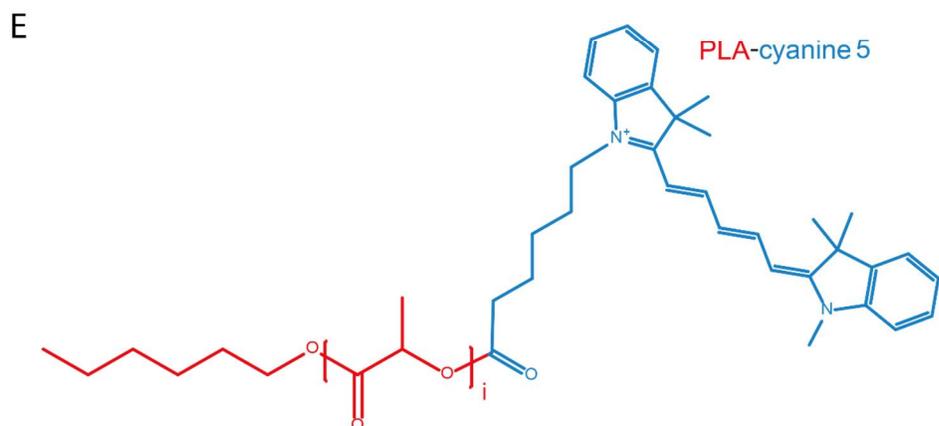
Polymères linéaires



Polymères branchés



Polymère fluorescent



**Figure 2.2** Structures chimiques des polymères de la librairie synthétisée

## 2.2 Matériel et Méthodes

### 2.2.1 Matériel

Le toluène, le méthanol (MeOH), le dichlorométhane (DCM), l'hexane, le diméthyl sulfoxide (DMSO), le tétrahydrofurane (THF) de grade analytique, le sulfate de sodium anhydre ont été fournis par Fisher Scientific (Loughborough, UK). Le D,L-dilactide (3,6-diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione), le poly(éthylène glycol) monométhyle éther (mPEG-OH) (0.55, 1, 2, 5 and 10 kg/mol), l'octanoate d'étain (Sn(Oct)<sub>2</sub>), l'hydrure de sodium dispersé dans de l'huile minérale (60 %), le toluène anhydre, le N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le 4'-Diméthylaminopyridine (DMAP), le chloroforme deutéré, le DCM anhydre, l'éther diéthylique, le CuBr, le 2,2'-bipyridine, le  $\alpha$ -bromoisobutyryl bromure, et le 2-Méthacryloyloxyéthyl phosphorylcholine (MPC) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). L'hexanol provient des Laboratoires MAT (Québec, Canada). L'éthylène diamine tétraacétique (EDTA) a été fourni par BDH (Dubai, UAE). Le mPEG-époxyde 550 Da provient de la compagnie Creative PEGWorks (Chapel Hill, USA). Le méthanol deutéré provient de Euriso Top (Saint Aubin, France).

Les solvants ont été utilisés tels quels. Le D,L-dilactide a été purifié par recristallisation dans le toluène et séché une nuit sous vide juste avant emploi. Le mPEG-OH a été séché dans le DCM sous sulfate de sodium anhydre et séché sous vide une nuit avant emploi.

### 2.2.2 Méthodes

#### 2.2.2.1 Méthodes utilisées pour la caractérisation des polymères

##### 2.2.2.1.1 Résonance Magnétique Nucléaire

La composition chimique des polymères synthétisés a été vérifiée par la méthode non destructive de résonance magnétique nucléaire du proton (<sup>1</sup>H RMN) en solution. Les polymères ont été analysés sur un spectromètre Varian MR 400 MHz, de la plateforme de Biophysique de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (Université de Montréal).

### 2.2.2.1.2 Chromatographie de Perméation de Gel

La masse molaire moyenne des polymères synthétisés a été mesurée par chromatographie de perméation de gel (CPG ou GPC en anglais), aussi appelée chromatographie d'exclusion stérique. Cette méthode de chromatographie permet d'obtenir la masse molaire moléculaire moyenne en poids ( $M_w$ ) et en nombre ( $M_n$ ) tout comme la distribution de la taille des chaînes polymériques, représentée par l'indice de polydispersité ( $IP = M_w/M_n$ ).

Pour analyser leur masse molaire, les polymères ont été dissous dans la phase mobile, le THF, à une concentration de 5 mg/mL et filtrés à 0,45  $\mu$ m. Le système chromatographique à calibration externe était un système Breeze® de Waters (Waters Corp., Milford, MA, USA) équipé d'une pompe binaire 1525 de chromatographie liquide haute performance (« high performance liquide chromatography » en anglais, HPLC), de trois colonnes CPG consécutives (Phenogel 5  $\mu$ m, Phenomenex, USA), d'un détecteur à indice de réfraction et d'un passeur d'échantillon 717 plus. Le THF a été utilisé comme solvant d'élution. L'élution s'est déroulée à une température de colonne de 35°C et un débit de THF de 1 mL/min. La calibration a été réalisée en utilisant des standards de polystyrène linéaire de masses molaires  $M_w$  comprises entre 600 et 400 000 g/mol.

La masse molaire de certains polymères branchés (synthèse en solution) a été caractérisée par une méthode CPG avec détection par diffusion de la lumière/réfractométrie. Le système de chromatographie consistait en une pompe isocratique Agilent 1100, un détecteur de diffusion de lumière multi-angles Dawn EOS (Wyatt) et un réfractomètre interférométrique Optilab DSP (Wyatt).

### 2.2.2.2 Synthèse de polymères linéaires (A, B, C)

#### 2.2.2.2.1 Synthèse de polymères PLA (A)

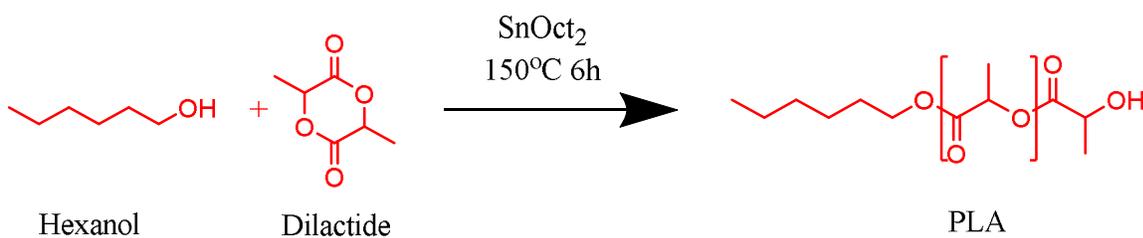
Les homopolymères PLA ont été synthétisés en masse à l'état fondu, c'est-à-dire sans solvant, par une méthode par ouverture de cycle du D,L-dilactide initiée par de l'hexanol et catalysée par du Sn(Oct)<sub>2</sub>. Le protocole a été adapté de celui reporté par Rabanel *et al.*<sup>5</sup> avec quelques modifications.

Le schéma réactionnel est présenté dans la **figure 2.3**.

Le D,L-dilactide a été ajouté dans un ballon à deux cols équipé d'une pale d'agitation mécanique, avec l'hexanol (1 pour 200 unités acide lactique (AL),  $5 \cdot 10^{-3}$  éq. AL) et le  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  ( $2 \cdot 10^{-4}$  éq. AL). Sous atmosphère d'argon, le mélange réactionnel a été agité à  $150^\circ\text{C}$  pendant 6 heures à 100 tours/minutes. À la fin de la réaction, après son refroidissement jusqu'à température ambiante, le polymère formé a été dissous dans du DCM. Pour purifier le polymère des oligomères et du D,L-dilactide qui n'a pas réagi, deux extractions liquide-liquide (eau : DCM) successives ont été réalisées. La phase organique DCM a ensuite été séchée par du sulfate de sodium anhydre puis filtrée sous Buchner pour retirer le sulfate de sodium, avant une double précipitation du polymère dans de l'hexanol. Le polymère a finalement été séché sous vide pendant 48 heures pour retirer le solvant.

La polymérisation du PLA a été vérifiée par  $^1\text{H}$  RMN. La masse moléculaire du polymère a été obtenue par CPG.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.3–1.5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 5.2 (m, 1H, CH).



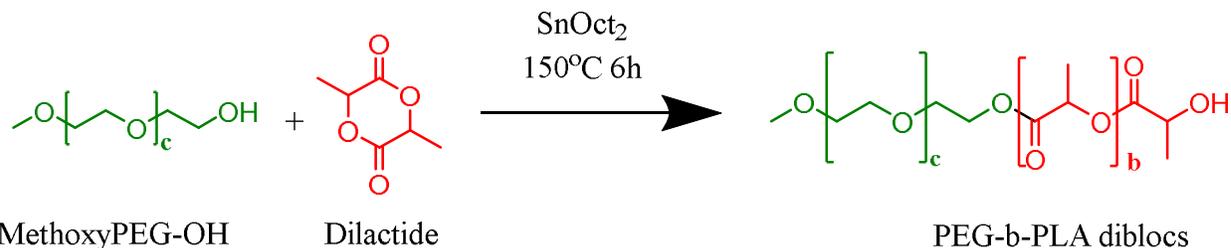
**Figure 2.3** Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA

#### 2.2.2.2.2 Synthèse de polymères PLA-*b*-PEG diblocs (B)

La voie de synthèse des polymères PLA-PEG diblocs est similaire à celle du PLA. Dans ce cas, le méthoxyPEG-OH a été substitué à l'hexanol pour l'initiation des chaînes de PLA (1 PEG pour 200 ou 250 AL,  $5 \cdot 10^{-3}$  ou  $4 \cdot 10^{-3}$  éq. AL). Différentes tailles de méthoxyPEG-OH ont été utilisées pour l'obtention de la librairie (0,55, 1, 2, 5, 10 kDa). Après synthèse, les polymères ont été purifiés par précipitations successives dans le MeOH froid pour retirer le PEG libre, non lié au PLA.

Les polymères possédant cette architecture sont nommés PLA-*b*-PEG tout au long de ce manuscrit, le symbole *b* signifiant que le polymère PEG est en « bloc ».

Le schéma réactionnel est présenté dans la **figure 2.4**.



**Figure 2.4** Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA-*b*-PEG (c= 12, 22, 45, 114 ou 227)

La structure et la quantité de PEG des polymères PLA-*b*-PEG ont été vérifiées par <sup>1</sup>H RMN.

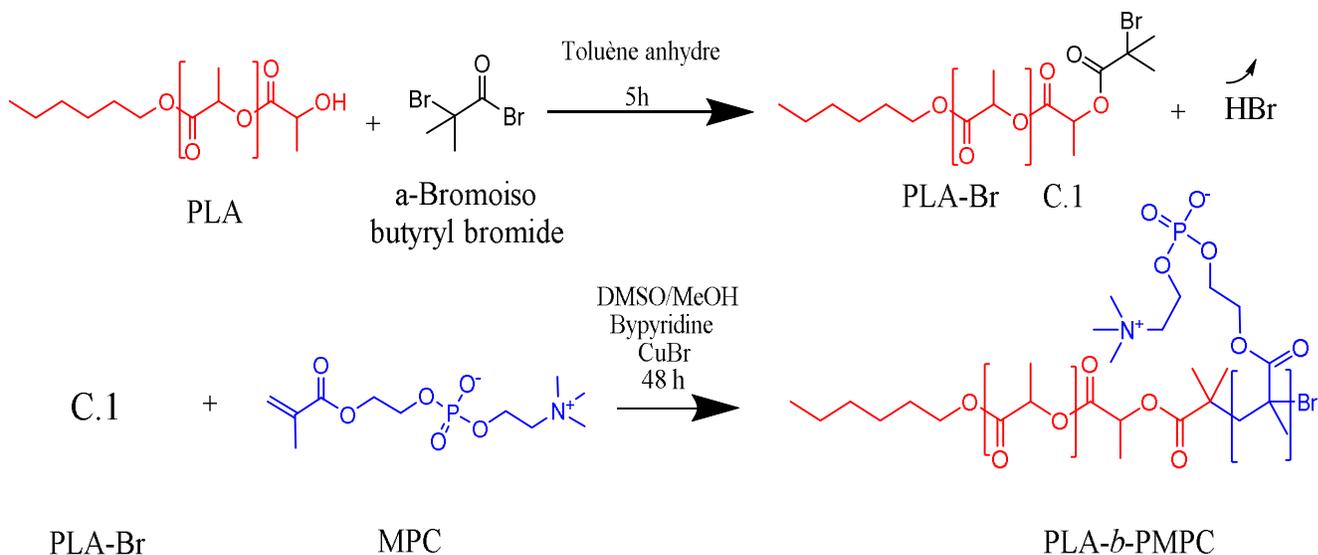
La masse molaire des polymères a été déterminée par CPG.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,3–1,5 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,65 (m, 2H), 5,2 (m, 1H, CH).

#### 2.2.2.2.3 Synthèse de polymère PLA-*b*-PMPC diblocs (C)

Le polymère de PLA-*b*-PMPC a été synthétisé par une méthode de polymérisation ATRP selon le protocole de Hsiue *et al*<sup>13</sup>. La voie de synthèse est présentée en **figure 2.5**.

Trois étapes ont été nécessaires à l'obtention de ce polymère : i) synthèse d'un polymère de PLA, ii) synthèse du macro-amorceur ATRP PLA-Br C.1 par bromation du polymère de PLA et iii) élongation des chaînes polymériques de PLA-Br par le MPC.



**Figure 2.5** Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA-*b*-PMPC

**i) Synthèse du bloc PLA**

La voie de synthèse et de purification du PLA est décrite dans la partie 2.2.2.2.1. Le bloc PLA synthétisé en vue de la fabrication de PLA-*b*-PMPC a été caractérisé par une masse molaire de 20 kDa.

**ii) Synthèse du macroinitiateur ATRP PLA-Br**

Le macroinitiateur de PLA-Br C.1 a été synthétisé par l'addition de bromure d' $\alpha$ -bromoisobutyryl aux groupements terminaux hydroxyles du PLA. Le PLA (20 kDa) a été dissous par 20 mL de toluène anhydre dans un ballon sous barbotage d'argon. Le ballon a ensuite été déposé dans un bain de glace avant d'ajouter le bromure d' $\alpha$ -bromoisobutyryl (5 éq. des groupements OH terminaux du PLA) goutte à goutte au milieu réactionnel. Après 5 heures de réaction sous agitation magnétique, le macroinitiateur a été purifié par 3 précipitations successives dans un mélange hexane/éther diéthylique (9:1, v/v). La modification des extrémités OH des chaînes de PLA a été vérifiée par  $^1\text{H}$  RMN et la masse moléculaire du macroinitiateur a été obtenue par CPG.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,3–1,5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1,98 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ), 5,2 (m, 1H, CH)

**iii) Synthèse du copolymère PLA-*b*-PMPC diblocs par ATRP**

L'élongation des chaînes de PLA a été réalisée par synthèse par ATRP. Le polymère de PLA-Br préalablement synthétisé et le monomère de MPC (40 éq. Br) ont été dissous dans un mélange DMSO/ MeOH (1:1 v/v) sous barbotage d'argon pendant 20 minutes. Le ligand 2,2'-bipyridine (2 éq. Br) et le catalyseur CuBr (1 éq. Br) ont ensuite été ajoutés au milieu réactionnel. Après 48 heures de réaction sous argon, le milieu réactionnel a été exposé à l'oxygène pour terminer la réaction de polymérisation du MPC. Le polymère a été purifié par une dialyse de 12 heures contre de l'eau et un excès d'EDTA (avec renouvellement du milieu de contre dialyse) pour enlever l'excès de monomères de MPC qui n'a pas réagi ainsi que les espèces cuivrées. Une seconde dialyse de 48 heures contre de l'eau a été réalisée pour retirer l'EDTA. Le polymère a ensuite été séché par lyophilisation pendant 72 heures. La structure et la masse molaire du polymère final ont été obtenues par <sup>1</sup>H RMN.

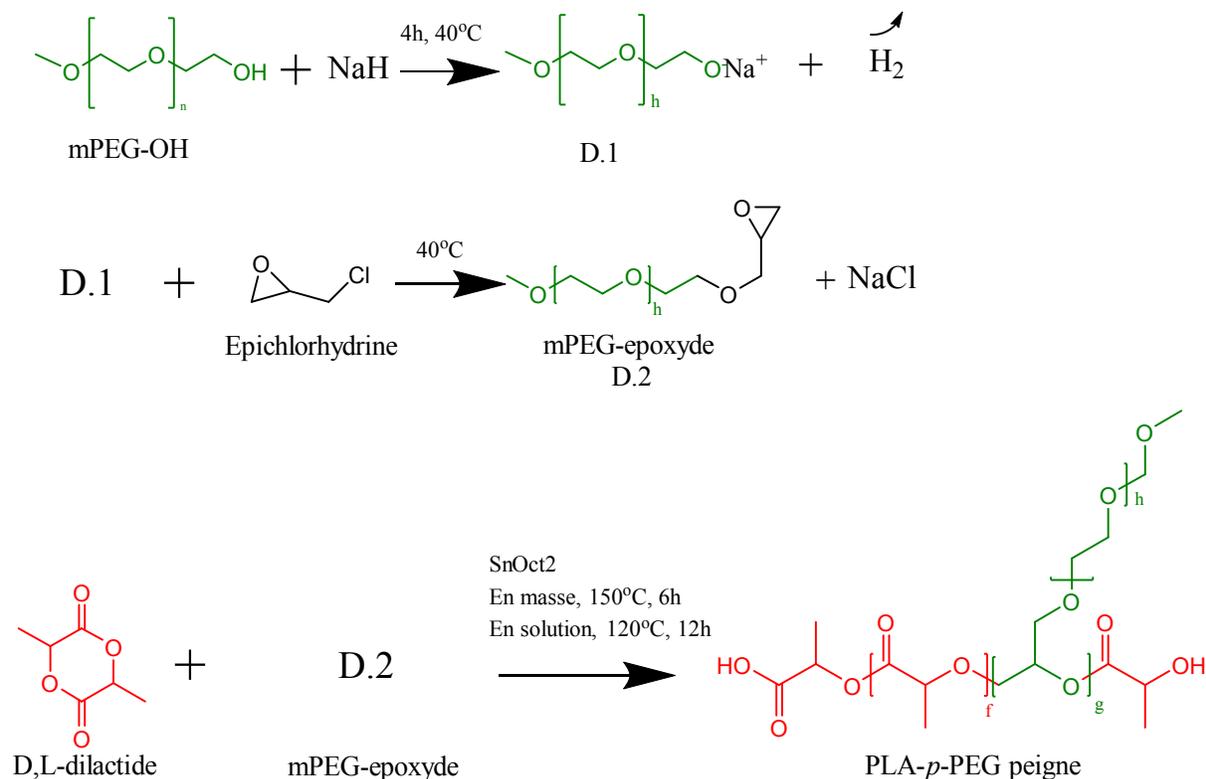
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD): δ 1,3–1,5 (*m*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,4 (*s*, 9H, CH<sub>3</sub>), 3,8 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,1 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 4,3 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>) 5,2 (*m*, 1H, CH)

**2.2.2.3 Synthèse de polymères PLA-PEG « branchés » (D)**

La voie de synthèse utilisée pour développer cette librairie de polymères branchés était une copolymérisation par ouverture de cycle entre du D,L-dilactide et du PEG-époxyde catalysée par l'octanoate d'étain. Cette voie de synthèse alternative est basée sur les travaux de Cho *et al.*<sup>14</sup>. Cette synthèse s'est déroulée selon deux étapes séparées de réaction : i) la synthèse de mPEG-époxyde à partir de mPEG-OH et ii) la copolymérisation du mPEG-époxyde avec le D,L-dilactide pour obtenir le polymère. Contrairement aux polymères diblocs linéaires, dans cette synthèse le cycle du mPEG-époxyde peut s'insérer théoriquement à tout endroit de la chaîne de PLA en croissance.

Les polymères possédant cette architecture sont nommés PLA-*p*-PEG dans ce manuscrit de thèse, le symbole *p* signifiant que le polymère PEG est en « chaînes pendantes ». Le schéma réactionnel est présenté dans la **figure 2.6**.

Différentes masses molaires de PEG (0,55, 1, 2 5 kDa) et différents ratios PEG/PLA ont été utilisées. Le mPEGépoxyde 0,55 kDa est un polymère commercial tandis que les PEG d'autres masses molaires ont été fonctionnalisées suivant la voie de synthèse 2.2.2.3.i).



**Figure 2.6** Schéma réactionnel de la synthèse du polymère PLA-*p*-PEG (h= 12, 22, 45, ou 114)

*i) Synthèse de mPEG-époxyde à partir de mPEG-OH*

Le mPEG-OH a tout d'abord été déprotoné par la base forte hydrure de sodium NaH pour former le mPEG-O<sup>-</sup>Na<sup>+</sup> (D.1). Pour cela, le mPEG préalablement séché a été dissous dans du THF anhydre puis injecté dans un ballon contenant du NaH (4 eq.) préalablement purifié de son huile. Le milieu réactionnel a été dégazé sous argon et laissé sous agitation à 40 °C. Après 4 heures de réaction, l'épichlorhydrine (10 eq.) a été ajoutée sous argon pour permettre l'époxydation du mPEG-ONa<sup>+</sup>. Le milieu réactionnel a été laissé sous agitation à 40 °C pendant une nuit. La réaction a été arrêtée par ajout de quelques gouttes d'eau. Le polymère obtenu a ensuite été purifié par une double précipitation dans de l'éther diéthylique, puis dissous dans du DCM. La phase organique a ensuite été séchée sous sulfate de sodium anhydre puis filtrée sous Büchner

pour retirer le sulfate de sodium et les cristaux de NaCl formés lors de la réaction. Le polymère mPEG-époxyde (D.2) a ensuite été séché sous vide pendant 48 heures puis a été conservé à l'abri de l'humidité jusqu'à utilisation. La conversion du mPEG-OH en mPEG-époxyde a été vérifiée par  $^1\text{H}$  RMN.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  2,6 (d, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 2,8 (d, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 3,1 (m, 1H, CH) 3,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,65 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ )

### ii) Copolymérisation du mPEG-époxyde et du D,L-dilactide

Les polymères de PLA-*p*-PEG ont été synthétisés en masse ou en solution dans le toluène par copolymérisation par ouvertures des cycles du D,L-dilactide et du mPEG-époxyde et catalysée par du  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ . L'influence du procédé de synthèse sur les caractéristiques des polymères a été étudiée.

#### a. Synthèse en masse

La méthode de synthèse des polymères PLA-*p*-PEG branchés en masse était à celle des polymères PLA-*b*-PEG. Dans ce cas, le mPEG-époxyde a été substitué au mPEG-OH. La structure et la quantité de PEG des polymères PLA-*p*-PEG ont été vérifiées par  $^1\text{H}$  RMN. La masse molaire des polymères a été déterminée par CPG.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1,3–1,5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,38 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3,65 (m, 2H), 5,2 (m, 1H, CH).

#### b. Synthèse en solution dans le toluène

Pour la méthode de synthèse en solution, le D,L-dilactide a été ajouté dans un ballon, contenant du toluène anhydre et  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  ( $2 \cdot 10^{-4}$  eq. AL) et le mPEG-époxyde (1 PEG pour 50, 100 ou 200 AL, soit  $2 \cdot 10^{-2}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$  ou  $5 \cdot 10^{-3}$  eq. AL), soit en 1 fois (à  $t=0$ ), soit en 4 fois au cours de la réaction (à  $t=0$ , 3, 6, et 9 heures). Le milieu réactionnel a été mélangé pendant 12 heures sous agitation magnétique, chauffage à reflux à 120 °C et atmosphère d'argon. À différents temps de réaction, le polymère a été analysé par  $^1\text{H}$  RMN pour étudier la conversion des unités AL en PLA et l'ouverture des cycles époxydes des chaînes de PEG.

À la fin de la réaction, le toluène a été évaporé sous vide et le polymère obtenu a été dissous dans du DCM. La purification et le séchage des polymères étaient identiques à ceux des PLA-*b*-PEG.

La structure et la quantité de PEG des polymères PLA-*p*-PEG ont été vérifiées par <sup>1</sup>H RMN. La masse molaire des polymères a été déterminée par CPG.

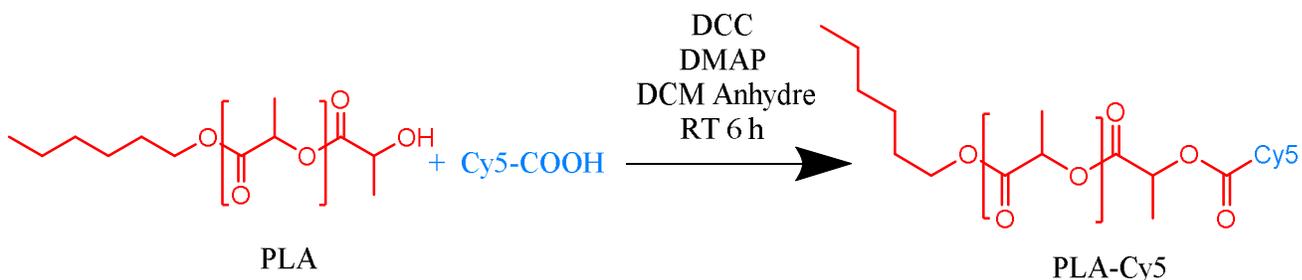
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,3–1,5 (*m*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.38 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,65 (*m*, 2H), 5,2 (*m*, 1H, CH).

#### 2.2.2.4 Synthèse de polymère fluorescent PLA-Cy5 (E)

La synthèse du polymère fluorescent PLA-Cyanine5 (PLA-CY5) a été réalisée par une réaction de couplage DCC/DMAP par estérification entre le fluorophore Cyanine 5-COOH et le PLA (extrémité OH). Le schéma réactionnel est présenté dans la **figure 2.7**.

Le fluorophore Cy5-COOH a été préalablement synthétisé au laboratoire selon le protocole de Kvach *et al.*<sup>15</sup>.

Le fluorophore Cy5-COOH (2,5 eq, 18 mg, 3,5×10<sup>-5</sup> mol), le DMAP (0,5 eq, ~ 1,2 mg, 0,7×10<sup>-5</sup> mol), et le DCC (2,5 eq, 35 μL, 3,5×10<sup>-5</sup> mol) ont été introduits dans un ballon préalablement séché sous vide contenant 5 mL de dichlorométhane anhydre dégazé par bullage d'argon. Le ballon a été placé sous agitation à température ambiante et atmosphère d'argon durant 15 minutes. À l'issue, le polymère de PLA (PLA2) a été introduit (1 eq, 0,5 g, 1,4×10<sup>-5</sup> mol d'extrémités OH). Le ballon a ensuite été scellé et la réaction a été laissée à agiter durant 6 heures à température ambiante, sous atmosphère d'argon et à l'abri de la lumière. Le polymère fluorescent a ensuite été purifié des fluorophores libres par précipitations répétées dans du méthanol froid, jusqu'à atteindre une phase de méthanol non colorée (vérification par fluorescence). Le polymère a finalement été séché sous vide pendant 48 heures pour retirer le solvant.



**Figure 2.7** Schéma réactionnel de la synthèse du polymère fluorescent PLA-Cy5

## 2.3 Résultats et Discussions

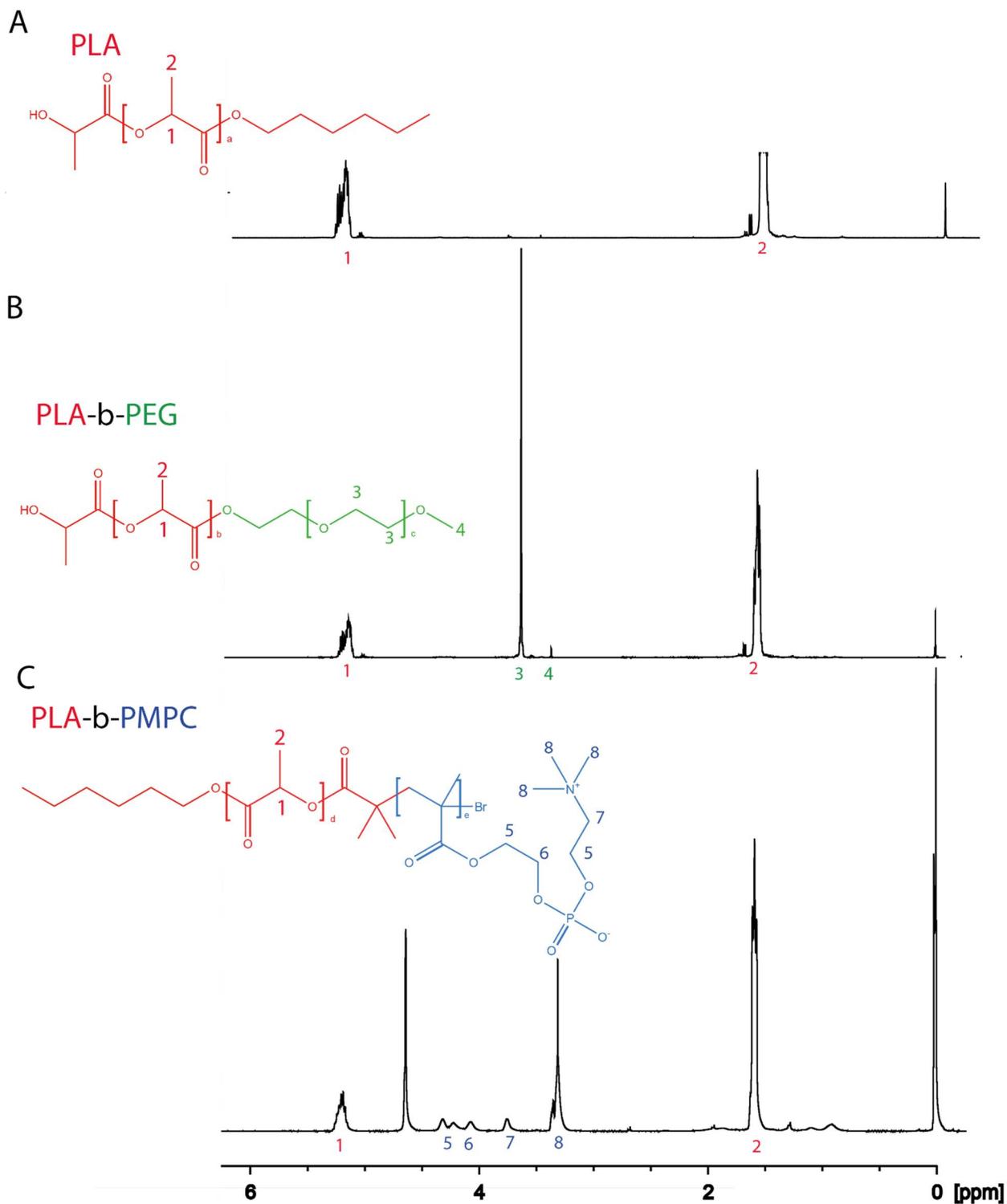
### 2.3.1 Librairie de polymères linéaires

Une librairie de 14 polymères amphiphiles à base de PLA, d'architecture linéaire, et comportant différentes natures et quantités de blocs hydrophiles et différentes fonctionnalisations a été obtenue par des méthodes de polymérisation par ouverture de cycle, ATRP et couplage par estérification. L'efficacité de la polymérisation, le pourcentage massique réel de bloc hydrophile dans les polymères et la masse molaire des polymères ont été déterminés par les techniques RMN et CPG détaillées dans la partie 2.2.21 *Méthodes utilisées pour la caractérisation des polymères*. Les spectres RMN typiques des polymères de PLA, PLA-*b*-PEG et PLA-*b*-PMPC sont présentés dans la **figure 2.8**. Les structures des polymères sont rappelées afin de pouvoir comprendre l'attribution des signaux RMN.

La polymérisation du D, L-dilactide en PLA a été vérifiée par la disparition des signaux RMN provenant des protons du D, L-dilactide (5,1 ppm et 1,6 ppm) et l'apparition de signaux RMN dus aux protons du PLA (5,2 et 1,3-1,5 ppm). À partir des intégrations des signaux correspondant aux protons caractéristiques du PLA et du PEG, il a été possible d'estimer directement la masse molaire des PLA-*b*-PEG par RMN. En effet, en connaissant la taille du PEG et en assumant que chaque chaîne de polymère contient une extrémité PEG, il est possible de calculer le degré de polymérisation (DP) du bloc PLA et donc sa masse molaire. La masse molaire de ces polymères a également été directement déterminée par CPG, tout comme celles des homopolymères PLA.

La masse molaire du polymère PLA-*b*-PMPC a été déterminée par RMN en ayant au préalable déterminé la masse molaire du bloc lipophile (PLA-Br) par CPG.

En connaissant la masse molaire des blocs hydrophiles et la masse molaire totale des polymères, le pourcentage de bloc hydrophile dans les polymères (% p/p) a été calculé. Plus le % p/p de bloc hydrophile dans le polymère est élevé, plus les polymères vont avoir un comportement amphiphile, se rapprochant des caractéristiques des tensioactifs.



**Figure 2.8** Structure des polymères synthétisés et spectres RMN typiques. (A) PLA, (B) PLA-*b*-PEG2K 12,2 %<sub>p/p</sub> théorique, (C) PLA-*b*-PMPC

Les caractéristiques des polymères linéaires synthétisés, *i.e.* le contenu en bloc hydrophile théorique et réel ainsi que les valeurs de masse molaire, sont indiquées dans le **tableau 2.1**. La nomenclature des polymères diblocs PLA-*b*-PEG est faite selon la masse molaire du PEG utilisés (ex : PLA-*b*-PEG1K pour un polymère diblocs avec une taille de PEG de 1kDa)

#### 2.3.1.1 Caractéristiques des polymères diblocs linéaires PLA-*b*-PEG

Les polymères PLA-*b*-PEG synthétisés possèdent des %<sub>p/p</sub> de bloc hydrophile entre 0 et 38 %, avec une masse molaire dans la gamme 10-40 kDa (centrée vers 20 kDa) et une polydispersité acceptable de 1,3 en moyenne. Cette masse molaire permet l'utilisation de ces polymères en tant que matériel pour la fabrication de NPs. La similarité des résultats de masse molaire provenant des études RMN et CPG confirment leur exactitude. Il a néanmoins été observé que les copolymères PLA-*b*-PEG possédaient une masse molaire significativement inférieure à celle des homopolymères de PLA, bien que le même ratio amorceur / acide lactique ait été utilisé. Ce ratio est pourtant une façon de contrôler la masse molaire des polymères, car chaque amorceur doit théoriquement commencer la polymérisation d'une chaîne de polymère<sup>16</sup>. L'explication de cette tendance n'est pas claire, mais il est possible que i) le mPEG-OH PEG apporte de l'humidité résiduelle dans le mélange, favorisant les réactions de transestérification ou que ii) l'hexanol soit un moins bon amorceur que le macroinitiateur mPEG-OH. Un moyen d'obtenir un degré de polymérisation du PLA pour les copolymères diblocs plus important et plus proche des homopolymères PLA a donc été d'augmenter la quantité d'AL (voir **tableau 2.1**, passage d'un ratio PEG/AL de 1/200 à 1/250)

Comme attendu, d'une manière générale il a été observé que plus la taille du PEG utilisé pour l'amorçage était élevée, plus le %<sub>p/p</sub> de PEG dans les chaînes polymériques augmentait. Les %<sub>p/pl</sub> réels de PEG après purification pour retirer le PEG libre, proches des pourcentages théoriques, confirment ainsi une polymérisation du PLA convenablement initiée par l'amorceur mPEG-OH (**Tableau 2.1**).

#### 2.3.1.2 Caractéristiques du polymère PLA-*b*-PMPC

Le polymère PLA-*b*-PMPC synthétisé possède 37,9 %<sub>p/p</sub> de PMPC avec un bloc de PLA de 20 kDa, soit un degré de polymérisation de PMPC de 41. Le bloc hydrophile de PMPC est donc comparable en termes d'unités de répétition à un bloc de PEG de 2 kDa (DP = 45)

**Tableau 2.1** Propriétés de la librairie de polymères linéaires synthétisée

Polymères	Ratio amorceur/ AL	Contenu théorique en bloc hydrophile [%p/p <sub>total</sub> ]	Masse molaire <i>M<sub>n</sub></i> (CPG) [g/mol]	Masse molaire <i>M<sub>w</sub></i> (CPG) [g/mol]	Masse molaire <i>M<sub>w</sub></i> (RMN) * [g/mol]	Indice de polydispersité <i>PdI</i> (CPG) **	Contenu réel en bloc hydrophile (CPG) *** [%p/p <sub>total</sub> ]	Contenu réel en bloc hydrophile (RMN) *** [%p/p <sub>total</sub> ]
PLA1	1/200	-	30 500	38 500	ND	1,3	-	-
PLA2	1/250	-	26 700	36 300	ND	1,3	-	-
PLA- <i>b</i> -PEG0.55 K	1/200	3,7	10 200	12 500	11 000 [a]	1,2	4,4	5
PLA- <i>b</i> -PEG1K	1/200	6,5	14 500	17 500	23 800 [a]	1,2	5,7	4,2
PLA- <i>b</i> -PEG1K	1/250	5,3	18 200	26 500	32 300 [a]	1,4	3,8	3,1
PLA- <i>b</i> -PEG2K	1/200	12,2	14 600	23 500	17 500 [a]	1,8	8,5	11,4
PLA- <i>b</i> -PEG2K	1/200	12,2	10 100	19 100	17 700 [a]	1,8	10,5	11,3
PLA- <i>b</i> -PEG2K	1/200	14,9	17 000	23 900	13 600 [a]	1,4	8,3	14,7
PLA- <i>b</i> -PEG2K	1/250	10	14 600	22 300	23 300 [a]	1,5	8,9	8,6
PLA- <i>b</i> -PEG5K	1/200	25,8	10 490	12 560	17 500 [a]	1,2	40	28,5
PLA- <i>b</i> -PEG5K	1/250	21,7	14 700	19 100	20 100 [a]	1,3	26,2	24,9
PLA- <i>b</i> -PEG10K	1/250	35,7	20 100	27 900	40 800 [a]	1,4	35,8	24,5
PLA- <i>b</i> -PMPC		-	-	-	32 400 [b]	-	37,9	37,9

\* [a] La masse molaire totale est calculée à partir du nombre de monomères AL et EG par chaîne de polymérique en assumant que chaque chaîne polymérique contient un motif PEG. Le nombre de monomères AL par chaîne est obtenu à partir de l'intégration de l'intensité du signal du PLA (5,2 ppm) en calibration la valeur de l'intégration du signal du PEG (3,6 ppm) en fonction du nombre de protons présents. [b] la masse molaire totale du polymère a été déterminée en connaissant la masse molaire du bloc PLA-Br obtenu par CPG (20 100 g/mol) et donc le nombre d'AL par chaîne et en assumant que chaque chaîne contient une extrémité PMPC.

\*\* calculé à partir de l'analyse de masse molaire par CPG  $PdI = M_w/M_n$

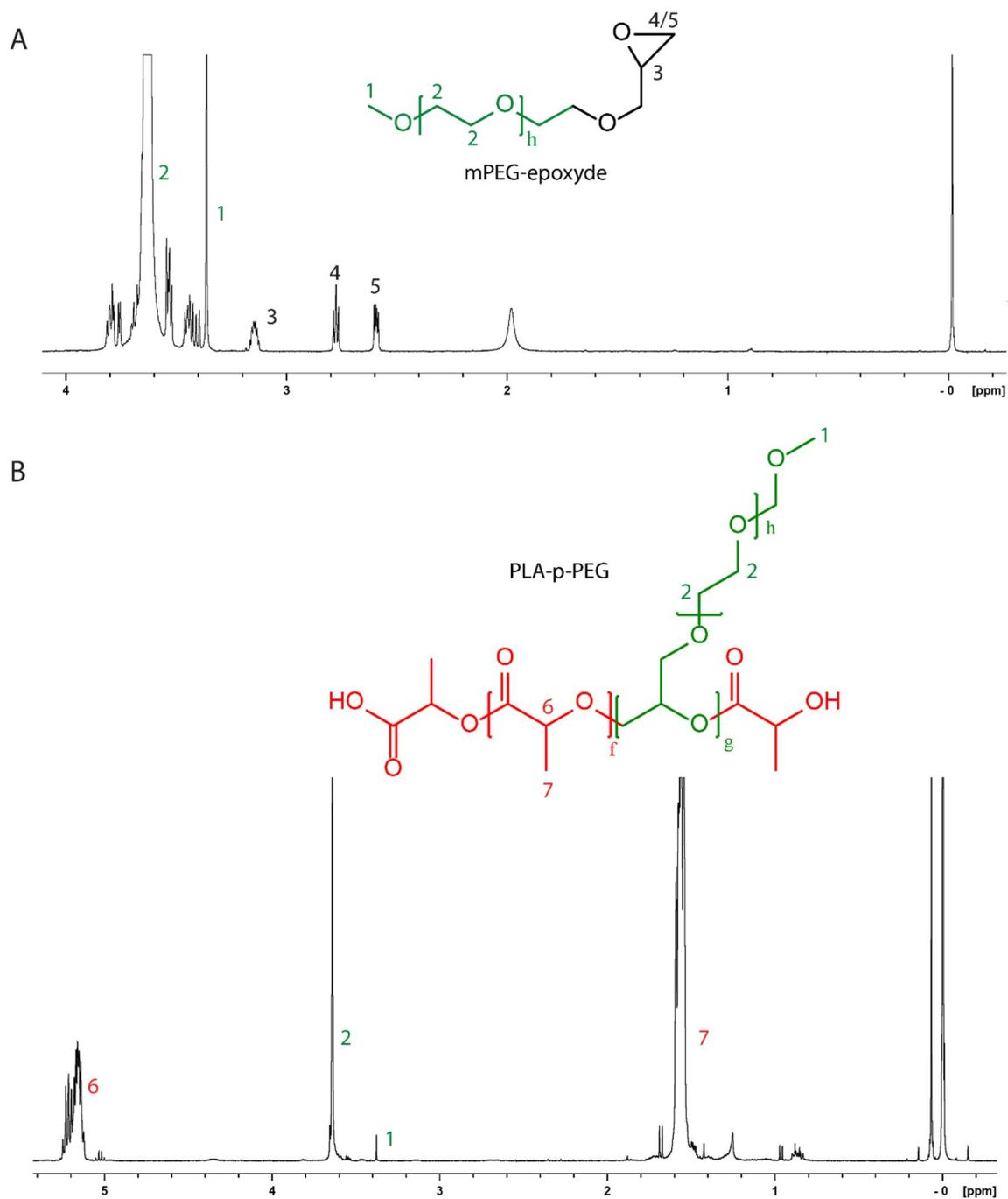
$$*** \%p/p \text{ bloc hydrophile} = \frac{M_w \text{ bloc hydrophile}}{(M_w \text{ totale})} \times 100$$

### 2.3.2 Librairie de polymères branchés

La voie de synthèse utilisée pour la synthèse de polymères PLA-*p*-PEG branchés est une copolymérisation par ouverture de cycle entre du D,L-dilactide et du mPEG-époxyde. Le cycle époxyde porté sur le PEG doit s'ouvrir pour s'insérer aléatoirement dans la chaîne de PLA en croissance.

La première étape de cette synthèse résidait dans la fonctionnalisation de mPEG-OH en mPEG-époxyde, dont l'efficacité pouvait être suivie par RMN avec l'apparition de protons spécifiques du cycle époxyde. Des mPEG-OH de 1, 2, et 5 kDa ont été fonctionnalisés avec un taux de fonctionnalisation de 80, 95 et 96 % respectivement. La **figure 2.9A** présente un spectre RMN typique du polymère mPEG-époxyde.

La seconde étape de synthèse, i.e. la copolymérisation, a été réalisée soit en synthèse en masse comme les polymères linéaires diblocs, soit en solution dans le toluène. Un spectre typique des polymères PLA-*p*-PEG est présenté en **figure 2.9B**. Comme pour les polymères linéaires, l'efficacité de la polymérisation et le pourcentage de blocs hydrophiles dans les polymères ont été déterminés par RMN. Néanmoins, dans le cas de ces polymères branchés, il n'est pas possible de déterminer la masse molaire des polymères par RMN, car cette structure de polymère permet théoriquement d'avoir plusieurs chaînes de PEG par chaîne. La masse molaire a donc uniquement été obtenue par CPG. À partir de la masse molaire obtenue par CPG et du % *p/p* de PEG obtenu par RMN, il a ensuite été possible de déterminer le nombre d'extrémités PEG pendantes par chaîne de polymère.



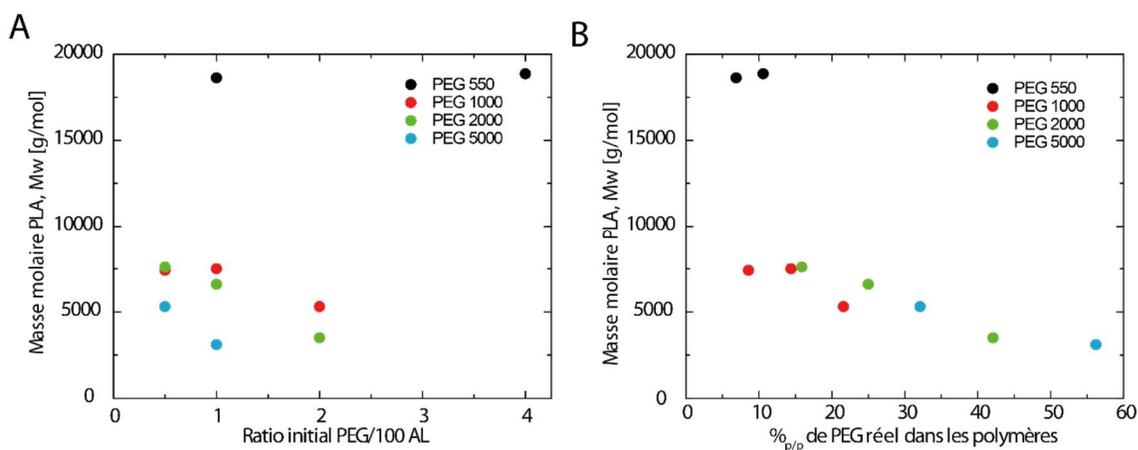
**Figure 2.9** Structures des mPEG-époxyde et des polymères branchés synthétisés et spectres RMN typiques. (A) mPEG-époxyde2K, (B) PLA-*p*-PEG2K 12.2 %<sub>o/p</sub> théorique

### 2.3.2.1 Synthèse en masse

Les caractéristiques des polymères PLA-*p*-PEG obtenus par synthèse en masse sont présentées dans le **tableau 2.2**. La nomenclature des polymères branchés PLA-*p*-PEG est faite selon la

masse molaire du PEG utilisé (ex : PLA-*p*-PEG1K pour un polymère avec des branches de PEG de 1kDa).

Bien que les polymères branchés possèdent des contenus en PEG similaires à ceux des polymères diblocs linéaires (entre 7 et 56 %<sub>p/p</sub>), il a été observé que leur masse molaire était significativement plus faible (entre 7 et 20 KDa) (**Tableau 2.2**) avec une tendance à la diminution lorsque le contenu en PEG (taille et quantité) dans le polymère augmente (**Figures 2.10A et B**).



**Figure 2.10** Masse molaire du squelette PLA obtenu par synthèse en masse en fonction (A) du ratio initial PEG/AL dans le milieu réactionnel et (B) du pourcentage réel de PEG inséré dans les polymères

De plus, les polymères PLA-*p*-PEG synthétisés en masse ne possédaient environ qu'un seul bloc PEG/chaîne de polymères, sauf pour les polymères de PLA-*p*-PEG0.55 qui en possèdent 2. L'insertion d'une chaîne de PEG dans la chaîne de PLA en croissance semble donc empêcher l'insertion d'autres chaînes de PEG, en raison de l'encombrement stérique lié au PEG. En s'ouvrant, les autres chaînes de PEG servent donc à amorcer d'autres chaînes de PLA, diminuant ainsi le nombre de monomères AL disponibles pour la croissance des chaînes et donc pour l'augmentation de la masse molaire. Ainsi, l'encombrement stérique étant plus faible pour une chaîne de PEG 0,55 kDa que pour les chaînes de PEG 1 kDa, 2 kDa, ou 5 kDa, l'insertion du PEG et la croissance des chaînes sont donc facilitées.

Il est toutefois important de noter que la technique CPG utilisée pour caractériser la masse molaire des polymères branchés synthétisés en masse n'était pas appropriée. En effet, la

technique CPG utilise une élution selon la masse molaire apparente des polymères et est calibrée avec des standards linéaires de poly(styrène), ce qui n'est pas représentatif de la structure amphiphile de polymères branchés. En effet, la présence de branches peut l'arrangement du polymère dans le solvant et donc son élution. Cette méthode peut mener à une sous-estimation de la masse molaire des polymères branchés et donc également au nombre de branches. Une méthode permettant l'évaluation de la masse molaire réelle (au lieu de la masse molaire apparente) serait donc nécessaire (par ex. détection multiple viscosimétrie/diffusion de la lumière). Néanmoins, bien que la méthode d'analyse de la masse molaire ne permette pas de la quantifier de manière juste, il semble que celle-ci soit tout de même réellement assez faible. En effet, ces polymères formaient de très faibles tailles de NPs, et certains semblaient même totalement solubles dans l'eau (données non présentées).

**Tableau 2.2** Propriétés de la librairie de polymères branchés synthétisée en masse

Polymères	Contenu théorique en bloc hydrophile	Masse molaire $M_n$ (CPG)	Masse molaire $M_w$ (CPG)	Indice de polydispersité, $PdI$ (CPG) *	Contenu expérimental en bloc hydrophile (RMN) **	Nombre de PEG/chaîne de polymère (CPG et RMN) ***
	[% <sub>p/p</sub> ]	[g/mol]	[g/mol]		[% <sub>p/p</sub> ]	
PLA- <i>p</i> -PEG0.55K	7	14 900	20 000	1,3	6,9	2,5
PLA- <i>p</i> -PEG0.55K	23	8 400	12 700	1,5	10,6	2,4
PLA- <i>p</i> -PEG1K	6,5	5 700	8 100	1,4	8,6	0,7
PLA- <i>p</i> -PEG1K	12,2	5 400	8 800	1,6	14,4	1,3
PLA- <i>p</i> -PEG1K	21,7	4 500	6700	1,5	21,6	1,4
PLA- <i>p</i> -PEG2K	12,2	3 200	9 000	2,7	15,9	0,7
PLA- <i>p</i> -PEG2K	21,7	5 500	8 800	1,7	25	1,1
PLA- <i>p</i> -PEG2K	35,7	4 600	6 100	1,3	42,1	1,3
PLA- <i>p</i> -PEG5K	25,7	4 600	7 800	1,7	32,1	0,5
PLA- <i>p</i> -PEG5K	41	6 000	7 100	1,2	56,2	0,8

\* calculé à partir de l'analyse de masse molaire par CPG  $PdI = M_w/M_n$

$$**\%_{p/p} \text{ bloc hydrophile} = \frac{\text{nombre de chaînes de PEG pour } 100 \text{ AL} * M_{PEG}}{100M_{AL} + \text{nombre de chaînes de PEG pour } 100 \text{ AL} * M_{PEG}} \times 100$$

Le nombre de chaînes de PEG pour 100 unités AL est obtenu à partir de l'intégration de l'intensité du signal du PEG (3,6 ppm) en calibration la valeur de l'intégration du signal du PLA (5,2 ppm) à 100 protons. Le nombre de protons dans le signal du PEG permet de déterminer le nombre de PEG pour 100 unités AL.

### 2.3.2.2 Optimisation des conditions de synthèse en solution

Pour pallier l'effet d'encombrement stérique lié au PEG qui empêche l'insertion des chaînes de PEG dans les chaînes de PLA en croissance, une plus grande mobilité des chaînes de PEG ainsi que des chaînes en croissance est préférable. Pour cela, une méthode de synthèse des polymères en solution a été mise en place. La synthèse en solution permet de favoriser la mobilité des chaînes, car les polymères sont cette fois-ci solubilisés dans un solvant, donc plus dynamiques qu'à l'état fondu. La rencontre entre les deux extrémités réactives des chaînes de PEG et des chaînes en croissance est donc facilitée. De plus, la méthode de synthèse en solution permet d'avoir un chauffage plus homogène que la synthèse en masse, évitant ainsi que le monomère D,L-dilactide recristallise sur les parois froides du ballon et ne soit pas disponible pour la polymérisation.

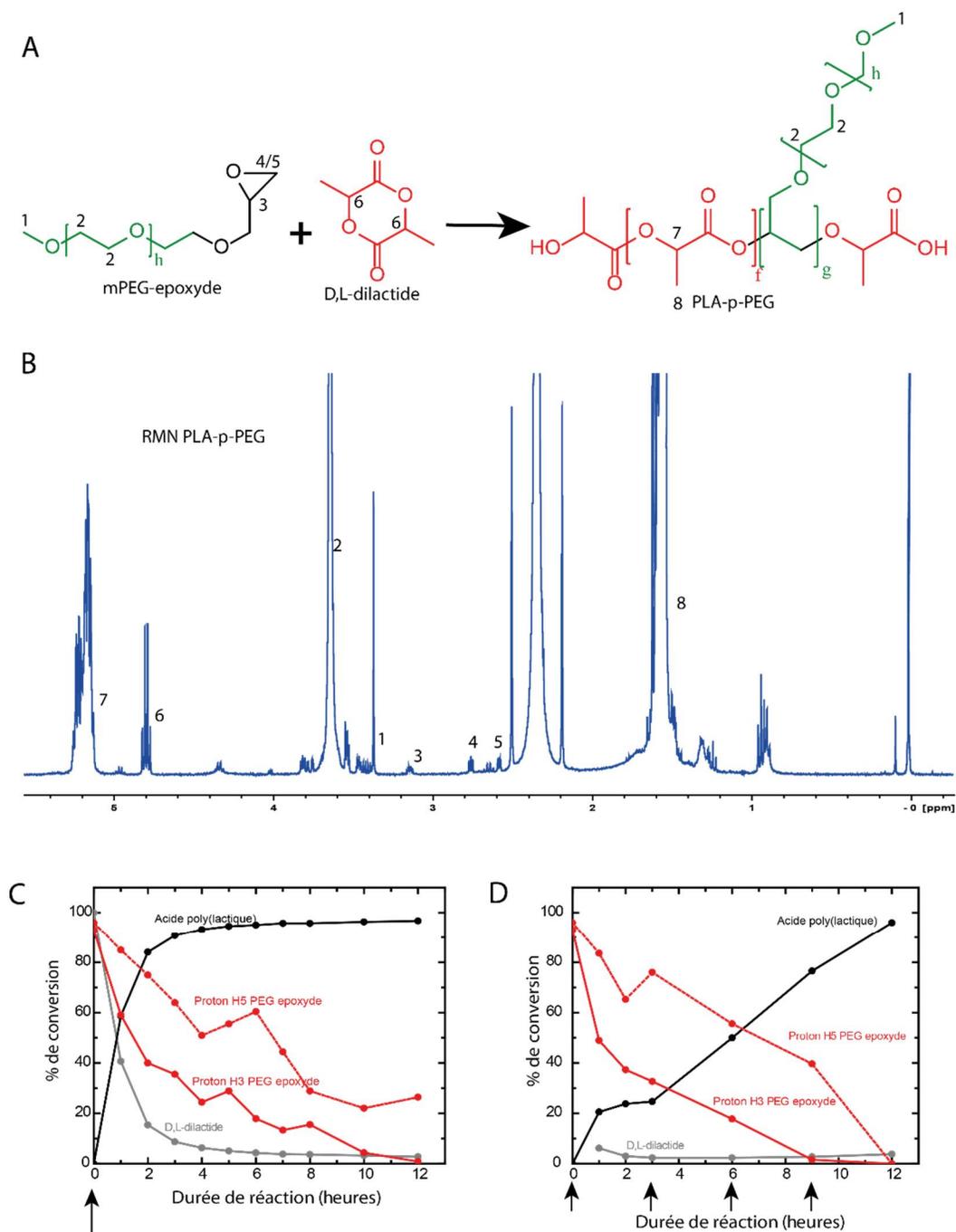
#### **Optimisation des conditions de synthèse en solution**

Une étude de conversion a préalablement été effectuée afin de comprendre plus en détail l'ouverture des cycles époxydes des chaînes de PEG et du cycle de D,L-dilactide et donc d'optimiser les conditions de réaction. La **figure 2.11** présente un spectre RMN typique de PLA-*p*-PEG en cours de polymérisation (**Figure 2.11B**) avec les protons (**Figures 2.11 A et B**) permettant de calculer les taux de conversion de synthèse en fonction du temps (**Figure 2.11 C et D**).

La conversion du D,L-dilactide, du PLA, et l'ouverture du mPEG-époxyde ont été suivies par la disparition ou l'apparition des signaux RMN respectifs. Lorsque le D,L-dilactide est ajouté en une seule fois au tout début de synthèse (**Figure 2.11C**), celui-ci est consommé très rapidement pour la polymérisation. Ainsi, 90% de la quantité de D,L-dilactide s'ouvre et se polymérise en moins de 3h de réaction alors que le cycle époxyde du PEG s'ouvre en totalité sur une période de 12 h. Le PEG restant ne pouvant plus se copolymériser avec du D,L-dilactide, l'efficacité d'insertion du PEG dans les chaînes polymériques en croissance est réduite.

Un moyen de contrer ces différences de vitesse d'ouverture de cycles afin d'augmenter l'insertion du PEG dans les chaînes est d'avoir du D,L-dilactide toujours disponible pour se copolymériser avec le PEG-époxyde. Du D,L-dilactide a donc été ajouté en 4 fois au cours de la synthèse dans le milieu réactionnel. D'après la cinétique de polymérisation réalisée (**Figure**

2.11D), 40 % plus d'insertion de PEG dans les chaînes de polymères a ainsi été obtenue en comparaison avec un apport du D,L-dilactide en totalité en début de synthèse (**Tableau 2.3**).



**Figure 2.11** Études de conversion du polymère PLA-*p*-PEG (12.2%<sub>p/p</sub> de PEG 2000) synthétisé en solution dans le toluène. (A) Structure chimique des réactifs et du produit de synthèse. (B) Spectre RMN du PLA-*p*-PEG2K 12.2%<sub>p/p</sub> de PEG théorique après 3 heures de synthèse. (C) Conversion en fonction du temps lorsque la synthèse est réalisée par ajout du D,L-dilactide en 1 fois (D) Conversion en fonction du temps lorsque la synthèse est réalisée par ajout du D,L-

dilactide en 4 fois au cours de la synthèse. Les flèches indiquent le moment où le D,L-dilactide a été ajouté au cours de la synthèse.

**Tableau 2.3** Insertion de PEG dans les polymères PLA-*p*-PEG2K en fonction des conditions de synthèse en solution

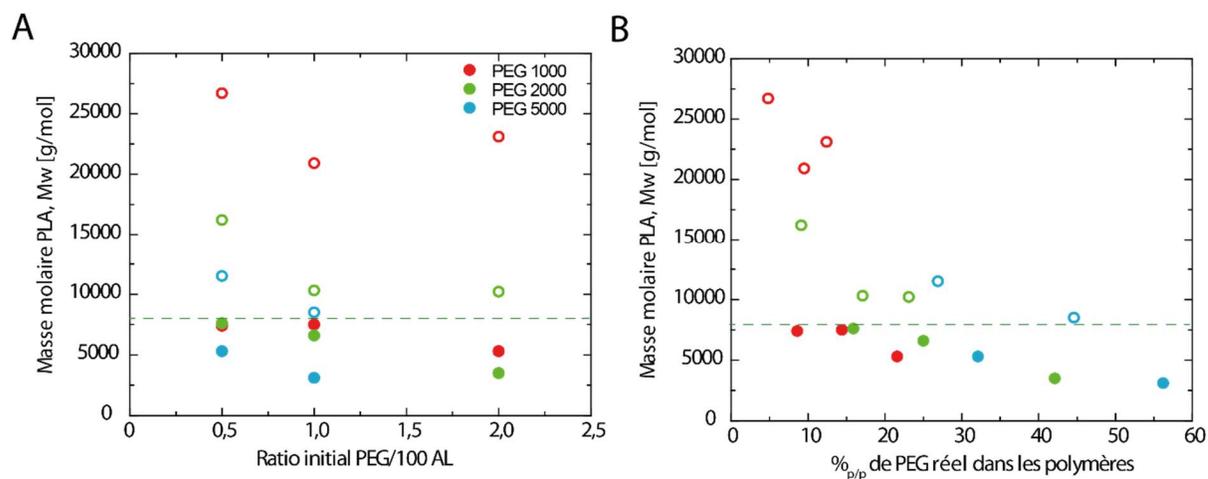
Conditions de synthèse	Insertion théorique de PEG	Insertion réelle de PEG *
	Nombre de PEG pour 100 AL	Nombre de PEG pour 100 AL
Ajout D,L-dilactide, mPEGépoxyde et catalyseur au début de la synthèse	0,5	0,25
Ajout mPEGépoxyde et catalyseur au début de la synthèse. Addition du D,L-dilactide en 4 fois au cours de la synthèse	0,5	0,35

\* déterminé par <sup>1</sup>H RMN

### 2.3.2.3 Caractéristiques des polymères branchés PLA-*b*-PEG synthétisés en solution

Une nouvelle librairie de polymères PLA-*p*-PEG a donc été synthétisée par la méthode de synthèse en solution avec apport de D,L-dilactide en plusieurs fois. Les caractéristiques de ces polymères sont présentées dans le **tableau 2.4**.

Pour ces polymères, l'analyse de la masse molaire a été effectuée par une technique CPG avec détection par diffusion de la lumière/réfractométrie, évitant ainsi les erreurs liées à la masse molaire apparente en utilisant les standards linéaires de polystyrène. Par rapport à la méthode de synthèse en masse (**Tableau 2.2**), la synthèse en solution a permis d'obtenir des polymères de plus haute masse molaire avec un nombre de PEG/chaînes de polymères plus important (**Tableau 2.4** et **figures 2.12 A et 2.12B**). Par exemple les polymères de PLA-*p*-PEG1K synthétisés en solution comportaient jusqu'à 3,3 chaînes pendantes de PEG par polymère avec une masse molaire totale aux alentours de 25 kDa, contre 1,4 chaînes de PEG par polymère et une masse molaire de 8 kDa pour ceux synthétisés en masse. Néanmoins, il est à noter que l'insertion reste encore difficile pour les PEG de plus haute masse molaire (2 et 5 kDa) (**Tableau 2.4**) en raison de l'encombrement stérique ce qui se traduit par des masses molaires de squelettes de PLA encore faibles (**Figure 2.12**).



**Figure 2.12** Masse molaire du squelette PLA par synthèse en masse (ronds pleins) ou en solution (ronds vides) en fonction (A) du ratio initial PEG/AL dans le milieu réactionnel et (B) du pourcentage réel de PEG inséré dans les polymères

**Tableau 2.4** Propriétés de la librairie de polymères branchés synthétisée en solution

Polymères	Contenu théorique en bloc hydrophile	Masse molaire $M_n$ (CPG)	Masse molaire $M_w$ (CPG)	Indice de polydispersité, PDI (CPG) *	Contenu expérimental en bloc hydrophile (RMN) **	Nombre de PEG/chaîne de polymère (CPG et RMN) ***
	[% <sub>p/p</sub> ]	[g/mol]	[g/mol]		[% <sub>p/p</sub> ]	
PLA- <i>p</i> -PEG1K	6,5	21 000	28 000	1,3	4,8	1,3
PLA- <i>p</i> -PEG1K	12,2	14 700	23 100	1,6	9,5	2,2
PLA- <i>p</i> -PEG1K	21,7	16 000	26 400	1,6	12,4	3,3
PLA- <i>p</i> -PEG2K	12,2	15 200	17 800	1,2	9,1	0,8
PLA- <i>p</i> -PEG2K	21,7	10 600	12 300	1,1	17,1	1
PLA- <i>p</i> -PEG2K	35,7	9 700	13 200	1,4	23,1	1,5
PLA- <i>p</i> -PEG5K	25,7	12 300	15 500	1,3	26,9	0,8
PLA- <i>p</i> -PEG5K	41	11 200	15 500	1,4	44,6	1,4

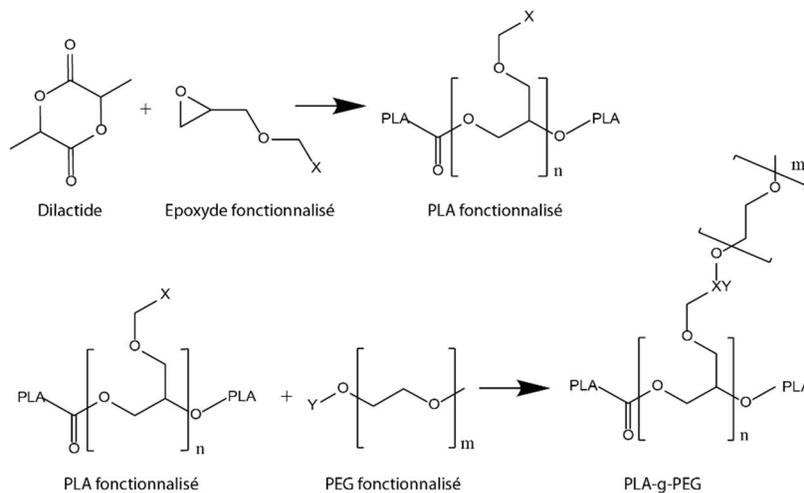
\* calculé à partir de l'analyse de masse molaire par CPG  $PDI = M_w/M_n$

$$**\%_{p/p} \text{ bloc hydrophile} = \frac{\text{nombre de chaînes de PEG pour } 100 \text{ AL} * M_{PEG}}{100M_{AL} + \text{nombre de chaînes de PEG pour } 100 \text{ AL} * M_{PEG}} \times 100$$

Le nombre de chaînes de PEG pour 100 unités AL est obtenu à partir de l'intégration de l'intensité du signal du PEG (3,6 ppm) en calibration la valeur de l'intégration du signal du PLA (5,2 ppm) à 100 protons. Le nombre de protons dans le signal du PEG permet de déterminer le nombre de PEG pour 100 unités AL.

### 2.3.2.4 Comparaison avec les autres méthodes de synthèses de polymères PLA-b-PEG branchés

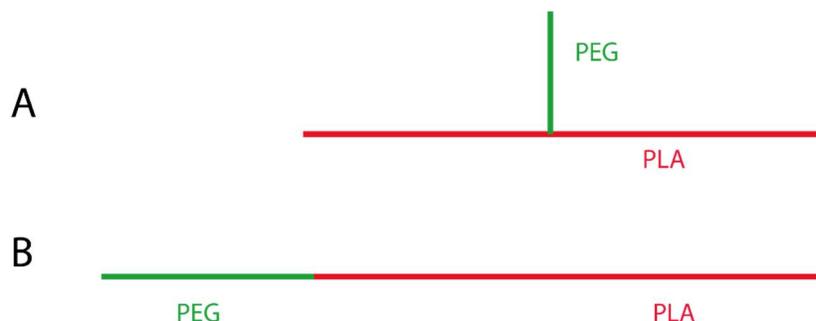
Différentes approches de synthèse avaient déjà été mises au point au laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutique du Pr. Hildgen pour la synthèse de copolymère PEG-PLA de structure dite branchée. Ces méthodes de fabrication se basaient sur une copolymérisation par ouverture de cycle entre l'acide lactique et une molécule époxyde comprenant un groupement fonctionnel pendant sur lequel du PEG fonctionnalisé pouvait être greffé (voie de synthèse simplifiée présentée dans la **figure 2.13**)<sup>4-8, 10-12</sup>. La réaction de couplage entre le PEG et le squelette de PLA était une réaction d'estérification (alcool-chlorure d'acyle). Initialement, la molécule époxyde comprenait une fonction allyle, qui après copolymérisation avec l'acide lactique, était hydroxylée puis oxydée en acide carboxylique et enfin convertie en chlorure d'acyle. Les fonctions chlorure d'acyle du polymère final étaient finalement couplées avec un ligand/molécule/polymère comprenant une fonction hydroxyle libre par une réaction d'estérification<sup>4</sup>. Néanmoins, les étapes d'oxydation permettant de fonctionnaliser les chaînes pendantes du PLA en groupements carboxyliques aboutissaient à une dégradation du squelette de PLA remarquée par une diminution significative de sa masse molaire. Une voie de synthèse dérivée a donc été développée afin de supprimer ces étapes d'oxydation sur le PLA pour pallier sa dégradation<sup>5</sup>.



**Figure 2.13** Voie de synthèse de polymères PLA-PEG greffés (structure branchée) préalablement utilisée au sein du Laboratoire du Pr Hildgen.

Néanmoins, bien que ces voies de synthèse préalablement développées au laboratoire aient l'avantage de contrôler au préalable la taille du squelette de PLA, elles comportent un minimum de 4 étapes de réaction de 6 à 48 h chacune suivies d'étapes de purifications des produits<sup>5</sup>. Ces méthodes longues réduisent donc les rendements finaux possibles et semblent difficilement envisageables industriellement. De plus, la quantité de PEG par chaîne polymérique dépendant à la fois de l'insertion des groupements époxydes fonctionnalisables et du greffage du PEG sur celui-ci, peut limiter la reproductibilité des lots de polymères. L'approche de synthèse utilisée dans cette thèse et reposant sur une copolymérisation directe entre le D,L-dilactide et le mPEG-époxyde a donc l'avantage d'alléger significativement le nombre d'étapes de synthèse à deux étapes, diminuant ainsi la durée et le coût de synthèse de ces polymères. De plus, le mPEG-époxyde synthétisé est également disponible commercialement ce qui pourrait permettre de réduire la synthèse à une seule étape. La translation industrielle pourrait donc être facilitée.

A ce jour, les conditions de la voie de synthèse utilisée dans ce projet restent à améliorer, car l'insertion du PEG dans les chaînes en croissance reste limitée, tout comme l'obtention de masses molaires supérieures à 20kDa notamment pour les hautes masses molaires de PEG ( $\geq 20$ kDa). Les taux de PEG/chaîne obtenus sont en effet inférieurs aux taux obtenus par greffage<sup>5</sup>. Un point à tester serait une alimentation en flux continu de monomères D,L-dilactide tout au long de la synthèse, pour qu'il n'y ait jamais de moment où le monomère soit en quantité limitante. Différents ratios AL/catalyseur pourraient également être testés, car cela influence le taux de conversion des monomères et donc leur masse molaire<sup>18</sup>. Différents types de catalyseurs pourraient également être étudiés<sup>13</sup>. De plus, lorsqu'un seul PEG par chaîne est obtenu, les méthodes de caractérisation utilisées ne permettent pas de savoir s'il est vraiment en configuration pendante (**Figure 2.14A**) ou en bout de chaîne tel qu'un polymère diblocs (**Figure 2.14B**).



**Figure 2.14** Schéma des polymères PLA-*p*-PEG avec une seule chaîne de PEG par chaîne de polymère en configuration pendante (A) ou en bout de chaîne (B)

### 2.3.3 Polymère fluorescent

Un polymère fluorescent totalement lipophile a été synthétisé par greffage du fluorophore Cy5 sur le polymère de PLA<sub>2</sub>, dans le but de fabriquer des NPs fluorescentes dont il est possible de suivre la localisation dans la peau par microscopie de fluorescence. L'idée est de pouvoir fabriquer des NPs fluorescentes de différentes compositions hydrophiles par incorporation d'une faible quantité de ce polymère fluorescent en mélange avec les autres polymères préalablement synthétisés. Le Cy5 a été choisi comme fluorophore, car il émet dans le rouge lointain ( $\lambda_{\text{ex}}$  649 /  $\lambda_{\text{em}}$  666 nm), une région du spectre où l'auto fluorescence des systèmes biologiques est faible<sup>17</sup>. Le polymère fluorescent obtenu, de couleur bleue, présente les mêmes caractéristiques, présentées dans le **tableau 2.5** suivant, que son précurseur de PLA.

**Tableau 2.5** Propriétés du polymère fluorescent synthétisé

Polymère	<i>Mn</i> (CPG)	<i>Mw</i> (CPG)	Indice de polydispersité <i>PdI</i> (CPG)
	[g/mol]	[g/mol]	
PLA-Cy5	26 700	36 300	1,3

## 2.4 Conclusion générale du chapitre II

### Points Clés

- Une librairie de polymères à base de PLA a été développée.

Les polymères synthétisés diffèrent par :

- la nature de bloc hydrophile (PEG ou PMPC)
- le ratio bloc hydrophile/hydrophobe (entre 0 et 45 %<sub>p/p</sub> de PEG)
- leur architecture (diblocs linéaires ou branchés)
- la présence ou non de fluorophore Cy5

Dans le chapitre III suivant, ces polymères sont utilisés pour comprendre le rôle du ratio de bloc hydrophile/hydrophobe et de l'architecture des polymères synthétisés sur les propriétés physicochimiques des NPs polymériques. Ils sont également utilisés pour la fabrication de NPs de différentes propriétés de surface et structures, étudiées dans les chapitres IV, et V de cette thèse.

Les caractéristiques des polymères utilisés dans ce projet sont récapitulées dans le **tableau 2.6**. Il est également indiqué dans quelle partie du projet sont utilisés chacun des polymères.

**Tableau 2.6** Récapitulatif des caractéristiques des polymères utilisés dans les études suivantes

Structure	Nature du polymère hydrophile ou de la fonctionnalisation	Polymères	Masse molaire $M_w$	Contenu réel en bloc hydrophile	Utilisation
			[g/mol]	[% <sub>p/p</sub> ]	
Polymère linéaire	-	PLA	38 500	-	Chapitre III
		PLA	36 300	-	Chapitre IV et V
	PEG	PLA- <i>b</i> -PEG0.55 K	12 500	5	Chapitre III
		PLA- <i>b</i> -PEG1K	17 500	4,2	Chapitre III
		PLA- <i>b</i> -PEG1K	26 500	3,1	Chapitre V
		PLA- <i>b</i> -PEG2K	23 500	11,4	Chapitre III
		PLA- <i>b</i> -PEG2K	19 100	11,3	Chapitre III
		PLA- <i>b</i> -PEG2K	23 900	14,7	Chapitre III
		PLA- <i>b</i> -PEG2K	22 300	8,6	Chapitre IV et V
		PLA- <i>b</i> -PEG5K	12 560	28,5	Chapitre III
		PLA- <i>b</i> -PEG5K	19 100	24,9	Chapitre V
		PLA- <i>b</i> -PEG10K	27 900	24,5	Chapitre V
	PMPC	PLA- <i>b</i> -PMPC	32 400	37,9	Chapitre IV
(fluorophore)	PLA-Cy5	36 300	-	Chapitre V	
Polymère branché	PEG	PLA- <i>p</i> -PEG1K	28 000	4,8	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG1K	23 100	9,5	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG1K	26 400	12,4	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG2K	17 800	9,1	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG2K	12 300	17,1	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG2K	13 200	23,1	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG5K	15 500	26,9	Chapitre III
		PLA- <i>p</i> -PEG5K	15 500	44,6	Chapitre III

## Références bibliographiques Chapitre II

- (1) Riley, T.; Stolnik, S.; Heald, C. R.; Xiong, C. D.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; Purkiss, S. C.; Barlow, R. J.; Gellert, P. R. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)–Poly(ethylene glycol) (PLA–PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir* **2001**, *17* (11), 3168-3174
- (2) Cheng, J.; Teply, B. A.; Sherifi, I.; Sung, J.; Luther, G.; Gu, F. X.; Levy-Nissenbaum, E.; Radovic-Moreno, A. F.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Formulation of functionalized PLGA–PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. *Biomaterials* **2007**, *28* (5), 869-876
- (3) Huh, K. M.; Bae, Y. H. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol)/poly(L-lactic acid) alternating multiblock copolymers. *Polymer* **1999**, *40* (22), 6147-6155
- (4) Nadeau, V.; Leclair, G.; Sant, S.; Rabanel, J.-M.; Quesnel, R.; Hildgen, P. Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications. *Polymer* **2005**, *46* (25), 11263-11272
- (5) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG–PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**,
- (6) Sant, S.; Nadeau, V.; Hildgen, P. Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2005**, *107* (2), 203-214
- (7) Sant, S.; Poulin, S.; Hildgen, P. Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of PEGylated nanoparticles. *J Biomed Mater Res A* **2008**, *87* (4), 885-95
- (8) Essa, S.; Rabanel, J. M.; Hildgen, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* **2010**, *75* (2), 96-106
- (9) Essa, S.; Louhichi, F.; Raymond, M.; Hildgen, P. Improved antifungal activity of itraconazole-loaded PEG/PLA nanoparticles. *J Microencapsul* **2013**, *30* (3), 205-17
- (10) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Paka, G. D.; Ramassamy, C.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 409-420
- (11) Mokhtar, M.; Gosselin, P.; Lacasse, F.; Hildgen, P. Design of PEG-grafted-PLA nanoparticles as oral permeability enhancer for P-gp substrate drug model Famotidine. *Journal of microencapsulation* **2017**, *34* (1), 91-103
- (12) Mokhtar, M.; Gosselin, P. M.; François-Xavier, L.; Hildgen, P. Tablet formulation of Famotidine-loaded P-gp inhibiting nanoparticles using PLA-g-PEG grafted polymer. *Pharmaceutical development and technology* **2018**, 1-11
- (13) Hsiue, G. H.; Lo, C. L.; Cheng, C. H.; Lin, C. P.; Huang, C. K.; Chen, H. H. Preparation and characterization of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-block-poly(D,L-lactide) polymer nanoparticles. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45* (4), 688-698
- (14) Cho, K. Y.; Kim, C. H.; Lee, J. W., & Park, J. K.. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) grafted poly(L-lactide). *Macromolecular rapid communications*, **1999**, *20*(11), 598-601.
- (15) Kvach, M. V.; Ustinov, A. V.; Stepanova, I. A.; Malakhov, A. D.; Skorobogaty, M. V.; Shmanai, V. V.; Korshun, V. A. A convenient synthesis of cyanine dyes: reagents for the labeling of biomolecules. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008* (12), 2107-2117
- (16) Dechy-Cabaret, O.; Martin-Vaca, B.; Bourissou, D. Controlled ring-opening polymerization of lactide and glycolide. *Chemical Reviews* **2004**, *104* (12), 6147-6176
- (17) Hyon, S.-H.; Jamshidi, K.; Ikada, Y. Synthesis of polylactides with different molecular weights. *Biomaterials* **1997**, *18* (22), 1503-1508
- (18) Berezin, M. Y.; Achilefu, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. *Chemical Reviews* **2010**, *110* (5), 2641-2684

# **-Chapitre III-**

**Fabrication de nanoparticules :  
comment contrôler leurs propriétés  
physico-chimiques ?**

### 3.1 Introduction générale du chapitre III

La création d'une librairie de NPs polymériques cœur-couronne de **composition hydrophile variable** tout en conservant des **tailles similaires**, permet de comparer l'influence de la composition hydrophile sur l'administration de médicaments dans la peau. En effet, comme détaillé dans la partie 1.3.1.1.1 *Taille* du chapitre I introductif, la taille des NPs joue un rôle critique sur la pénétration cutanée des NPs et des substances encapsulées. Il est donc essentiel de s'affranchir de l'influence de cette caractéristique sur la pénétration cutanée pour définir précisément le rôle du contenu hydrophile. Pour cela, il est tout d'abord nécessaire i) de comprendre, pour cette librairie de polymères synthétisés, comment la composition hydrophile influence les propriétés physicochimiques des NPs, notamment leur taille et ii) de définir des procédés de fabrication permettant de contrôler la taille des NPs indépendamment de leur composition hydrophile.

Dans ce chapitre III, les polymères précédemment synthétisés (chapitre II) ont été utilisés pour la fabrication de la librairie de NPs. Les NPs ont été fabriquées par un procédé de nanoprécipitation (déplacement de solvant) ou par des procédés dérivés de cette technique. Cette méthode développée par Fessi *et al.*<sup>1</sup> est une technique usuellement utilisée pour la fabrication des NPs à base de polyesters, en raison de sa simplicité. Contrairement aux méthodes basées sur l'émulsification, la nanoprécipitation possède l'avantage de se réaliser en une seule étape, sans apport conséquent d'énergie, et évite l'utilisation de certains solvants toxiques<sup>2</sup>. En pratique, les composés hydrophobes (polymères, lipides, actifs) sont dissous dans une phase organique polaire (acétone, THF, méthanol, éthanol...). Cette phase est ensuite introduite dans un volume de non-solvant de ces composés hydrophobes (généralement une phase aqueuse) dans lequel la phase organique est miscible. La diffusion de la phase organique dans le non-solvant induit la précipitation des composés hydrophobes<sup>1</sup>. D'un point de vue mécanistique, la formation des NPs pendant la nanoprécipitation se déroule en plusieurs étapes : la nucléation, la croissance (coalescence<sup>3</sup> ou agrégation<sup>4</sup>) et la stabilisation. La nucléation de quelques chaînes de polymères est provoquée par le phénomène de sursaturation lors du changement de solvant, le polymère étant à une concentration supérieure à sa solubilité. La taille des noyaux formés évolue ensuite par l'insertion de nouvelles chaînes de polymères et la coalescence/agrégation des particules formées, jusqu'à ce que la barrière énergétique à l'insertion de nouvelles chaînes soit

trop haute (stabilisation stérique et/ou électrostatique, diminution de la solubilité du soluté induite par le changement de solvant) <sup>5</sup>.

Ce chapitre III est composé de deux parties.

La première partie « *Fabrication de nanoparticules : influence de la composition et de l'architecture de polymères amphiphiles sur leurs propriétés physico-chimiques* », porte sur le rôle du contenu en PEG dans les polymères amphiphiles de PLA-PEG et le rôle de l'architecture de ces polymères (linéaire ou branchée) sur la taille, la polydispersité, le potentiel zêta et la densité de la couronne hydrophile des NPs synthétisées. L'utilisation i) de copolymères PLA-PEG seuls ou ii) en combinaison avec du PLA, aboutissant à différentes proportions de PEG, est évaluée.

La seconde partie, « *Fabrication de nanoparticules : moduler la taille des nanoparticules polymériques* » traite de différentes méthodes de nanoprécipitation permettant de contrôler la taille des NPs, indépendamment de leur composition polymérique. L'influence des procédés de fabrication sur la taille des NPs est détaillée. Différentes méthodes de fabrication sont comparées, à savoir i) la nanoprécipitation « classique », ii) la nanoprécipitation « Flash », et iii) une méthode de microfluidique.

## **-Partie I-**

# **Fabrication de nanoparticules : influence de la composition et de l'architecture de polymères amphiphiles sur leurs propriétés physico-chimiques**

### 3.2 Introduction partie 1

La modification de la composition de polymères amphiphiles, et notamment leur partie hydrophile permet notamment d'obtenir des NPs de propriétés de surface variables <sup>6</sup>. Néanmoins, la composition des polymères influence inévitablement le mécanisme de formation des NPs et donc toutes les propriétés physico-chimiques en même temps. Il est notamment reconnu que la quantité de PEG dans les polymères peut conditionner la taille des NPs <sup>6-7</sup>. L'architecture du polymère peut également influencer les propriétés des particules polymériques <sup>6</sup>.

L'architecture polymérique linéaire en diblocs (un bloc hydrophobe liée de manière covalente à un bloc hydrophile) est la plus couramment utilisée pour la formation de NPs avec une couronne hydrophile. Le laboratoire du Pr Hildgen a montré que l'architecture branchée était une alternative prometteuse aux polymères diblocs linéaires permettant la fabrication de NPs avec une couronne hydrophile à la surface. Comme indiqué en introduction du chapitre II, ce type d'architecture a été envisagé pour, à la fois, augmenter le contenu de PEG dans les polymères, et permettre d'autres fonctionnalisations, telles que des ligands pour le ciblage ou des molécules de diagnostic. Les NPs fabriquées à partir de ces polymères branchés ont notamment montré leur potentiel pour l'utilisation en milieu biologique, notamment en raison de leur capacité à diminuer l'adsorption de protéines <sup>6</sup> et à fournir une libération prolongée de médicaments <sup>8</sup>. Néanmoins, une comparaison systématique entre l'architecture linéaire et l'architecture branchée, à différents pourcentages de PEG, est nécessaire pour déterminer si l'architecture branchée peut apporter des différences de structures avantageuses pour la libération de médicaments, par rapport à une architecture linéaire traditionnelle.

Afin d'obtenir une librairie de NPs avec des compositions hydrophiles variables **et** de tailles identiques à partir des polymères amphiphiles synthétisés (chapitre II), il est nécessaire déterminer au préalable comment ces polymères s'assemblent sous forme de particules et comment leur architecture et composition influencent les principales propriétés de structure et de surface des particules. L'effet de l'architecture des polymères et de leur contenu en PEG sur la taille, la dispersion de la distribution et le potentiel Zêta des NPs blanches (i.e. non chargées en principes actifs) a d'abord été évaluée. L'influence de la quantité de PEG sur l'arrangement

de la couronne hydrophile des NPs a par la suite été quantitativement évaluée par une étude RMN pour des NPs fabriquées à partir de mélanges de polymères linéaires diblocs.

Cette première étape de caractérisation est nécessaire afin de comprendre plus facilement comment il est possible d'optimiser les propriétés physico-chimiques des systèmes polymériques et notamment obtenir des tailles constantes indépendamment de la composition hydrophile des polymères.

### 3.3 Matériel et Méthodes partie I

#### 3.3.1 Matériel

Les polymères utilisés dans cette étude sont ceux synthétisés précédemment et présentés dans le chapitre II. Leurs caractéristiques sont présentées dans les **tableaux 3.1** (polymères PLA-*b*-PEG linéaires) et **3.2** (polymères PLA-*p*-PEG branchés). L'acétone a été achetée chez Fisher Scientific (Loughborough, UK). Le chloroforme deutéré et l'eau deutérée proviennent de Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). De l'eau Milli-Q® (Millipore Canada Ltd., Etobicoke, Ontario, Canada) a été utilisée tout au long de ce travail.

**Tableau 3.1** Propriétés des polymères linéaires PLA-*b*-PEG utilisés dans cette étude

Polymères	Masse molaire <i>M<sub>w</sub></i> (CPG) [g/mol]	Indice de polydispersité <i>PdI</i> (CPG)	Contenu réel en bloc hydrophile (RMN) [% <sub>p/p</sub> ]
PLA	38 500	1,3	-
PLA- <i>b</i> -PEG0.55 K	12 500	1,2	5
PLA- <i>b</i> -PEG1K	17 500	1,2	4,2
PLA- <i>b</i> -PEG2K	23 500	1,8	11,4
PLA- <i>b</i> -PEG2K	19 100	1,8	11,3
PLA- <i>b</i> -PEG2K	23 900	1,4	14,7
PLA- <i>b</i> -PEG5K	12 560	1,2	28,5

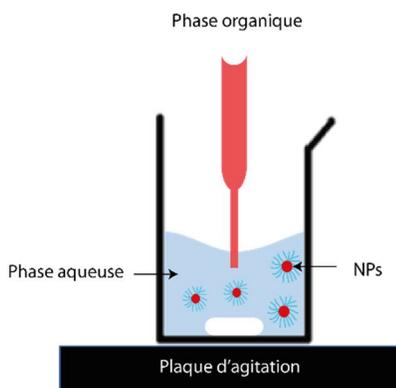
**Tableau 3.2** Propriétés des polymères branchés PLA-*p*-PEG utilisés dans cette étude

Polymères	Masse molaire $M_w$ (CPG)	Indice de polydispersité, PDI (CPG)	Contenu expérimental en bloc hydrophile (RMN)	Nombre de PEG/chaîne de polymère (CPG et RMN)
	[g/mol]		[% <sub>p/p</sub> ]	
PLA- <i>p</i> -PEG1K	28 000	1,3	4,8	1,3
PLA- <i>p</i> -PEG1K	23 100	1,6	9,5	2,2
PLA- <i>p</i> -PEG1K	26 400	1,6	12,4	3,3
PLA- <i>p</i> -PEG2K	17 800	1,2	9,1	0,8
PLA- <i>p</i> -PEG2K	12 300	1,1	17,1	1
PLA- <i>p</i> -PEG2K	13 200	1,4	23,1	1,5
PLA- <i>p</i> -PEG5K	15 500	1,3	26,9	0,8
PLA- <i>p</i> -PEG5K	15 500	1,4	44,6	1,4

### 3.3.2 Méthodes

#### 3.3.2.1 Fabrication des nanoparticules

Les NPs ont été fabriquées par nanoprecipitation classique, sans ajout de tensioactifs, selon le protocole suivant <sup>9</sup>. Les polymères ont été dissous dans de l'acétone à une concentration de 20 mg/mL (2 %<sub>p/v</sub>). La phase organique a été injectée, à l'aide d'un pousse seringue, à un débit constant de 1 mL/min dans une phase aqueuse (eau Milli-Q ®) (ratio phase organique : phase aqueuse de 1 :5) sous agitation constante (400 rotations/min). La majorité du solvant a été évaporé sous hotte et le restant a été retiré par une dialyse de 3 heures (membrane de cellulose régénérée, 6-8kDa, Spectra Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez USA) contre un volume d'eau 100 fois supérieur. Les propriétés physico-chimiques des NPs ont été analysées juste après fabrication. La **figure 3.1** schématise le procédé de fabrication utilisé.



**Figure 3.1** Schéma du procédé de fabrication de NPs par nanopréciipitation classique

### 3.3.2.2 Caractérisation des nanoparticules

#### 3.3.2.2.1 Taille

La taille des NPs a été mesurée par la technique DLS après dilution dans de l'eau pure, à un angle de diffraction de 173°. L'appareil de mesure utilisé est un Malvern Zetasizer Nanoseries® (Malvern, Worcester, U.K.). Les mesures ont été effectuées en triplicata.

#### 3.3.2.2.2 Potentiel Zêta

Le potentiel Zêta a été mesuré par la technique ELS, après dilution dans une solution saline à 15 mM de NaCl. L'appareil de mesure utilisé est un Malvern Zetasizer Nanoseries® (Malvern, Worcester, U.K.). Les mesures ont été effectuées en triplicata.

#### 3.3.2.2.3 Évaluation de la surface des NPs par étude du PEG de surface

La composition de surface des NPs a été caractérisée en déterminant la quantité de PEG à la surface des NPs.

##### **i) % de PEG à la surface**

En déterminant la quantité de PEG à la surface des NPs et la quantité de PEG total dans les NPs, il est possible de déterminer le % de PEG présent à la surface des NPs, selon l'équation 3.1 suivante :

$$\% \text{ de PEG à la surface} = \frac{W_{PEG}}{W_{PEG \text{ total}}} * 100 \quad \text{(Equation 3.1)}$$

Avec  $W_{PEG}$  la masse de PEG à la surface des NPs de l'échantillon et  $W_{PEG \text{ total}}$  la masse totale de PEG dans les NPs de l'échantillon.

**ii) Densité de PEG à la surface**

La densité de PEG à la surface,  $\sigma$ , est la quantité de PEG par unité de surface de NPs. Elle peut être exprimée sous la forme de nombre de chaînes de PEG/nm<sup>2</sup> (**Équation 3.2**) ou nombre d'unités de répétitions EG/nm<sup>2</sup> (**Équation 3.3**).

$$\sigma_{PEG} = \frac{N_{PEG}}{S} \quad (\text{Équation 3.2})$$

$$\sigma_{EG} = \frac{N_{EG}}{S} \quad (\text{Équation 3.3})$$

Avec  $N_{PEG}$  et  $N_{EG}$ , le nombre total de chaînes de PEG ou de motifs EG à la surface  $S$ , et  $S$  la surface totale des cœurs de NPs dans l'échantillon.

Les **équations 3.2 et 3.3** peuvent être reformulées sous la forme des **équations 3.4 et 3.5**, respectivement :

$$\sigma_{PEG} = \frac{\rho_c R_c \mathcal{N} W_{PEG}}{3 M_{PEG} W_c} \quad (\text{Équation 3.4})$$

$$\sigma_{EG} = \frac{\rho_c R_c \mathcal{N} W_{PEG}}{3 M_{EG} W_c} \quad (\text{Equation 3.5})$$

Avec  $\rho_c$  la densité de NPs (1.253 g/cm<sup>3</sup> <sup>9</sup>),  $R_c$  le rayon du cœur des NPs,  $\mathcal{N}$  le nombre d'Avogadro,  $W_{PEG}$  la masse de PEG à la surface des NPs dans l'échantillon,  $M_{PEG}$  la masse moléculaire d'une chaîne de PEG, et  $W_c$  la masse du cœur des NPs dans l'échantillon.

La démonstration du calcul permettant de définir ces équations est détaillée en dans la revue de Rabanel *et al.*<sup>14</sup>.

**iii) Protocole d'analyse**

Le protocole expérimental permettant de déterminer le pourcentage et la densité de PEG à la surface des NPs est décrit ci-dessous.

Les NPs fabriquées dans l'eau pure par nanoprécipitation ont tout d'abord été concentrées par ultrafiltration (Disques de membrane d'ultrafiltration, 10 kDa, 76 mm, Millipore®, Sigma Aldrich, Steinheim, Allemagne). La suspension de NPs concentrées a par la suite été diluée avec un ratio 1 : 2 dans de l'eau deutérée.

La taille des NPs a été vérifiée par DLS après concentration. Le rayon du cœur des NPs,  $R_C$ , a été déterminé en considérant une distribution unimodale de taille en nombre des NPs. La concentration des NPs en solution aqueuse a été déterminée par gravimétrie. Pour cela, 1 mL de NPs a été lyophilisé puis pesé. La concentration de NPs permet d'obtenir la masse des NPs dans l'échantillon  $w_{NPs}$ , et par la suite la masse du cœur des NPs,  $w_C$  dans l'échantillon. Les NPs lyophilisés ont ensuite été solubilisés dans le chloroforme deutéré ( $CDCl_3$ ).

La quantification de  $W_{PEG}$ , la masse de PEG en surface, a ensuite été réalisée par une étude  $^1H$  RMN des NPs concentrées dans l'eau deutérée  $D_2O$ . Dans l'eau deutérée, seules les chaînes de PEG en surface des NPs sont mobiles donc visibles dans le spectre, contrairement aux chaînes du cœur polymérique. Cette méthode permet de différencier le PEG en surface des NPs du PEG total présent dans les NPs. La quantité  $W_{PEG\ total}$ , i.e., la masse totale de PEG dans l'échantillon, a été obtenue par une étude  $^1H$  RMN des NPs dissoutes dans le  $CDCl_3$ . Le pic du PEG  $CH_2-CH_2-O$  à  $\delta$  3.6 ppm a été utilisé pour la quantification, car c'est le pic du PEG le plus intense. Une calibration par rapport aux intensités des signaux du standard interne présent dans le  $D_2O$ , en référence à l'intensité d'un standard externe de mPEG-OH, a permis la quantification. Les études RMN ont été réalisées sur un spectromètre Varian MR 400 MHz, de la plateforme de Biophysique de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (Université de Montréal).

### 3.4 Résultats & Discussion partie 1

Des NPs blanches ont été fabriquées par un procédé classique de nanoprécipitation à partir des polymères décrits dans le chapitre II, variant à la fois par leur contenu en PEG, par la taille du PEG et par l'architecture du polymère (linéaire, ou branché). La technique de nanoprécipitation est particulièrement adaptée à la fabrication de particules à base de polyesters et de PEG en raison de la solubilité de ceux-ci dans l'acétone, solvant miscible à l'eau.

#### 3.4.1 Influence de l'architecture et du contenu en PEG des polymères sur la taille, la polydispersité et le potentiel Zêta de NPs

Le diamètre hydrodynamique des NPs, leur potentiel Zêta et leur polydispersité ont été systématiquement étudiés en fonction de la quantité de PEG dans les polymères et de leur architecture. Les résultats sont présentés en **Figure 3.2**.

#### 3.4.1.1 Taille et polydispersité

Il a été observé que la taille des NPs formées par nanoprécipitation était dépendante du contenu en PEG dans le polymère (**Figure 3.2 A**). En effet, plus le contenu en PEG dans les polymères était élevé, plus la taille des NPs diminuait. Ce comportement était attendu puisqu'il a déjà été observé à la fois pour des NPs fabriquées à partir de polymères amphiphiles linéaires<sup>7, 10</sup> et branchés<sup>6</sup>. Une telle diminution de la taille en fonction de la quantité de PEG peut s'expliquer par l'effet stabilisant du PEG. En effet, la croissance des NPs durant leur formation est inhibée par la présence du PEG en surface des NPs, qui empêche, par encombrement stérique, l'insertion de nouvelles chaînes<sup>11</sup>. Une taille minimale limite a néanmoins été atteinte à partir d'un haut % de PEG dans le polymère (aux alentours de 30%<sub>o/p/p</sub> de PEG), indiquant qu'une trop forte proportion de PEG dans les polymères n'augmente pas l'effet stabilisant. Il a notamment été montré par Rabanel *et al.*, que la taille de NPs fabriquées à partir de polymères branchés pouvait même augmenter à partir de 25 %<sub>o/p/p</sub> de PEG dans les polymères, probablement en raison d'un étirement des chaînes de PEG<sup>6</sup>. Néanmoins, contrairement à l'étude de Rabanel *et al.* montrant que les NPs fabriquées à partir de polymères branchés étaient plus grosses que celles fabriquées à partir de polymères diblocs (comparaison avec des résultats de la littérature), ici l'architecture du polymère (i.e. linéaire ou branché) n'a aucun effet sur la taille des NPs à des contenus de PEG identiques.

Cette étude a également permis de montrer que la polydispersité des NPs était dépendante du contenu en PEG dans le polymère. Plus la quantité de PEG dans une chaîne de polymère est importante (> 12 %<sub>o/p/p</sub>), plus les NPs formées sont caractérisées par une distribution de taille élevée (**Figure 3.2C**). Néanmoins, la polydispersité des chaînes de polymères semble avoir beaucoup moins d'influence puisque des polymères possédant une polydispersité élevée des chaînes peuvent former des NPs avec un PDI inférieur à 0.2 (**Figure 3.2 D**).

#### 3.4.1.2 Potentiel Zêta

Comme attendu, il a également été observé que le potentiel Zêta des NPs était lui aussi dépendant de la quantité en PEG dans les particules. (**Figure 3.2 B**).

Tout d'abord, le potentiel Zêta des NPs de l'homopolymère PLA testé est très négatif (-70 mV dans ce cas). Néanmoins, étant amorcé par un alcool, le bloc PLA ne devrait pas comporter de

groupement carboxylique ionisables. Les NPs devraient donc théoriquement ne pas avoir un potentiel Zêta négatif. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène :

- i) Toutes les chaînes de PLA ne sont pas amorcées par l'alcool utilisé. Certaines peuvent être amorcées par des résidus d'eau ou d'acide lactique présent durant la synthèse. Des groupements carboxyliques (charges négatives) peuvent donc être présents en extrémités de certaines chaînes de PLA.
- ii) Des réactions de transestérifications peuvent également avoir lieu durant la synthèse du polymère, générant des extrémités carboxyliques<sup>12</sup>
- iii) Le potentiel Zêta résulte d'une polarisation des liaisons C=O du PLA

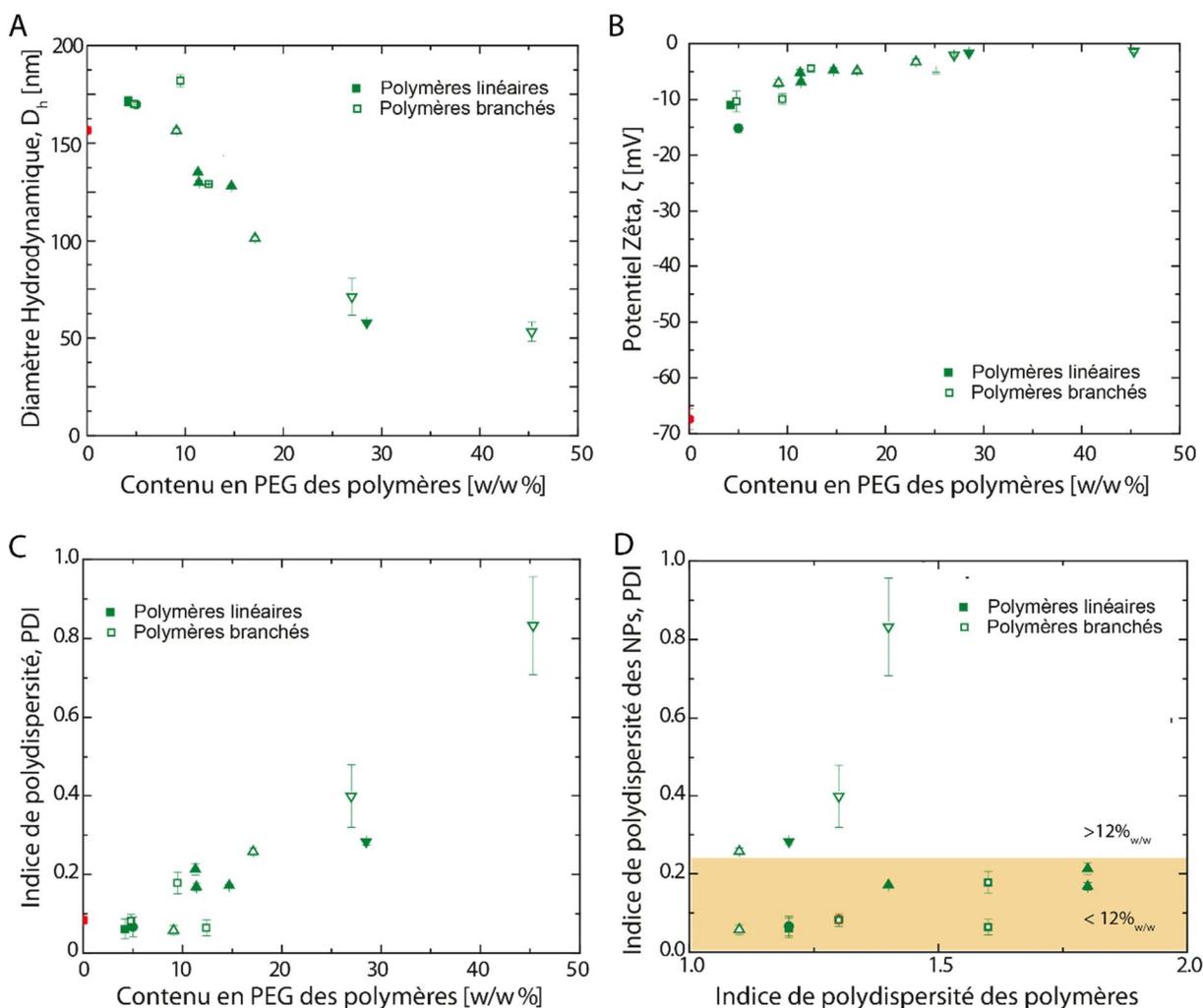
Le potentiel Zêta des NPs à base de copolymères PLA-PEG, linéaires ou branchés se rapprochent de la neutralité en comparaison aux NPs faites de PLA seul. Une diminution de la valeur absolue du potentiel Zêta du PLA a notamment été observée lorsque la quantité de PEG dans le polymère augmentait (entre -15 et 0 mV). Pour les NPs fabriquées à partir des polymères branchés de PLA-*p*-PEG, cette diminution s'explique par un masquage des groupements ionisables appartenant aux blocs PLA en bout de chaîne par le PEG qui se positionne en surface du cœur de PLA. Plus il y a de PEG, plus le masquage est important <sup>13</sup>.

Néanmoins, bien que déjà observé <sup>9</sup>, un tel comportement ne devrait théoriquement pas être obtenu pour les NPs à base de polymères diblocs PLA-*b*-PEG, car, comme pour les NPs à base de PLA seul, il ne devrait pas y avoir de charges. En effet, il n'y a pas de groupements ionisables en extrémités si les chaînes de PLA sont toutes amorcées par du PEG. Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer ce comportement :

- i) Toutes les chaînes de PLA-*b*-PEG ne sont pas amorcées par le PEG utilisé. Certaines peuvent être amorcées par des résidus d'eau ou d'acide lactique présent durant la synthèse. Un mélange PLA-COOH/PLA-*b*-PEG peut donc être présent dans les lots. Le PEG masque les charges du PLA lors de sa ségrégation à la surface des NPs, dépendamment de la quantité présente.
- ii) Des réactions de transestérifications peuvent également avoir lieu durant la synthèse du polymère, générant des chaînes PLA-COOH<sup>12</sup>. Le PEG masque les charges du

PLA lors de sa ségrégation à la surface des NPs dépendamment de la quantité présente.

iii) Le PEG masque la polarisation des groupements C=O du bloc PLA



**Figure 3.2** Caractérisation des NPs fabriquées en fonction de l'architecture du polymère et du contenu en bloc hydrophile PEG. A) Diamètre hydrodynamique des NPs. B) Potentiel Zêta des NPs. C) Indice de polydispersité des NPs. D) Indice de polydispersité des NPs en fonction de la polydispersité des polymères.

Les symboles pleins représentent les NPs fabriquées à partir des polymères d'architecture linéaire tandis que les symboles vides représentent les NPs fabriquées à partir des polymères d'architecture branchée.

Les symboles ronds ● représentent les NPs comportant la taille de PEG 0.55kDa, les symboles carrés ■ représentent les NPs comportant la taille de PEG 1kDa, les symboles triangles ▲ représentent les NPs comportant la taille de PEG 2kDa, les symboles triangles ▼ représentent les NPs comportant la taille de PEG 5kDa.

### 3.4.2 Influence du contenu en PEG dans les polymères sur la couronne hydrophile

Différents paramètres de la surface des NPs peuvent être obtenus à partir d'une caractérisation quantitative du PEG en surface : i) le % de PEG à la surface des NPs, i.e. le % de PEG total ségrégué à la surface ii) la densité de PEG à la surface, et iii) la conformation du PEG à la surface. Néanmoins, bien que la quantité de PEG conditionne l'efficacité biologique des NPs, la caractérisation précise de ces paramètres reste très souvent sous-évaluée dans les études utilisant des NPs PEGylées <sup>14</sup>. En effet, l'obtention de la couronne hydrophile est souvent uniquement postulée qualitativement ou par la mesure du potentiel Zêta. Une caractérisation incomplète peut aboutir à des résultats contestables, limitant les comparaisons possibles entre les études et empêchant à terme de conclure sur le rôle du PEG <sup>14</sup>.

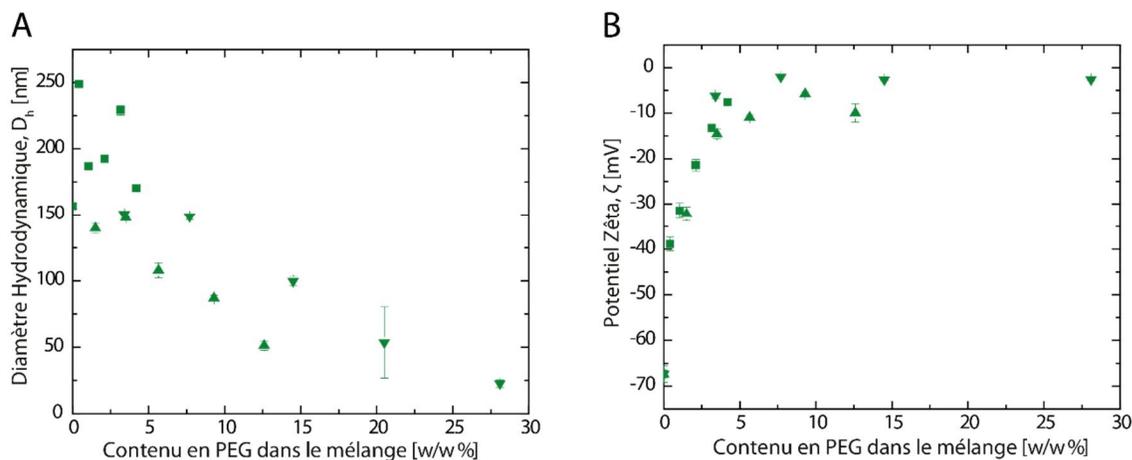
Ces propriétés de la couronne de PEG ont été évaluées grâce à des mesures de la taille des NPs et une quantification <sup>1</sup>H RMN du PEG sur des NPs dispersées dans un solvant aqueux deutéré. Pour cette étude, des mélanges PLA/PLA-*b*-PEG 1K, 2K, ou 5K ont été utilisés dans la fabrication de NPs afin de couvrir une large gamme de contenus en PEG et de pouvoir déterminer l'influence du contenu en PEG et de la taille du bloc PEG.

#### 3.4.2.1 Taille et potentiel Zêta des NPs fabriquées pour la quantification du PEG en surface

La taille des NPs et leur potentiel Zêta ont été tout d'abord mesurés. Comme observé pour les NPs fabriquées à partir de 100 % de PLA-PEG (Figure 3.2 A), la taille des NPs fabriquées à partir de mélange de polymères PLA/PLA-*b*-PEG diminue avec le % de PEG dans les NPs (**Figure 3.3 A**). Néanmoins, dans le cas des mélanges PLA/PLA-*b*-PEG, il a été observé que la masse molaire du PEG influençait la taille des NPs (à des % massiques égaux de PEG dans le mélange). En effet, à partir de 5%<sub>p/p</sub> de PEG dans le mélange de polymères, les NPs fabriquées avec du PLA-*b*-PEG 5K étaient caractérisées par une taille légèrement supérieure à celles fabriquées avec du PLA-*b*-PEG 2K (**Figure 3.3 A**).

Concernant le potentiel Zêta des NPs, un rapprochement vers la neutralité avec une augmentation de la quantité de PEG dans les NPs a également été observé, en raison d'un masquage des charges anioniques du PLA par le PEG <sup>13</sup>. Une légère influence de la taille du PEG a aussi été observée puisque les NPs fabriquées avec du PLA-*b*-PEG 5K possédaient un

potentiel Zêta légèrement plus neutre que celles fabriquées avec du PLA-*b*-PEG 2K (**Figure 3.3B**)



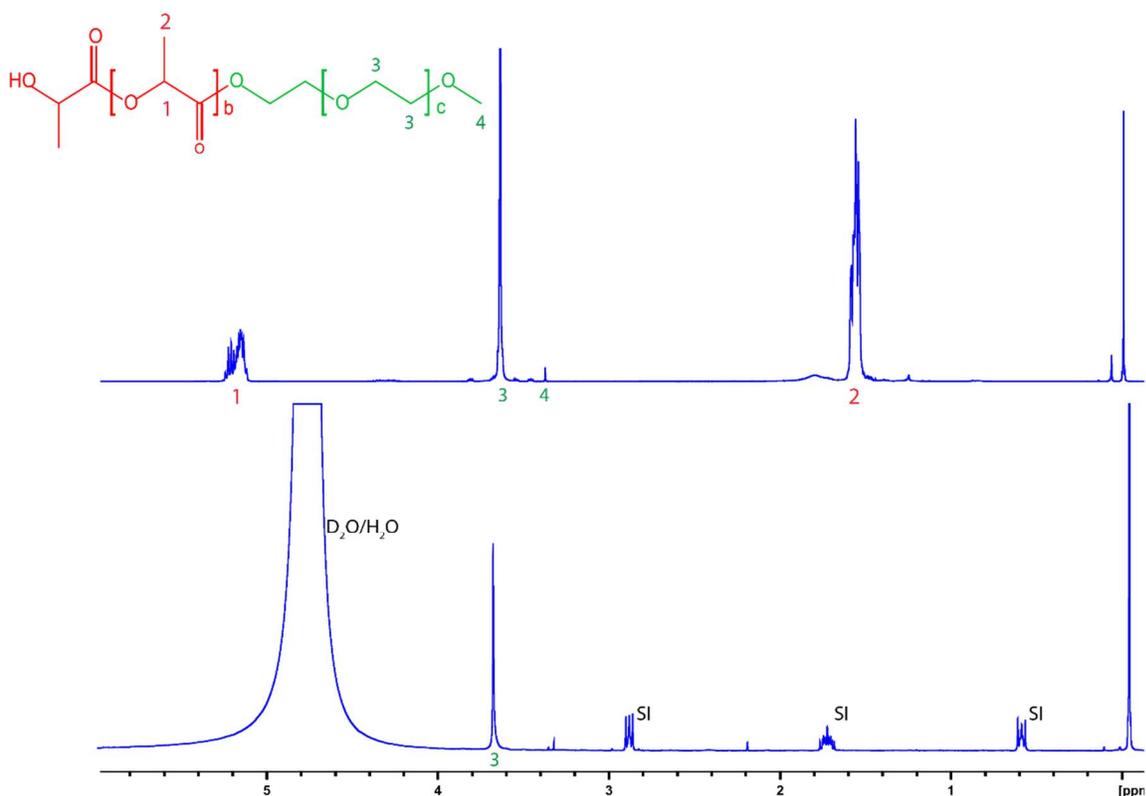
**Figure 3.3** Caractérisation des NPs fabriquées à partir de mélanges PLA/PLA-*b*-PEG A) Diamètre hydrodynamique des NPs (en nombre) B) Potentiel Zêta des NPs. Les symboles carrés ■ représentent les NPs comportant la taille de PEG 1kDa, les symboles triangles ▲ représentent les NPs comportant la taille de PEG 2kDa, les symboles triangles ▼ représentent les NPs comportant la taille de PEG 5kDa.

#### 3.4.2.2 Étude RMN du PEG en surface

Avant de quantifier leur surface par RMN, les NPs fabriquées dans de l'eau ont été concentrées afin de pouvoir les disperser dans de l'eau deutérée  $D_2O$ , nécessaire à l'analyse. Une quantité trop importante d'eau présente dans la suspension durant l'analyse RMN gêne en effet l'analyse quantitative du PEG. Il est également possible, en vue d'une analyse RMN de surface, de fabriquer les NPs directement dans  $D_2O$ . Néanmoins, en plus du coût plus élevé d'une telle préparation, les propriétés des NPs peuvent être modifiées en comparaison à une préparation dans de l'eau pure. Rabanel *et al.* ont notamment montré que la taille des NPs fabriquées dans  $D_2O$  était plus faible que celles préparées dans  $H_2O$ <sup>9</sup>. La technique par concentration de NPs fabriquées dans  $H_2O$  a donc été retenue afin que les NPs analysées par RMN soient les plus proches possible de celles étudiées.

Lorsque les NPs sont dispersées dans  $D_2O$ , les signaux des protons de PEG étaient visibles et bien définis. Des chaînes de PEG sont donc présentes à l'état hydraté, à la surface des NPs. Le signal des protons du PLA, lui, n'a pas été détecté, indiquant une faible mobilité des chaînes, et

donc un cœur plutôt solide <sup>15</sup>. Un spectre RMN typique de NPs en suspension dans le mélange D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O est présenté dans la **figure 3.4** et est comparé à un spectre RMN obtenu sur des NPs lyophilisées dissoutes dans CDCl<sub>3</sub>.



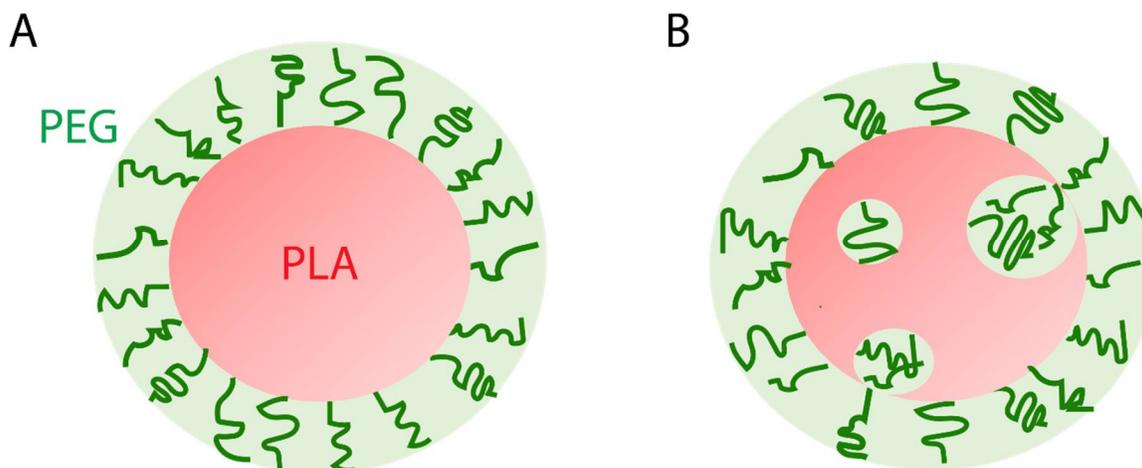
**Figure 3.4** Spectres RMN de NPs fabriquées à partir de PLA-*b*-PEG 5K(28,5 %<sub>w/w</sub>) (100% de polymère diblocs), dissoutes dans CDCl<sub>3</sub> ou en suspension dans D<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O. Le standard interne (SI) présent dans D<sub>2</sub>O est le sel de sodium de l'acide 3-(triméthylsilyl) propionique-2,2,3,3-d<sub>4</sub>. La structure du polymère est indiquée en rappel pour comprendre l'attribution des protons. (1:  $\delta$  5.2 (*m*, 1H, CH), 2:  $\delta$  1.3–1.5 (*m*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3:  $\delta$  3.65 (*m*, 4H, CH<sub>2</sub>), 4:  $\delta$  3.38 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>))

Un tel phénomène a été observé quelle que soit la quantité de PEG dans les NPs.

#### 3.4.2.2.1 Pourcentage de PEG en surface

Le pourcentage de PEG en surface des NPs a été calculée (**Équation 3.1**) afin de comprendre l'arrangement des blocs hydrophiles dans les NPs, en fonction de la quantité totale de PEG dans les NPs et de la taille du PEG. En effet, les particules à base de polymères amphiphiles tels que les PLA-PEG ne s'arrangent pas toujours idéalement sous forme d'un cœur formé par les parties hydrophobes, entourés d'une couronne de blocs hydrophile (**Figure 3.5 A**). Dans certains cas,

une fraction de bloc hydrophile peut être emprisonnée dans le cœur hydrophobe (**Figure 3.5 B**), réduisant la concentration de PEG à la surface. Ce phénomène a déjà été mis en évidence dans un certain nombre d'études <sup>6-7, 16-18</sup>, notamment quand la longueur des blocs hydrophiles est inférieure à celle des blocs hydrophobes<sup>7</sup>, avec l'utilisation de polymères multibloc PLA-PEG-PLA empêchant le PEG de se ségréger à la surface<sup>19</sup>, ou lorsque les temps de mélanges pendant la fabrication des NPs sont élevés<sup>17-18</sup>. La quantité de PEG en surface des NPs est pourtant rarement évaluée dans les publications utilisant des polymères amphiphiles pour la libération de médicament. Ce paramètre de caractérisation est pourtant important puisqu'une ségrégation du PEG dans le polymère peut i) fausser la quantification de la densité de PEG à la surface en la surestimant et ii) influencer probablement l'encapsulation d'actifs, leur libération et/ou leur dégradation<sup>17-18</sup>.



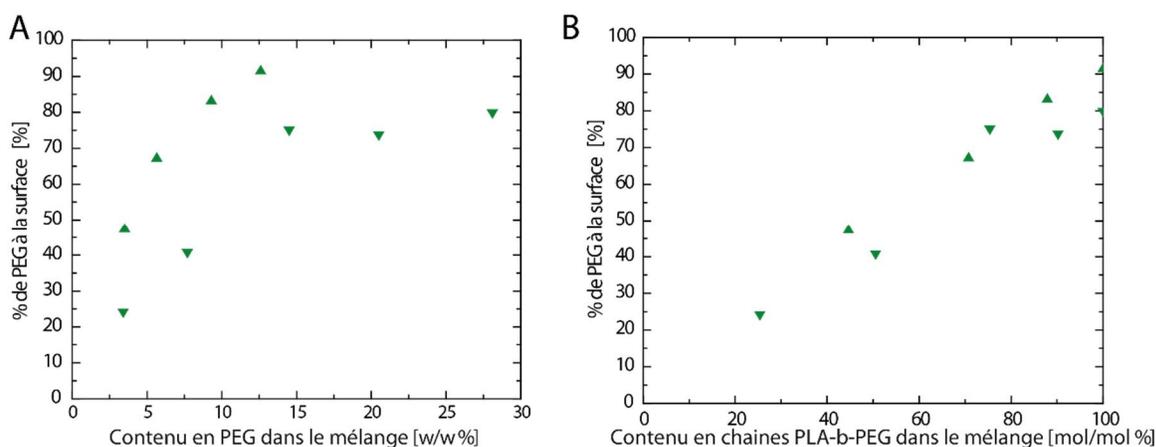
**Figure 3.5** A) Organisation cœur-couronne théorique d'une NPs à base de copolymères amphiphiles PLA-PEG. B) Organisation réelle pouvant être obtenue sous certaines conditions

Dans le cas des mélanges PLA/PLA-*b*-PEG étudiés ici, ce phénomène a été observé. En effet, une certaine fraction de PEG a été retrouvée à l'intérieur des NPs puisque le pourcentage de PEG à la surface est compris entre 20 et 90 % selon les conditions (**Figure 3.6**). Comme présenté dans la **figure 3.6A**, la ségrégation du PEG à la surface semble favorisée lorsque la quantité massique de PEG dans le mélange augmente, mais aussi lorsque la taille du PEG diminue. En retraçant les données en fonction du contenu molaire en chaînes de PLA-*b*-PEG dans les NPs, il est remarquable que la ségrégation du PEG dans le cœur solide ou à la surface dépende surtout du pourcentage molaire de chaînes de PLA-*b*-PEG dans les mélanges (**Figure 3.6B**). Plus il y a

de chaînes d'homopolymères PLA dans les mélanges, plus de PEG se retrouve emprisonné dans les NPs et ne peut pas se retrouver à la surface des NPs. La présence d'homopolymères PLA semble empêcher l'arrangement du PEG en surface et favorise donc le piégeage du PEG dans le cœur hydrophobe lors de la coprécipitation (**Figure 3.6B**). Ainsi, il est possible que, pour un pourcentage massique de PEG total identique, les NPs fabriquées à partir de mélange PLA/PLA-*b*-PEG5K aient une taille plus importante que celles de PLA/ PLA-*b*-PEG 2K (**Figure 3.3A**), car plus de PEG se retrouve piégé et ne peut donc pas participer à la répulsion stérique stabilisant les particules durant leur agrégation/coalescence.

Il est également observable que, pour les NPs fabriquées à partir des polymères PLA-*b*-PEG 5K, un plateau à 75 % de PEG en surface est atteint à partir 15 %<sub>p/p</sub> de PEG (75% molaire de chaînes diblocs) (**Figure 3.6A**). Un tel plateau n'est pas atteint pour les NPs fabriquées à partir des polymères PLA-*b*-PEG 2K, puisque l'on retrouve plus de 90 % du PEG en surface lorsque les NPs sont fabriquées avec 100 % de polymères diblocs. Une taille de PEG importante semble donc favoriser sa ségrégation dans le cœur hydrophobe.

Il est néanmoins important de préciser que pour les pourcentages de PEG inférieurs à 3 %<sub>p/p</sub> aucun PEG de surface n'a été détecté, indiquant soit une mauvaise sensibilité de la méthode RMN ou un piégeage complet du PEG dans le cœur de PLA.

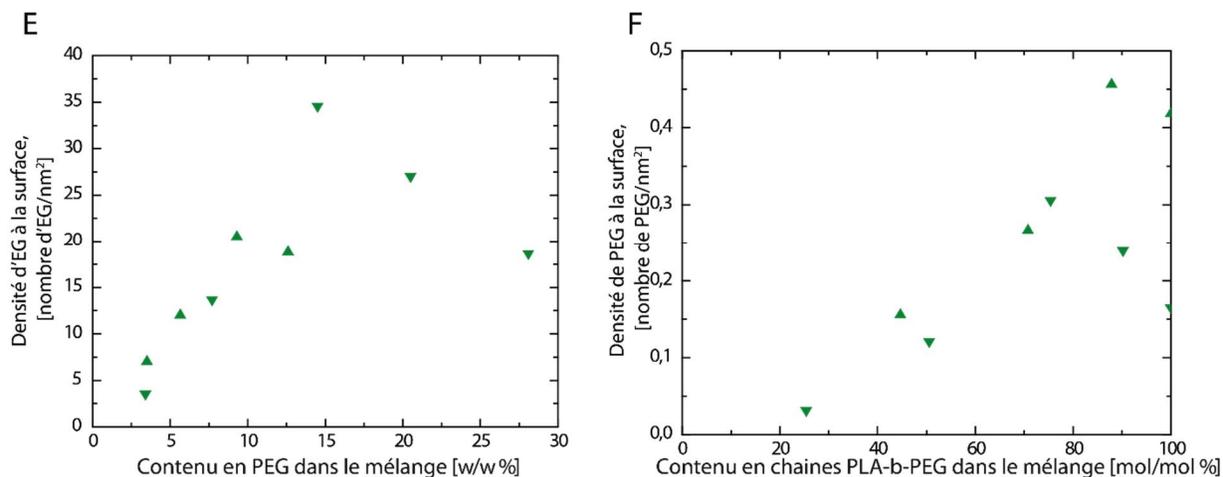


**Figure 3.6** % de PEG à la surface en fonction A) du contenu massique en PEG dans le mélange et B) du contenu molaire de chaînes PLA-*b*-PEG dans le mélange. Les symboles triangles ▲ représentent les NPs comportant la taille de PEG 2kDa, les symboles triangles ▼ représentent les NPs comportant la taille de PEG 5kDa.

#### 3.4.2.2.2 Densité de PEG à la surface

Après avoir mesuré la quantité réelle de PEG à la surface des particules, il a été possible de calculer la densité de PEG et la densité de motifs EG à la surface des NPs. Il a été observé que la densité d'EG à la surface variait avec la quantité de PEG totale dans les NPs (**Figure 3.7A**). Entre 0 et 15 %<sub>p/p</sub> de PEG pour les mélanges de polymères PLA/PLA-*b*-PEG 5K ou 0 et 10 %<sub>p/p</sub> de PEG pour les mélanges de polymères PLA/PLA-*b*-PEG 2K, la densité d'EG augmentait lorsque le pourcentage massique de PEG augmentait. Une diminution de la densité a ensuite été observée à des pourcentages massiques plus importants puisque i) la taille des NPs diminuait (**Figure 3.3**), augmentant ainsi l'aire totale de la surface des NPs et ii) le pourcentage de PEG en surface variait moins (**Figure 3.6**). Augmenter le pourcentage de PEG dans les NPs ne permet donc pas forcément d'augmenter la densité d'EG en surface des NPs puisque celle-ci est sensible à la taille des NPs et que la taille diminue avec le pourcentage de PEG. Ainsi pour obtenir de plus fortes densités d'EG à la surface des NPs en utilisant des polymères amphiphiles avec des pourcentages élevés de PEG, il est nécessaire de pouvoir augmenter la taille des NPs indépendamment de la composition hydrophile.

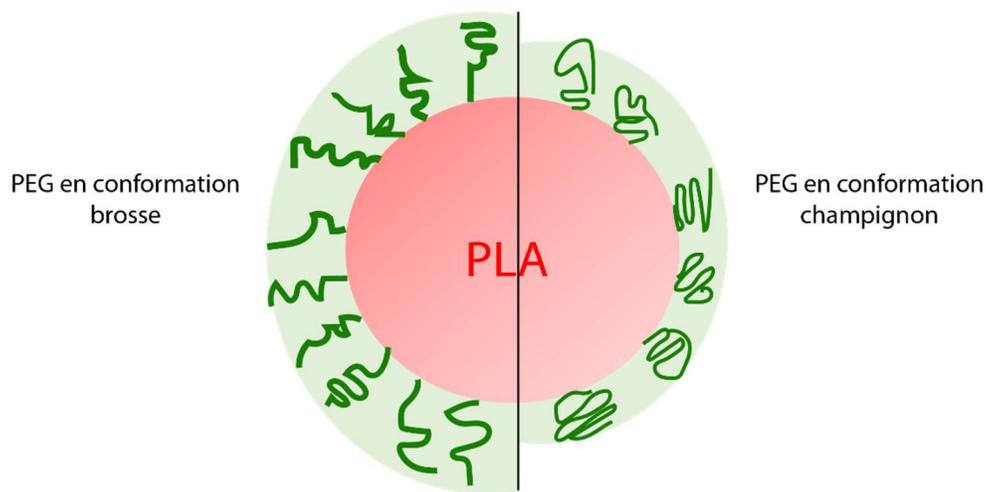
Le nombre de chaînes de PEG par unité de surface de NPs est quant à lui dépendant du pourcentage molaire de chaînes PLA-*b*-PEG dans le mélange, mais également de la taille du PEG. En effet, pour un même contenu molaire en PLA-*b*-PEG, une plus forte densité de PEG 2K a été retrouvée à la surface des NPs en comparaison au PEG 5K (**Figure 3.7B**), car la taille des NPs de PLA-*b*-PEG2K est plus élevée que celle des PLA-*b*-PEG5K (**Figure 3.3A**)



**Figure 3.7** Caractérisation de la surface de NPs fabriquées à partir de mélanges PLA/PLA-b-PEG. E) Densité de motifs EG à la surface des NPs. F) Densité de chaînes PEG à la surface des NPs. Les symboles triangles ▲ représentent les NPs comportant la taille de PEG 2kDa, les symboles triangles ▼ représentent les NPs comportant la taille de PEG 5kDa.

### 3.4.2.2.3 Conformation du PEG à la surface des NPs

Les chaînes de PEG peuvent adopter différentes conformations à la surface des NPs dans un bon solvant, dépendamment de leur taille et de leur densité à la surface. Ces conformations sont dites en champignon (« mushroom » en anglais) ou en brosse (« brush » en anglais) (**Figure 3.8**).



**Figure 3.8** Conformations possibles du PEG à la surface de NPs à base de copolymères amphiphiles PLA-PEG

Pour un rayon de Flory,<sup>vi</sup>  $R_F$ , donné, la distance  $D$  entre les chaînes de PEG conditionne la conformation des chaînes.

Le  $R_F$  dépend de la longueur de chaîne de PEG (Masse molaire  $M_{PEG}$ ), tandis que la distance  $D$  entre les chaînes de PEG est dépendante de la densité  $\sigma_{PEG}$  de chaînes de PEG à la surface des NPs.  $R_F$  peut être calculé selon l'équation 3.6 suivante :

$$R_F = aN^{\frac{3}{5}} \text{ (Équation 3.6)}$$

*Avec  $a$  la taille de du monomère (3.5 Å pour le PEG) et  $N$  le nombre de monomère dans la chaîne de PEG (22 pour le mPEG-OH 1 kDa, 45 pour le mPEG-OH 2 kDa et 114 pour le mPEG-OH 5 kDa, pour une masse molaire du motif EG de 44 g/mol).*

$D$  est calculé selon l'équation 3.7 suivante :

$$D = \sqrt{\frac{1}{\pi\sigma}} \text{ (Équation 3.7)}$$

Les chaînes adoptent une conformation champignon si  $D > 2R_F$ , une conformation brosse si  $R_F < D < 2R_F$  et une conformation en brosse dense si  $D < R_F$ .

La conformation du PEG à la surface des NPs est un paramètre important à évaluer lorsque l'on souhaite comparer des systèmes PEGylés, car il peut également influencer la libération de médicaments en régissant les interactions avec les milieux biologiques. En effet, il a par exemple été reporté qu'une conformation en brosse des chaînes de PEG permettait généralement une meilleure résistance à l'adsorption de protéines<sup>20</sup>. Ici, il a été remarqué que les chaînes de PEG s'arrangeaient toujours sous forme de brosse dense (**Tableau 3.3**), même si les NPs fabriquées à partir de quantité de PEG variables étaient caractérisées par différentes densités de surface. Une densité de chaînes de PEG inférieure à 0.03 PEG/nm<sup>2</sup> (contenu en PEG dans les mélanges polymériques inférieur à 3 %<sub>p/p</sub>) serait donc nécessaire pour que les chaînes de PEG adoptent une conformation différente, en brosse ou champignon.

---

<sup>vi</sup> Rayon de giration du polymère dans un bon solvant

**Tableau 3.3** Caractéristiques de la couche de PEG à la surface des NPs

Taille du PEG	Rayon de Flory du PEG	% de PEG dans le mélange	Densité de PEG à la surface	Distance D entre les chaînes de PEG	Conformation des chaînes de PEG
<i>g/mol</i>	<i>Nm</i>	<i>%<sub>p/p</sub></i>	<i>Nombre de chaînes de PEG/nm<sup>2</sup></i>	<i>Nm</i>	
2 000	3,4	1,5	ND	ND	ND
2 000	3,4	3,5	0,16	3,2	Brosse dense
2 000	3,4	5,6	0,27	1,6	Brosse dense
2 000	3,4	9,3	0,46	1	Brosse dense
2 000	3,4	12,6	0,42	1,3	Brosse dense
5 000	6,0	3,4	0,03	3,2	Brosse dense
5 000	6,0	7,7	0,12	1,6	Brosse dense
5 000	6,0	14,5	0,31	1	Brosse dense
5 000	6,0	20,5	0,24	1,2	Brosse dense
5 000	6,0	28,1	0,17	1,4	Brosse dense

### 3.5 Conclusion de la partie I

#### Points Clés

- L'influence de la composition hydrophile et de l'architecture des copolymères amphiphiles sur les propriétés physicochimiques des NPs a été étudiée
- La quantité de PEG dans les polymères ou les mélanges de polymères conditionne la taille, le potentiel Zêta, et la densité de PEG à la surface des NPs
- D'une manière générale, plus le contenu en PEG augmente, plus la taille des NPs diminue, plus le potentiel Zêta se rapproche de la neutralité et plus la densité de motifs EG à la surface augmente.
- Le PEG ne s'arrange pas toujours sous la forme d'une couronne hydrophile à la surface des NPs, mais peut être emprisonné à l'intérieur du cœur hydrophobe.
- L'architecture du polymère (linéaire ou branché) n'influe pas sur les caractéristiques des NPs étudiées ici (taille, polydispersité et potentiel Zêta). Néanmoins, les méthodes de caractérisation ne permettent pas de s'assurer que le PEG des architectures branchées forme réellement une « branche pendante » ou s'il se retrouve en bout de chaîne, formant de ce fait une architecture diblocs linéaire.
- Afin d'apprécier plus spécifiquement le rôle de l'architecture du polymère sur la formation des NPs, d'autres caractéristiques devraient être analysées (PEG de surface, propriétés thermiques, encapsulation de molécules, etc.)

La taille des NPs étant un paramètre clé contrôlant la biodisponibilité des formulations, il est nécessaire de pouvoir la contrôler indépendamment de la composition amphiphile afin de pouvoir obtenir une librairie de NPs dont les **compositions de surface varient, mais dont la taille reste identique**. Différentes méthodes de nanoprecipitation permettant de contrôler la taille des NPs, indépendamment de leur composition polymérique seront abordées dans la seconde partie de ce chapitre III.

## **-Partie II-**

# **Fabrication de nanoparticules : moduler la taille des nanoparticules polymériques**

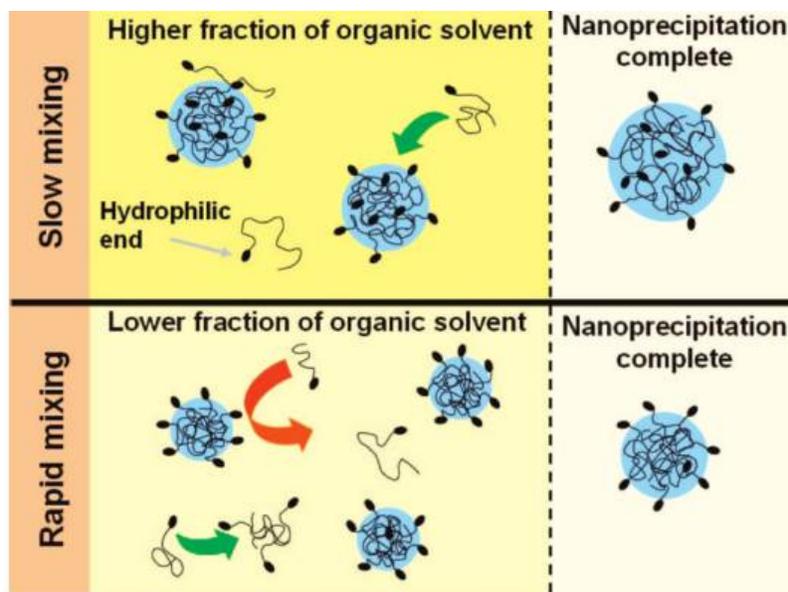
### 3.6 Introduction partie II

Comme mis en lumière dans la partie I de ce chapitre III, la taille des NPs est dépendante de la composition des NPs. Ainsi, pour obtenir une librairie de NPs de **compositions hydrophiles variables**, mais de **tailles identiques** à partir de différents polymères amphiphiles, le procédé de fabrication doit être optimisé.

Il y a un besoin de développer et d'utiliser des méthodes permettant de contrôler précisément la taille et l'uniformité des NPs indépendamment de leur composition, afin de pouvoir créer les vecteurs les plus performants selon l'application visée. Un des moyens permettant de contrôler la formation des NPs et donc leur taille est de contrôler la vitesse de mélange entre la phase aqueuse (anti-solvant du polymère) et la phase organique (solvant du polymère), phases requises lors de la fabrication des NPs.

En effet, lorsque le temps de mélange des phases,  $\tau_{\text{mix}}$ , est plus important que le temps de nucléation et d'agrégation/coalescence des particules,  $\tau_{\text{cls}}$ , les NPs commencent à se former alors que le mélange n'est pas complet. En raison d'une fraction variable de phase organique au cours du mélange, la sursaturation du polymère et donc sa nucléation ne sont pas homogènes. Un grand nombre de chaînes de polymères libres n'ayant pas formé de nucléi reste donc disponible en solution. Les NPs peuvent donc croître par addition de chaînes polymériques libres et agrégation/coalescence jusqu'à ce que le mélange phase aqueuse-phase organique soit complété et que les NPs soient stabilisées. Ainsi à  $\tau_{\text{mix}} > \tau_{\text{cls}}$ , la taille des NPs est dépendante du temps de mélange : plus le temps de mélange est long, plus les NPs ont la possibilité de grossir.

*A contrario*, lorsque  $\tau_{\text{mix}} < \tau_{\text{cls}}$ , la taille des NPs est la plus faible et est indépendante des conditions de mélanges. En effet, le mélange des phases est complété avant que les phénomènes de coalescence/agrégation ne puissent commencer<sup>3-4</sup>. La sursaturation du polymère plus homogène (en raison d'un mélange complet) génère alors un grand nombre de points de nucléation, réduisant la quantité de polymère libre disponible, limitant ainsi la croissance des particules. La **figure 3.9** schématise le mécanisme de formation des particules pendant la nanopréciipitation, selon le temps de mélange



**Figure 3.9** Mécanisme de formation des particules pendant la nanoprecipitation selon le temps de mélange<sup>18</sup>

Selon la théorie de formation des NPs proposée par le groupe du Pr Stuart Cohen<sup>3,21</sup>, le rayon final des particules,  $R_p$ , peut s'exprimer selon l'équation 3.8 suivante :

$$R_p = R_{p0} \cdot (1 + \kappa) \cdot \left(1 + \frac{\tau_{mix}}{\tau_{cls}}\right)^{1/3} \text{ (Équation 3.8)}$$

Avec  $R_{p0}$  le rayon des particules immédiatement après mélange et  $\kappa$  le ratio entre la surface initiale totale des particules et la surface maximale que le tensioactif (ou copolymère amphiphile) peut couvrir.

La technique classique de nanoprecipitation, dite en « vrac » (« bulk » en anglais) dans un bécher ne permet qu'un lent mélange des phases et souffre d'un manque de contrôle et de reproductibilité du procédé de mélange. Des méthodes de nanoprecipitation en flux, telles que la nanoprecipitation « flash »<sup>11</sup> ou la microfluidique<sup>22</sup> ont donc été récemment développées pour contrôler la dynamique de mélange et rendre les échanges plus rapides. La nanoprecipitation « Flash », développée par Johnson & Prud'homme repose sur un mélange turbulent d'un flux de phase aqueuse qui entre en collision avec un flux de phase organique contenant le soluté dissous, dans une chambre confinée cylindrique de quelques  $\mu\text{l}$  de volume<sup>4</sup>. Les systèmes de microfluidiques, reposent eux, sur un mélange laminaire des deux phases dans des microcanaux, avec de possibles zones chaotiques. Le temps de mélange, de l'ordre des

millisecondes pour ces méthodes, peut se contrôler par la vitesse des flux et/ou par la géométrie des systèmes<sup>23</sup>. Bien que ces deux méthodes offrent un contrôle sur le procédé de fabrication des NPs polymériques<sup>4, 18</sup> ou lipidiques<sup>24-25</sup>, elles n'ont jamais été systématiquement comparées. Une comparaison systématique de ces procédés de fabrication permettrait donc de donner des indications pour le choix du type de fabrication préférable selon les propriétés désirées de NPs.

Dans ce chapitre, la fabrication de NPs à partir de différents procédés de fabrication a été étudiée. Le but est d'identifier les variables influençant la taille des NPs, afin de choisir les conditions de fabrication les plus appropriées pour contrôler la taille. Une comparaison systématique de la taille des NPs selon le procédé de fabrication a donc été effectuée. Les méthodes testées étaient la méthode de nanoprecipitation classique<sup>1</sup>, une méthode de nanoprecipitation Flash utilisant une chambre de mélange à deux flux<sup>26</sup>, et une méthode de microfluidique dont la géométrie, basée sur<sup>27</sup>, est constituée de micro-canaux comprenant des structures chevronnées. Le système de microfluidique utilisé dans cette étude est développé par l'entreprise Precision Nanosystems et se compose à la fois d'une cartouche comprenant les microcanaux et d'un système automatisé permettant différentes vitesses d'injections.

### 3.7 Matériel et Méthodes partie II

#### 3.7.1 Matériel

Le polymère utilisé pour la fabrication des NPs dans cette étude est un polymère diblocs PLA-*b*-PEG2K dont les propriétés sont résumées dans le **tableau 3.4** suivant. L'acétone a été achetée chez Fisher Scientific (Loughborough, UK). De l'eau Milli-Q® a été utilisée tout au long de ce travail.

**Tableau 3.4** Propriétés du polymère PLA-*b*-PEG2K utilisés dans cette étude

Polymère	Masse molaire <i>Mn</i> (CPG)	Masse molaire <i>Mw</i> (CPG)	Masse molaire <i>Mw</i> (RMN)	Indice de polydispersité <i>PdI</i> (CPG)	Contenu réel en bloc hydrophile (CPG)	Contenu réel en bloc hydrophile (RMN)
	[g/mol]	[g/mol]	[g/mol]		[% <sub>p/p</sub> ]	[% <sub>p/p</sub> ]
PLA- <i>b</i> -PEG2K	14 600	23 500	17 500	1,8	8,5	11,4

#### 3.7.2 Méthodes

##### 3.7.2.1 Nanoprécipitation classique

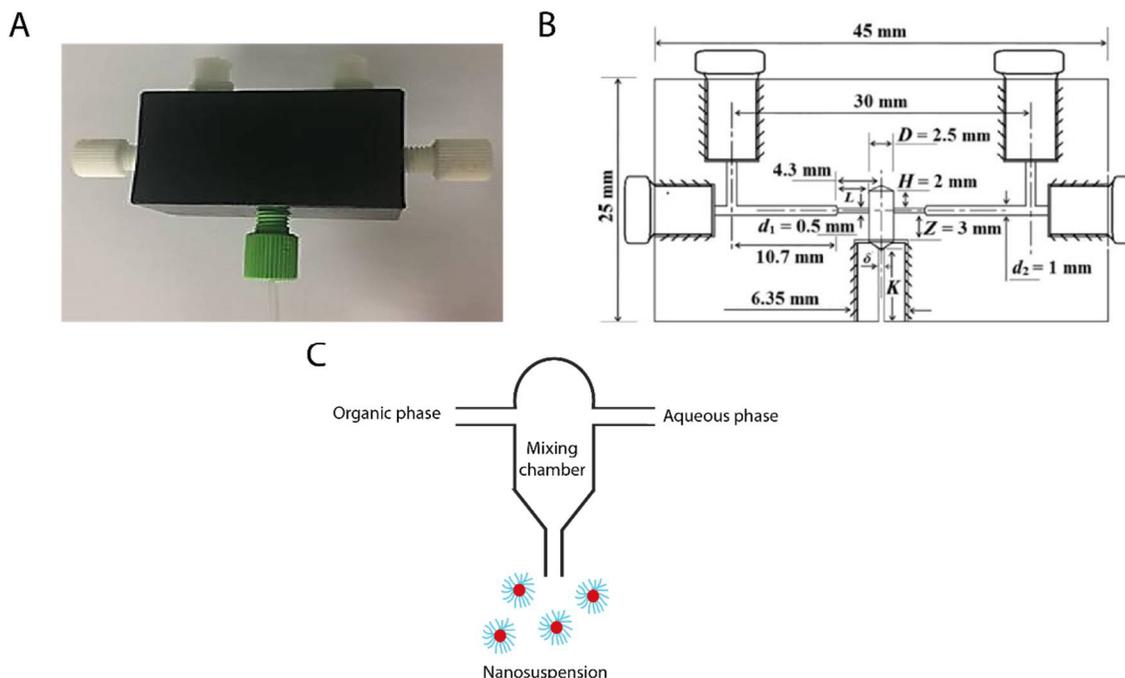
Pour la fabrication de NPs par nanoprécipitation classique, les polymères ont été dissous dans de l'acétone. La phase organique a été injectée, à l'aide d'un pousse seringue, à une vitesse constante de 1 mL/min dans une phase aqueuse (eau Milli-Q®) sous agitation constante (400 rotations/min). La majorité du solvant a été évaporée sous hotte et le restant a été retiré par une dialyse de 3 heures (membrane de cellulose régénérée, 6-8kDa, Spectra Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez USA) contre un volume d'eau 100 fois supérieur. Les propriétés physicochimiques des NPs ont été analysées juste après fabrication. Le procédé de fabrication a été présenté en **figure 3.1** (Partie I du chapitre).

##### 3.7.2.2 Nanoprécipitation Flash

Pour la fabrication de NPs par nanoprécipitation Flash utilisant un bloc de micromélange, les polymères ont été dissous dans de l'acétone. La phase organique et la phase aqueuse (eau Milli-Q®) ont été injectées dans le micromélangeur, à l'aide du système de pousse seringue du NanoAssemblr™ Benchtop™. Les nanosuspensions formées ont été récupérées dans un tube. La majorité du solvant a ensuite été évaporée sous hotte et le restant a été retiré par une dialyse

de 3 heures (membrane de cellulose régénérée, 6-8kDa, Spectra Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez USA) contre un volume d'eau 100 fois supérieur. Les propriétés physicochimiques des NPs ont été analysées juste après fabrication.

Le procédé de fabrication par nanopréciipitation flash est présenté en **figure 3.10**.



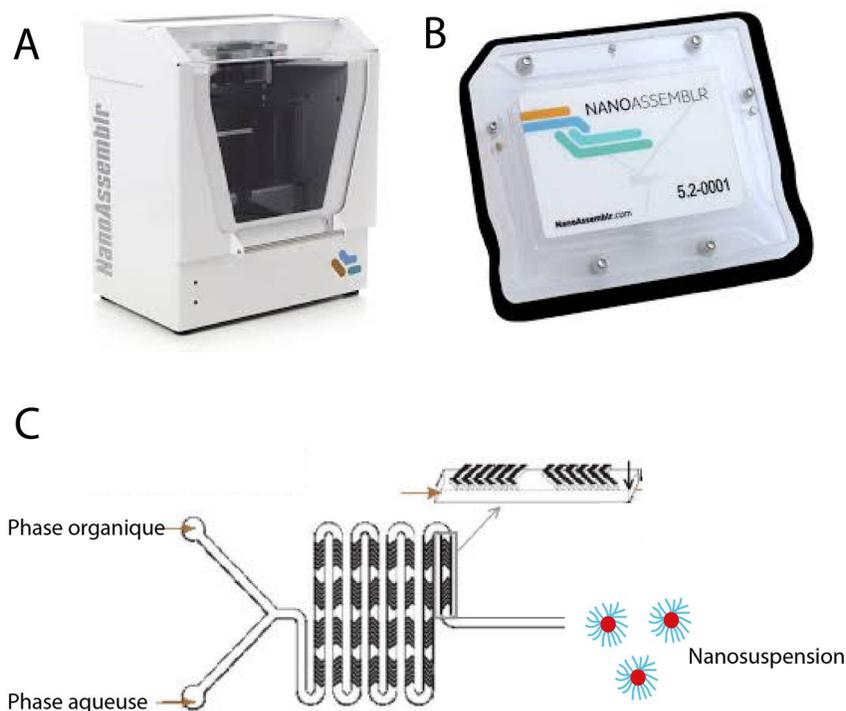
**Figure 3.10** Procédé de fabrication de NPs par Nanoprécipitation Flash A) Système de micromélange. Deux seringues sont connectées au système. Les débit d'injection, volumes et ratio phase organique : phase aqueuse peuvent être variés, soit par injection manuelle, soit en utilisant un pousse seringue, soit en utilisant le pousse seringue du système NanoAssemblr<sup>TM</sup> Benchtop<sup>TM</sup> B) Dimensions du micromélangeur utilisé <sup>26</sup> C) Géométrie du système de Nanoprécipitation Flash.

### 3.7.2.3 Microfluidique

Pour la fabrication de NPs par microfluidique, les polymères ont été dissous dans de l'acétone. La phase organique et la phase aqueuse (eau Milli-Q<sup>®</sup>) ont été injectées dans la cartouche de microfluidique NanoAssemblr<sup>TM</sup> (Precision Nano, Vancouver, Canada), à l'aide du système de pousse seringue du NanoAssemblr<sup>TM</sup> Benchtop<sup>TM</sup> (Precision Nano, Vancouver, Canada). Les nanosuspensions formées ont été récupérées dans un tube. La majorité du solvant a ensuite été évaporée sous hotte et le restant a été retiré par une dialyse de 3 heures (membrane de cellulose régénérée, 6-8kDa, Spectra Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez USA) contre un

volume d'eau 100 fois supérieur. Les propriétés physicochimiques des NPs ont été analysées juste après fabrication.

Le procédé de fabrication par microfluidique est présenté en **figure 3.11**.



**Figure 3.11** Procédé de fabrication de NPs par microfluidique. A) Appareil NanoAssemblr<sup>TM</sup> Benchtop<sup>TM</sup>, composé d'un système de pousse-seringue contrôlé par ordinateur. Les seringues, remplies de phase organique et de phase aqueuse sont connectés à la cartouche de microfluidique. Les débits d'injection, volumes et ratio phase : organique phase aqueuse peuvent être variés B) Cartouche de microfluidique NanoAssemblr<sup>TM</sup>. C) Géométrie du système microfluidique<sup>24</sup>. Les micro-canaux sont composés de structures en chevrons qui induisent des zones de mélanges chaotiques. *Note : la cartouche utilisée ne permet pas de travailler à des débits supérieurs à 15 mL/min en raison de fuites.*

#### 3.7.2.4 Paramètres de fabrication étudiés

Les paramètres suivants ont été variés dans ces trois procédés de fabrication de NPs :

- Le débit d'injection total des phases organique et aqueuse (entre 1 et 30 mL/min), pour les procédés de microfluidique /nanoprécipitation Flash. La concentration en polymère et le ratio phase organique : phase aqueuse ont alors été tenus constants (concentration de 20 mg/mL et ratio 1 : 5)

- La concentration en polymère dans la phase organique (entre 5 et 30 mg/mL, i.e. entre 0.5 et 3% p/v). Le débit d'injection et le ratio phase organique : phase aqueuse ont alors été tenus constants (débit de 12 mL/min ou 1 mL/min pour les procédés de microfluidique/nanoprécipitation Flash et de nanoprécipitation classique, respectivement, et ratio 1 : 5)

#### 3.7.2.5 Caractérisation de la taille des nanoparticules

La taille des NPs a été mesurée par la technique DLS après dilution dans de l'eau pure, à un angle de diffraction de 173°. L'appareil de mesure utilisé est un Malvern Zetasizer Nanoseries® (Malvern, Worcester, U.K.). Les mesures ont été effectuées en triplicata.

### 3.8 Résultats et Discussion partie II

Des NPs blanches, i.e. non chargées en actifs, ont été fabriquées à partir d'un polymère diblocs linéaire PLA-*b*-PEG2K, selon trois méthodes de fabrication basées sur le phénomène de nanoprécipitation : la nanoprécipitation classique, la nanoprécipitation Flash et la microfluidique. Pour chaque méthode, le débit de fabrication et la concentration en polymère dans la phase organique ont été variés. L'influence de la méthode de fabrication a été étudiée sur la taille et la distribution de taille des NPs.

#### 3.8.1 Influence du débit de fabrication

Le débit de fabrication utilisé pour la fabrication des NPs par microfluidique et nanoprécipitation Flash a été varié pour obtenir différents temps de mélange des phases aqueuse et organique. Les tailles des NPs obtenues ont été comparées en fonction du débit et de la méthode de fabrication.

Le procédé classique de nanoprécipitation permet d'obtenir une taille de NPs de 140 nm (**Figure 3.12A**). Cette taille a pu être facilement variée en utilisant les procédés en flux (**Figure 3.12A**). Par nanoprécipitation flash et microfluidique, des NPs de tailles comprises entre 60 et 175 nm ou 35 et 145 nm ont été obtenues, respectivement, sans changement de la composition polymérique hydrophile (**Figure 3.12A**). Les procédés en flux utilisant des micromélangeurs permettent ainsi de réduire la taille des NPs jusqu'à 4 fois par rapport au procédé classique de nanoprécipitation.

Comme attendu, il a été observé que la taille des NPs fabriquées dépendait du débit de fabrication (**Figure 3.12A**). Plus le débit des deux phases augmentait, plus le temps de mélange diminuait, et plus la taille des NPs diminuait, et ce, jusqu'à une taille limite de 35 nm. La croissance des particules est en effet dépendante du changement de solvant<sup>5</sup>. Faire varier le temps de mélange, à travers le débit d'injection des phases dans les mélangeurs, permet donc de contrôler facilement la taille des NPs.

Pour chaque débit, il a été remarqué que les tailles des NPs obtenues par microfluidique étaient systématiquement plus faibles que celles obtenues par nanoprécipitation Flash (**Figure 3.12A**). Cette comparaison met en évidence que, pour un débit donné, le procédé de microfluidique utilisant des microcanaux recouverts de chevrons permet un mélange plus efficace des phases que le procédé de nanoprécipitation flash par collision de jets dans une chambre. Il semble donc que, pour un même débit, le temps de mélange des phases soit plus court pour le procédé de microfluidique par rapport au procédé de nanoprécipitation Flash, en raison de la géométrie du mélange. Des temps de mélange aussi courts que 10 ms peuvent en effet être obtenus pour le procédé de microfluidique utilisé alors que le procédé de nanoprécipitation Flash utilisé ne permet d'atteindre que des temps de mélanges minimaux de 40 ms<sup>17</sup>. Le procédé de microfluidique permet donc d'atteindre la taille limite des NPs à plus faible débit que le procédé de nanoprécipitation Flash en permettant d'obtenir des temps de mélanges inférieurs au temps de coalescence/agrégation.

Le débit de fabrication a également une influence sur la polydispersité des particules formées. En effet, un mélange à des temps proches du temps de coalescence/agrégation des particules augmente la sursaturation du polymère qui favorise la nucléation des particules par rapport à leur croissance<sup>28</sup>, et donc permet théoriquement une meilleure homogénéité des tailles. Dans l'étude expérimentale menée dans ce projet, une telle diminution de la polydispersité est tout d'abord observée lorsque le temps de mélange diminue (débit qui augmente), mais à partir d'un débit de 12 mL/min, les NPs redeviennent plus polydisperses (**Figure 3.12 B**). Une hypothèse probable est qu'un débit trop important provoque des variations dans la turbulence du mélange, créant des zones de différents temps de mélange et donc une inhomogénéité de formation des particules.

### 3.8.2 Influence de la concentration en polymère

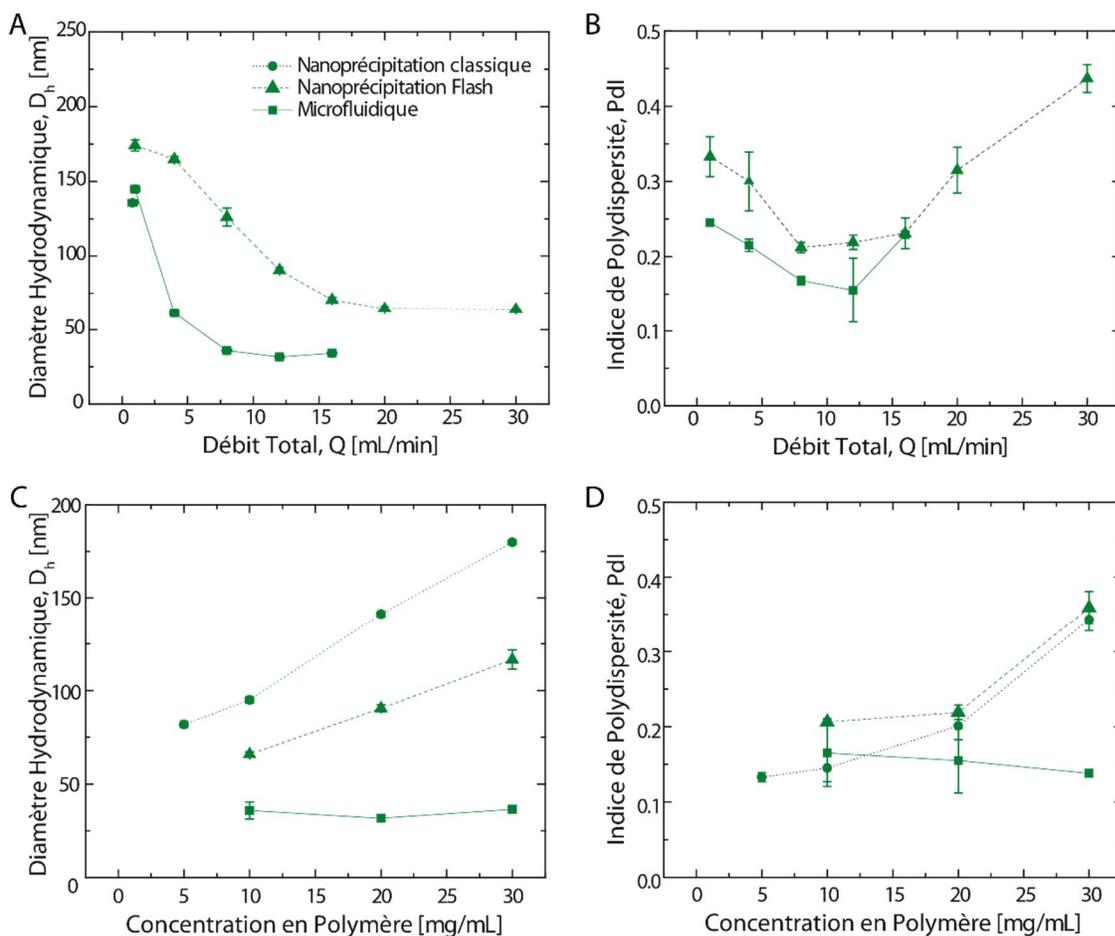
L'influence de la concentration en polymère sur la taille des particules a ensuite été évaluée pour les trois procédés de fabrication.

Il a été remarqué que la concentration en polymère influençait la taille des NPs obtenues par le procédé classique de nanopréciipitation et par le procédé de nanopréciipitation Flash. Plus la concentration de polymère dans la phase organique augmentait, plus la taille des particules formées augmentait (**Figure 3.12 C**). En effet, d'après l'étude de Stepanyan *et al.* le temps de coalescence des particules est dépendant de la concentration de polymère<sup>3</sup>. Ainsi plus la phase organique est concentrée en polymère, plus le temps de coalescence diminue<sup>3</sup>. Cette coalescence plus rapide liée à la concentration des polymères augmente ainsi le taux de croissance des particules. Par ailleurs, la concentration en polymère peut également modifier la viscosité du solvant<sup>29</sup> et donc sa diffusion.

Néanmoins, le procédé de fabrication par microfluidique ne semble pas sensible à ce paramètre de concentration, puisque la taille des NPs n'a pas varié en fonction de la concentration en polymère. Cette absence d'effet de la concentration pour ce polymère peut s'expliquer par le débit utilisé pour cette étude. En effet, les particules ont été formées à un débit de 12 mL/min. Pour ce débit en microfluidique et contrairement aux procédés de nanopréciipitation classique et Flash, la taille limite des NPs est atteinte. Il est donc probable qu'à ce débit, le  $\tau_{\text{mix}}$  soit égal ou inférieur au  $\tau_{\text{cls}}$ . Ainsi, avec ces caractéristiques de mélange, la taille des particules formées ne dépend plus de la coalescence (**Équation 3.8**), et donc ne dépend pas des concentrations polymériques utilisées. Une telle dépendance de la taille des NPs en fonction de la concentration en polymère et du temps de mélange a déjà été observée expérimentalement par Johnson & Prud'Homme<sup>30</sup> pour des NPs à base de PBA-*b*-PAA<sup>vii</sup>

---

<sup>vii</sup> PBA-*b*-PAA : poly(butylacrylate)-*b*-poly(acide acrylique)



**Figure 3.12** Influence des paramètres des procédés de fabrication étudiés sur la distribution de taille des NPs. A) Influence du débit total d'injection sur le diamètre hydrodynamique des NPs et B) sur leur polydispersité (ratio 5 :1, 20 mg/ml de polymère). C) Influence de la concentration en polymère dans la phase organique sur le diamètre hydrodynamique des NPs et D) sur leur polydispersité (ratio 5 :1, débit 12 mL/min).

Les symboles ronds ● représentent les NPs fabriquées par nanoprécipitation classique, les symboles carrés ■ représentent les NPs fabriquées par microfluidique, et les symboles triangles ▲ représentent les NPs fabriquées par nanoprécipitation Flash

### 3.9 Conclusion partie II

#### Points Clés

- Trois méthodes de fabrication de NPs polymériques (nanoprécipitation classique, « flash » et microfluidique) ont été comparées
- Les conditions de mélange des phases aqueuse et organique déterminent la taille des NPs polymériques
- La taille des NPs peut être facilement contrôlée en utilisant un procédé de fabrication en flux (nanoprécipitation « Flash » ou microfluidique) permettant d'obtenir un mélange de phases très rapide dont le temps de mélange peut être précisément varié, et ce, de manière reproductible.
- La taille des NPs peut également être modulée par changement de concentration
- Le choix de la géométrie du mélange conditionne la gamme de temps de mélange, et donc les tailles pouvant être obtenues.

Les conditions de mélange déterminent également d'autres propriétés essentielles des NPs. En effet, cette étude comparant les différents procédés de fabrication a par la suite été développée par l'équipe du Pr. Xavier Banquy et il a été montré que l'efficacité du mélange des phases influençait l'encapsulation de molécules actives de différentes lipophilies ainsi que la composition en PEG à la surface de NPs. Cette étude a permis de définir des lignes de conduite pour choisir le procédé de fabrication de NPs polymériques en tenant compte des propriétés de la molécule à encapsuler ainsi que des propriétés structurales désirées des NPs. Ce projet du laboratoire du Pr. Banquy a fait l'objet d'un article publié le 30 Avril 2018 dans le journal *Langmuir* de l'American Chemical Society<sup>17</sup>: ***Unified Scaling of the Structure and Loading of Nanoparticles Formed by Diffusion-Limited Coalescence.*** Teresita Rode García, Araceli García Ac, Augustine Lalloz, François-Xavier Lacasse, Patrice Hildgen, Jean-Michel Rabanel, Xavier Banquy. *Langmuir* 2018 34 (20), 5772-5780.

Une comparaison des procédés de fabrication utilisés dans ce projet est indiquée dans le **tableau 3.5** suivant.

**Tableau 3.5** Avantages et inconvénients des différents procédés de fabrication basée sur la nanopréciipitation

Procédé de fabrication	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
<b>Nano-précipitation Classique</b>	Mélange dans un bécher  $\tau_{\text{mix}}$ de l'ordre de la seconde	Pas d'équipements spécifiques nécessaires à son utilisation au laboratoire	Mélange lent  Pas de contrôle efficace du mélange et donc des propriétés des particules  Difficulté de « scale-up »
<b>Nano-précipitation Flash (géométrie <sup>26</sup>)</b>	Mélange par collision de jet dans une chambre confinée  $\tau_{\text{mix}}$ de l'ordre de $10^1$ - $10^3$ ms	Mélange rapide et pouvant être contrôlé par le débit d'injection/géométrie de la chambre  Technique en flux facilitant le « scale-up »	Pas de dispositifs commerciaux disponibles à ce jour
<b>Micro-fluidique (géométrie <sup>24</sup>)</b>	Mélange dans des microcanaux chevrons.  $\tau_{\text{mix}}$ de l'ordre de $10^1$ - $10^3$ ms	Mélange rapide et pouvant être contrôlé par le débit d'injection/géométrie du système  Technique en flux facilitant le « scale-up »  Système d'injection automatique garantissant la reproductibilité  Dispositifs microfluidiques disponibles commercialement.	Coût élevé des cartouches qui doivent être fréquemment remplacées en raison : - Mauvaise résistance des matériaux aux solvants organiques - Risque de bouchage dans les microcanaux si agrégation

### 3.10 Conclusion générale du chapitre III

Savoir contrôler finement les propriétés physico-chimiques des NPs est primordial pour concevoir les nanovecteurs les plus efficaces possible. Ce chapitre a permis de mettre en évidence que l'obtention de NPs de compositions de surface et de tailles spécifiques, sans post-modifications, nécessite à la fois une optimisation de la composition polymérique et du procédé de fabrication. Dans les chapitres suivants, présentant le rôle de la composition de surface des NPs sur la pénétration cutanée d'un actif modèle, des NPs de tailles identiques ont été fabriquées à base de polymères amphiphiles diblocs linéaires selon la méthode de nanopréciipitation « Flash ».

- Les polymères d'architecture linéaire ont été retenus puisque i) aucune différence de taille et potentiel Zêta de NPs n'a été observée entre les architectures de polymères, ii) les méthodes de caractérisations utilisées ne permettent pas de prouver la structure en branches et iii) l'architecture linéaire est la plus simple, la plus facilement synthétisable et la plus couramment utilisée pour la fabrication de NPs polymériques, ce qui permet de faciliter les comparaisons avec la littérature.
- Bien que le procédé de microfluidique permette de travailler à des conditions de mélange plus efficaces, le procédé de nanopréciipitation « Flash » a été choisi dans les études suivantes (Chapitres IV et V) en raison du critère économique. En effet, la durée de vie du micromélangeur Flash est largement supérieure à celle des cartouches microfluidiques, limitant ainsi le coût effectif de la fabrication des différentes formulations. Le procédé a été légèrement varié pour les études suivantes, car en analysant rétrospectivement la littérature, il a été remarqué que de mêmes débits devaient être utilisés pour les deux phases afin d'éviter que le mélange se fasse en dehors de la chambre de confinement. Un ratio 1 : 1 entre les phases a donc été utilisé, suivi d'une dilution dans l'eau <sup>26</sup> pour limiter la croissance des particules par murissement d'Ostwald <sup>26, 31</sup>.

- Dans les études suivantes (Chapitres IV et V), les débits de fabrication ont été variés selon la composition hydrophile des polymères afin d'obtenir une librairie de NPs, de composition hydrophile différente, mais de diamètre hydrodynamique similaire.

### Références bibliographiques Chapitre III

- (1) Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55* (1), R1-R4
- (2) Almoustafa, H. A.; Alshawsh, M. A.; Chik, Z. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *533* (1), 275-284
- (3) Stepanyan, R.; Lebouille, J. G. J. L.; Slot, J. J. M.; Tuinier, R.; Stuart, M. A. C. Controlled Nanoparticle Formation by Diffusion Limited Coalescence. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109* (13), 138301
- (4) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. Flash NanoPrecipitation of Organic Actives and Block Copolymers using a Confined Impinging Jets Mixer. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56* (10), 1021-1024
- (5) Lepeltier, E.; Bourgaux, C.; Couvreur, P. Nanoprecipitation and the "Ouzo effect": Application to drug delivery devices. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2014**, *71*, 86-97
- (6) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10374-10385
- (7) Riley, T.; Stolnik, S.; Heald, C. R.; Xiong, C. D.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; Purkiss, S. C.; Barlow, R. J.; Gellert, P. R. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)-Poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir* **2001**, *17* (11), 3168-3174
- (8) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Paka, G. D.; Ramassamy, C.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of polymer architecture on Curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**,
- (9) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**,
- (10) Riley, T.; Heald, C. R.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; King, S. M.; Heenan, R. K.; Purkiss, S. C.; Barlow, R. J.; Gellert, P. R.; Washington, C. Core-Shell Structure of PLA-PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery. *Langmuir* **2003**, *19* (20), 8428-8435
- (11) Saad, W. S.; Prud'homme, R. K. Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today* **2016**, *11* (2), 212-227
- (12) Gupta, A. P.; Kumar, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (10), 4053-4074
- (13) Gref, R.; Miralles, G.; Dellacherie, E. Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis. *Polym. Int.* **1999**, *48* (4), 251-256
- (14) Rabanel, J.-M.; Hildgen, P.; Banquy, X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release* **2014**, *185*, 71-87
- (15) Hrkach, J. S.; Peracchia, M. T.; Bomb, A.; Lotan, n.; Langer, R. Nanotechnology for biomaterials engineering: structural characterization of amphiphilic polymeric nanoparticles by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Biomaterials* **1997**, *18* (1), 27-30
- (16) Zhu, Z. Effects of amphiphilic diblock copolymer on drug nanoparticle formation and stability. *Biomaterials* **2013**, *34* (38), 10238-10248
- (17) Rode García, T.; García Ac, A.; Lalloz, A.; Lacasse, F.-X.; Hildgen, P.; Rabanel, J.-M.; Banquy, X. Unified Scaling of the Structure and Loading of Nanoparticles Formed by Diffusion-Limited Coalescence. *Langmuir* **2018**, *34* (20), 5772-5780
- (18) Karnik, R.; Gu, F.; Basto, P.; Cannizzaro, C.; Dean, L.; Kyei-Manu, W.; Langer, R.; Farokhzad, O. C. Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles. *Nano Letters* **2008**, *8* (9), 2906-2912

- (19) Essa, S.; Rabanel, J. M.; Hildgen, P. Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* **2010**, *75* (2), 96-106
- (20) Vonarbourg, A.; Passirani, C.; Saulnier, P.; Benoit, J.-P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials* **2006**, *27* (24), 4356-4373
- (21) Lebouille, J. G. J. L.; Stepanyan, R.; Slot, J. J. M.; Cohen Stuart, M. A.; Tuinier, R. Nanoprecipitation of polymers in a bad solvent. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2014**, *460*, 225-235
- (22) Valencia, P. M.; Farokhzad, O. C.; Karnik, R.; Langer, R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 623
- (23) Hickey, J. W.; Santos, J. L.; Williford, J.-M.; Mao, H.-Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *J. Controlled Release* **2015**, *219*, 536-547
- (24) Zhigaltsev, I. V.; Belliveau, N.; Hafez, I.; Leung, A. K. K.; Huft, J.; Hansen, C.; Cullis, P. R. Bottom-Up Design and Synthesis of Limit Size Lipid Nanoparticle Systems with Aqueous and Triglyceride Cores Using Millisecond Microfluidic Mixing. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3633-3640
- (25) Fang, R. H.; Chen, K. N.; Aryal, S.; Hu, C. M.; Zhang, K.; Zhang, L. Large-scale synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles using a multi-inlet vortex reactor. *Langmuir* **2012**, *28* (39), 13824-9
- (26) Han, J.; Zhu, Z.; Qian, H.; Wohl, A. R.; Beaman, C. J.; Hoye, T. R.; Macosko, C. W. A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (10), 4018-4023
- (27) Stroock, A. D.; Dertinger, S. K. W.; Ajdari, A.; Mezić, I.; Stone, H. A.; Whitesides, G. M. Chaotic Mixer for Microchannels. *Science* **2002**, *295* (5555), 647-651
- (28) Mahajan, A. J.; Kirwan, D. J. Nucleation and growth kinetics of biochemicals measured at high supersaturations. *Journal of Crystal Growth* **1994**, *144* (3), 281-290
- (29) Galindo-Rodriguez, S.; Allémann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharmaceutical Research* **2004**, *21* (8), 1428-1439
- (30) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. Mechanism for Rapid Self-Assembly of Block Copolymer Nanoparticles. *Physical Review Letters* **2003**, *91* (11), 118302
- (31) Liu, Y.; Kathan, K.; Saad, W.; Prud'homme, R. K. Ostwald Ripening of Beta-Carotene Nanoparticles. *Physical Review Letters* **2007**, *98* (3), 036102

## **-Chapitre IV-**

**Influence de la chimie de surface de nanoparticules polymériques sur la pénétration cutanée d'un actif modèle**

## 4.1 Introduction générale du chapitre IV

Dans ce chapitre, le rôle de la chimie de surface de NPs solides a été étudié sur différents aspects de l'efficacité d'un traitement pharmaceutique par la voie cutanée: la dégradation d'un actif, sa libération et son absorption dans la peau intacte ou lésée. L'actif modèle choisi est le cholécalférol. Différents polymères à base de PLA, provenant de la librairie de polymère synthétisée dans le chapitre II ont été utilisés (PLA, PLA-*b*-PEG et PLA-*b*-PMPC) pour formuler des NPs de différentes surfaces (respectivement une surface lipophile et négativement chargée de PLA, une surface hydrophile neutre de PEG et une surface hydrophile zwitterionique et biomimétique de PMPC), mais conservant des tailles identiques. Ces NPs polymériques de surfaces variées ont été systématiquement comparées à des NPs lipophiles et négativement chargées de cholécalférol « pur » (formulées et stables sans polymères) et à des micelles de tensioactifs.

L'influence de la composition des polymères et du débit de fabrication par nanopréciipitation Flash sur les propriétés physico-chimiques des NPs chargées en cholécalférol (taille, polydispersité, morphologie, encapsulation, potentiel zêta, quantité de polymère en surface) a été déterminée à travers une étude complète d'optimisation. La dégradation de l'actif modèle, sa libération in vitro dans un milieu lipidique modèle ainsi que sa pénétration dans la peau depuis les NPs ont ensuite été évaluées selon la chimie de surface des NPs (taille de NPs constante). Deux types de peaux ont été étudiés, une peau intacte et une peau lésée où le SC a été retiré, afin de déterminer l'influence de la surface cutanée sur la capacité de l'actif à pénétrer la peau, dépendamment de la chimie de surface des NPs.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique publié le 11 octobre 2018 dans International Journal of Pharmaceutics et intitulé : *Effect of Surface Chemistry of Polymeric Nanoparticles on Cutaneous Penetration of Cholecalciferol* (DOI : [10.1016/j.ijpharm.2018.09.046](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.046)). La synthèse des polymères et leurs caractérisations structurales ont été réalisées au sein du Laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutique et du Laboratoire de Biomatériaux et Interfaces Structurées avec l'aide du Dr Rabanel Jean-Michel, de Jimmy Faivre et de Pierre-Luc Latreille. Les aspects de formulations de NPs, de dégradation et de libération ont été traités au sein du Laboratoire de Biomatériaux et Interfaces Structurées

et du LAGEP, avec l'aide de Jimmy Faivre, de Araceli Garcia Ac et de Cyrielle Rakotovao. Les tests de pénétration cutanée ont été menés au LAGEP. Le manuscrit a été préparé par les Pr Stéphanie Briançon, Pr Marie-Alexandrine Bolzinger, Pr Patrice Hildgen, Pr Xavier Banquy et par moi-même.

# Effect of Surface Chemistry of Polymeric Nanoparticles on Cutaneous Penetration of Cholecalciferol

Augustine Lalloz<sup>a,b,c</sup>, Marie-Alexandrine Bolzinger<sup>a</sup>, Jimmy Faivre<sup>b</sup>, Pierre-Luc Latreille<sup>b,c</sup>, Araceli Garcia Ac<sup>b</sup>, Cyrielle Rakotovao<sup>b</sup>, Jean-Michel Rabanel<sup>b,c,viii</sup>, Patrice Hildgen<sup>c\*</sup>, Xavier Banquy<sup>b\*</sup>, Stéphanie Briançon<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, F-69100, Villeurbanne, France*

<sup>b</sup>*Canada Research Chair on Bio-inspired Materials and Interfaces, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada*

<sup>c</sup>*Laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutique, Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada*

\*Corresponding authors: [stephanie.briancon@univ-lyon1.fr](mailto:stephanie.briancon@univ-lyon1.fr); [xavier.banquy@umontreal.ca](mailto:xavier.banquy@umontreal.ca); [patrice.hildgen@umontreal.ca](mailto:patrice.hildgen@umontreal.ca);

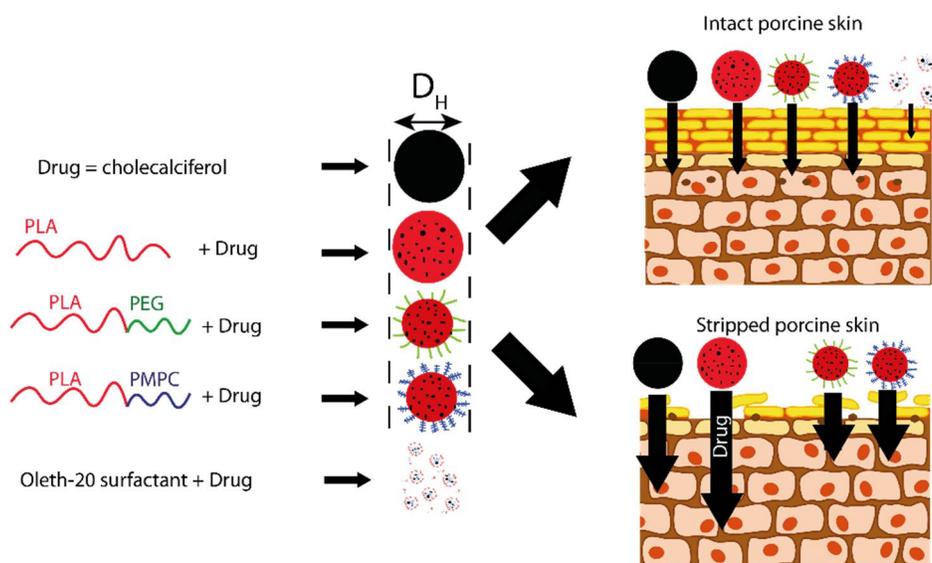
---

<sup>viii</sup> *Present address : INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada*

## 4.2 Abstract

We investigated the influence of nanoparticle (NP) surface composition on different aspects of skin delivery of a lipophilic drug: chemical stability, release and skin penetration. Cholecalciferol was chosen as a labile model drug. Poly(lactic acid) (PLA)-based NPs without surface coating, with a non-ionic poly(ethylene glycol) (PEG) coating, or with a zwitterionic poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) coating were prepared using flash nanoprecipitation. Process was optimized to obtain similar hydrodynamic diameters. Polymeric NPs were compared to non-polymeric cholecalciferol formulations. Cholecalciferol stability in aqueous medium was improved by polymeric encapsulation with a valuable effect of a hydrophilic coating. However, the *in vitro* release of the drug was found independent of the presence of any polymer, as for the drug penetration in an intact skin model. Such tendency was not observed in impaired skin since, when *stratum corneum* was removed, we found that a neutral hydrophilic coating around NPs reduced drug penetration compared to pure drug NPs and bare PLA NPs. The nature of the hydrophilic block (PEG or PMPC) had however no impact. We hypothesized that NPs surface influenced drug penetration in impaired skin due to different electrostatic interactions between NPs and charged skin components of viable skin layers.

## Graphical Abstract



## Keywords

Nanoparticle surface, flash nanoprecipitation, drug stability, skin penetration, impaired skin, cholecalciferol

### 4.3 Introduction

Drug delivery in complex tissues is a challenging task. The *in vivo* efficacy of pharmaceutical treatments is determined by the transport and the delivery of a sufficient quantity of active therapeutic agent to the target tissue or cells, avoiding any toxic side effects. Polymeric nanoparticles (NPs) carrying drugs have been developed for several decades to this end. Compared to traditional pharmaceutical formulations, these nanocarriers are able to solubilize drugs, to protect them from degradation during their transport in the organism in the host tissue or cells and to control their release<sup>1</sup>. The design of the most effective carrier is however relative to a fundamental knowledge which is the understanding of the specific interactions of NPs with biological systems, i.e. complex tissues, living cells and various tissues components<sup>2</sup>.

An example of such a complex tissue is the skin. Topical and transdermal delivery are particularly challenging tasks due to the specific structure of the skin made of successive stacks of cellular layers of different polarities. Notably, the external lipophilic layer of the skin, the *stratum corneum*, which is characterized by a compact structure of dead cells embedded in a lipid medium<sup>3</sup>, forms a remarkable barrier to the penetration of chemicals. Moreover, the transport of drugs into the skin can be affected by skin pathologies which alter the barrier integrity<sup>4</sup> due to various factors such as inflammation, desquamation, defects in lipid distribution or epidermal thickening. Designing efficient formulations to help drug crossing the skin barrier or target specific skin layers according to the pathology is therefore a great challenge. The use of NPs carrying drugs have been proposed to this end. Indeed, besides efficiently solubilizing drugs in their core, NPs can either i) stay on the skin surface, ii) accumulate in skin appendages, iii) penetrate the skin, iv) influence the skin surface or v) favor the drug partition between formulation and skin. These allow to improve, reduce or modulate the skin diffusion of the drug encapsulated<sup>5-6</sup>. Nevertheless, the role of the interactions between the skin and the NPs on the mechanisms of drug delivery is still unclear, as well as the role of the skin physiopathology on these interactions. In fact, most of the studies dealing with the skin

penetration of drugs from NPs are proof of concepts studies that only assess the penetration on healthy skin. Rare studies evaluating the penetration of drugs or NPs in damaged skin had however highlighted the importance to study penetration in a skin model close to the skin pathology since penetration can be thoroughly different than in intact skin <sup>7-11</sup>.

Along with size and shape, NPs surface properties are crucial parameters dictating the nano-bio interactions <sup>2, 12-13</sup>. For treatments with intravenous administration, the presence of ligands on the NPs surface affects the recognition of NPs to the targeted site <sup>14</sup> while a hydrophilic and dense coating of polymers hinders the opsonization of the NPs surface by plasmatic proteins, extending the circulation time in blood <sup>15-16</sup>. A faster diffusion of NPs coated with a hydrophilic layer of polymer in complex media was also reported <sup>17-19</sup> as well as a better colloidal stability in physiological media <sup>20-22</sup>. For skin treatments, a lot of studies have shown the influence of NPs surface charge on their penetration in skin. However, conclusions were often contradictory with no consensus obtained. Some studies have shown that cationic NPs penetrate more efficiently the skin or other tissues than anionic or neutral counterparts <sup>23-24</sup> due to favourable electrostatic attractive interactions with negatively-charged cell membranes <sup>23</sup>. Another study reported a more favourable penetration of anionic NPs, explained by possible repulsions with anionic skin lipids which created temporary channels within the skin facilitating penetration <sup>25</sup>. Other reports demonstrated that a PEG coating around gold NPs favored a deeper penetration of the NPs in the skin compared to charged NPs <sup>26-27</sup>. It was also shown that surface coating influence cytotoxicity in epidermal keratinocytes <sup>28</sup>. Since NPs surface influences penetration of NPs in skin, it should also control drug delivery to the skin. A thoughtful design of the polymeric NPs surface and a precise assessment of its effects seem therefore crucial in order to optimize and control the interactions skin-NPs and therefore maximize formulation efficiency. However, to date, studies evaluating the impact of the surface composition of polymeric nanocarriers encapsulating drugs on skin drug delivery, especially in impaired skin, are rare and did not systematically assess the penetration of the drug in all skin layers <sup>29</sup>.

In order to better figure out how surface properties of polymeric NPs can influence drug delivery to the normal or pathological skin, we propose to systematically compare different surface coatings of drug-loaded polymeric NPs commonly used for drug delivery purposes i.e. i) a lipophilic coating of poly(lactic acid) (PLA) polymer, ii) a neutral hydrophilic coating of

poly(ethylene glycol) (PEG) surrounding a PLA core, and iii) a zwitterionic hydrophilic coating of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) surrounding a PLA core. These polymeric NPs will be compared to iv) pure drug NPs formulated without polymer as control and to v) surfactant micelles. PEG was chosen because it is a well-established polymer coating for NPs, known to provide stealth properties to NPs<sup>30</sup>. Moreover, PEG is now extensively used as NPs coating for topical delivery<sup>31-40</sup>, but its role on drug delivery is still unclear. Recently, PMPC, a biomimetic zwitterionic polymer, has also demonstrated benefits for NPs surface coating as an alternative to PEG coating<sup>41</sup>. Originally designed to mimic and have affinities with the phospholipids bilayers of the cellular biomembranes<sup>42-43</sup>, its remarkable hygroscopic properties, arising from the highly hydrophilic nature of the phosphorylcholine head-groups, inhibits biofouling<sup>44</sup>. In rare reports studying PMPC for skin hydration, it was shown that PMPC can modify the *stratum corneum* structure by altering the organization of the lamellar phase of skin lipids and improving the skin water retention<sup>45-47</sup>. Its potential for skin drug delivery has almost never been studied<sup>48</sup> and we hypothesized that PMPC can modulate skin penetration, since a disorganization of the lipid structure affects the skin barrier function<sup>49</sup>. Cholecalciferol also named Vitamin D3, was chosen as a very lipophilic model drug (LogP 7.5) in the present study. The role of NPs composition on surface was systematically studied in the different aspects of drug delivery i.e. i) the formation of the drug-loaded NPs, ii) the drug stability in NPs, iii) the drug release in a lipophilic medium, and iv) the drug penetration into intact skin and into a model of impaired skin.

## 4.4 Materials & Methods

### 4.4.1 Materials

Analytical grade acetonitrile (ACN), methanol, toluene, hexane, tetrahydrofuran (THF), dichloromethane (DCM), dimethylsulfoxide (DMSO) anhydrous sodium sulfate and sodium chloride (NaCl) were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Hexanol was from Laboratoires MAT (Québec, Canada). Acetone was from Biosolve Chimie (Dieuze, France). Absolute ethanol was purchased from Us Technologies (St-Priest, France). Dimethylformamide (DMF) was obtained from Prolabo (Paris, France). Deuterated chloroform (CDCl<sub>3</sub>), deuterated water (D<sub>2</sub>O), anhydrous toluene, D,L-Lactide (3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione), poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG) (2 000 g/mol), stannous 2-ethylhexanoate

(Sn(Oct)<sub>2</sub>), bipyridine, CuBr,  $\alpha$ -bromoisobutyryl bromide, 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), diethyl ether, cholecalciferol, were supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Ethylene diamine tetracetique (EDTA) was purchased from BDH (Dubai, UAE). Deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD) was from Euriso-Top (Saint-Aubin, France). Butylhydroxytoluene (BHT) was from Jan Dekker (Amsterdam, Netherlands). Oleth-20 surfactant (Massocare ® O20) was bought from Comercial Quimica Masso (Barcelona, Spain). Isopropyl myristate was purchased from Cooper (Melun, France)

Solvents were used as received. Dilactide was purified by recrystallization in toluene and dried overnight in vacuum before use. mPEG was dried over anhydrous sodium sulfate in DCM and dried overnight in vacuum before use. Deionized water of 18 M $\Omega$  cm resistivity was used throughout the work.

For the preparation of Hank's Balanced salt solution (HBSS), potassium chloride, sodium chloride and D-glucose anhydrous were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK), potassium dihydrogenophosphate was from Prolabo (Paris, France), sodium bicarbonate was obtained from Cooper (Melun, France) and di-sodium hydrogenophosphate dihydrate was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

#### 4.4.2 Polymers synthesis

##### 4.4.2.1 Polymer characterization

Polymers were analyzed using <sup>1</sup>H NMR spectrometry on a Bruker Advanced 400 MHz spectrometer (Bruker, Germany). Samples were dissolved in CDCl<sub>3</sub> (PLA, PLA-Br, and PLA-*b*-PEG) or in a mixture 1:1 CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (PLA-*b*-PMPC). The molecular weight average by weight (*M<sub>w</sub>*) and by number (*M<sub>n</sub>*) as well as the polydispersity index (PDI, *M<sub>w</sub>*/*M<sub>n</sub>*) of PLA, PLA-*b*-PEG, and PLA-Br were obtained by gel permeation chromatography (GPC) using THF as solvent. The Breeze® system from Waters (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipped with a 717 plus autosampler, a 1525 Binary High Performance Liquid Chromatography (HPLC) pump, 3 consecutive GPC columns (Phenogel 5  $\mu$ m, Phenomenex, USA) and a refractive index detector, (Waters Corp., Milford, MA, USA) was used. The columns temperature was set at 35 °C and the THF flow rate at 1 mL/min. The calibration was carried out using linear polystyrene standards with molecular weight ranging from *M<sub>w</sub>* = 600 to 400,000 g/mol.

#### 4.4.2.2 PLA synthesis

PLA polymer was synthesized by ring opening polymerization (ROP) of D,L-dilactide with hexanol as initiator and Sn(Oct)<sub>2</sub> as catalyst, as previously reported<sup>50</sup>. D,L-dilactide, hexanol (1/250 lactic acid (LA) unit,  $4 \cdot 10^{-3}$  eq. LA) and Sn(Oct)<sub>2</sub> (1/5000 LA,  $2 \cdot 10^{-4}$  eq. LA) were introduced into a round double neck glass flask and were stirred at 100 rpm with a stirring blade under heating at 150 °C and argon atmosphere. After 6 hours, reaction was stopped by cooling down the mixture to room temperature and the polymer was dissolved in DCM. The organic phase was washed twice with water in a separating funnel to remove unreacted D,L-dilactide and oligomers and dried over anhydrous sodium sulfate. Polymer was finally precipitated twice in hexane and dried over vacuum 48 h. The final polymer structure was assessed by <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.3–1.5 (*m*, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.2 (*m*, 1H, CH) and GPC (**Table 4.1**).

#### 4.4.2.3 PLA-*b*-PEG synthesis

Similarly, PEG-*b*-PLA polymer was synthesized by ROP of D,L-dilactide with methoxyPEG-OH (2 kDa) as macroinitiator and Sn(Oct)<sub>2</sub> as catalyst, as previously reported<sup>50</sup>. D,L-dilactide, methoxyPEG-OH (1/250 LA,  $4 \cdot 10^{-3}$  eq. LA) and Sn(Oct)<sub>2</sub> (1/5000 LA,  $2 \cdot 10^{-4}$  eq. LA) were introduced into a round double neck glass flask and were stirred at 100 rpm with a stirring blade under heating at 150 °C and argon atmosphere. After 6 hours, reaction was stopped by cooling down the mixture to room temperature and the polymer was dissolved in DCM. The organic phase was washed twice with water in a separating funnel to remove unreacted D,L-dilactide, oligomers and unreacted PEG chains. Organic phase was dried over anhydrous sodium sulfate. Polymer was finally precipitated twice in cold methanol to remove remaining unreacted mPEG chains and was collected with a Buchner funnel. Polymer was dried over vacuum 48 h. The final polymer structure was characterized by <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.3–1.5 (*m*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.38 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.65 (*m*, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.2 (*m*, 1H, CH) and GPC (**Table 4.1**).

#### 4.4.2.4 PLA-*b*-PMPC synthesis

PLA-*b*-PMPC polymer was synthesized according to the protocol of Hsiue *et al.* as described below<sup>51</sup>.

#### 4.4.2.4.1 Synthesis of poly(D,L-lactide) bromide-terminated (PLA-Br) macroinitiator

Another batch of PLA polymer was synthesized and purified as described above. PLA-Br macroinitiator was prepared by the addition of  $\alpha$ -bromoisobutyryl bromide to OH-terminated PLA. Briefly, OH-terminated PLA (20 kDa) was dissolved in 20 mL anhydrous toluene. Argon was bubbled in the reaction medium and the flask was placed in an ice bath.  $\alpha$ -bromoisobutyryl bromide (5 eq. OH) was then added dropwise to the reaction medium and the reaction was left for 5 h. The resulting atom transfer radical polymerization (ATRP) macroinitiator was purified by three successive precipitations in hexane/diethylether (9:1, v/v). The end-chain modification was confirmed by  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.98 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ ). PLA-Br molecular weight was measured by GPC (see **Table 4.1**).

#### 4.4.2.4.2 Synthesis of poly(D,L-lactide)-block-poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PLA-b-PMPC) diblock copolymer using ATRP

PLA-Br (20 kDa) and MPC (40 eq. Br) were dissolved in DMSO/MeOH (1:1 v/v) and bubbled in argon for 20 min. 2,2'-bipyridine (2 eq. Br) and CuBr (1 eq. Br) were then added to the reaction medium and the solution was left 48 h under argon. After polymerization termination by exposure of the reaction medium to ambient oxygen, the polymer was dialyzed for 12 h against water and an excess of EDTA to remove unreacted MPC and copper catalyst followed by a 24 h dialysis in water to remove EDTA. The polymer was then freeze-dried for 72 h. The final polymer structure was checked by  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  1.3–1.5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.4 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 3.8 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.1 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.3 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ) 5.2 (m, 1H, CH) (see **Table 4.1**).

### 4.4.3 Nanoparticles manufacturing using Flash Nanoprecipitation

#### 4.4.3.1 Preparation and purification of NPs

Drug loaded-polymeric NPs and pure drug NPs were prepared by Flash Nanoprecipitation using a Confined Impingement Jet Mixer (CIJM) fabricated in-house according to Han *et al.*<sup>52</sup>.

For the fabrication of polymeric NPs, the organic phase was composed of polymer (1 or 2% w/ $v_{\text{organic phase}}$ ), cholecalciferol (7% w/ $w_{\text{polymer}}$  i.e. 0.07 or 0.14 % w/ $v_{\text{organic phase}}$ ) and BHT (4% w/ $w_{\text{polymer}}$ , i.e. 0.04 or 0.08 % w/ $v_{\text{organic phase}}$ ) dissolved in acetone for PLA or PLA-*b*-PEG or in a mixture of acetone:methanol (1:1) for PLA-*b*-PMPC.

For the fabrication of pure drug NPs, the organic phase was composed of cholecalciferol (0.14 % w/v<sub>organic phase</sub>) and BHT (0.08 % w/v<sub>organic phase</sub>) dissolved in acetone.

For the NPs fabrication setup, two 3mL syringes were loaded with 3mL of the previously described organic phases and 3 mL of distilled water, respectively. Both syringes were connected to the CIJM. The organic and aqueous phases were injected into the mixing chamber with an equal flow rate. The total flow rate was varied between 0.5-200 mL/min. Immediately after mixing, the nanosuspension was diluted in 12 mL of distilled water stirred at 400 rpm to quench particle growth.

After NPs fabrication, the resulting nanosuspension was dialyzed against distilled water under stirring for 3h in a regenerated cellulose membrane bag with a cut-off of 10-12kDa (Spectra Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) to remove organic solvents. Traces of organic solvents were then gently evaporated under reduced pressure. Finally, NPs were purified by centrifugation (5 min at 2300 g) to remove potential aggregates of NPs or polymers.

BHT, an antioxidant, was coprecipitated with cholecalciferol to prevent cholecalciferol degradation. NPs batches without BHT were also prepared.

#### 4.4.3.2 Characterization

##### 4.4.3.2.1 *Size*

NP size and polydispersity (PDI) were determined after dilution in deionized water by dynamic light scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer NanoSeries (Malvern, Worcester, U.K.) at a diffraction angle of 173°. Measurements were done in triplicate at 25 °C.

##### 4.4.3.2.2 *Zeta Potential*

Zeta Potential (ZP) of the NPs was determined after dilution in 5 mM NaCl solution by electrophoretic light scattering (ELS) on a Malvern Zetasizer NanoSeries (Malvern, Worcester, U.K.). NaCl was added because deionized water is not conductive enough to allow regular particle motion<sup>53</sup>. Measurements were done in triplicate at 25 °C.

##### 4.4.3.2.3 *Drug content*

Total drug content in formulations after purification was analyzed by UV-HPLC (method described below, paragraph 2.7) after dissolution of 100 µL of formulation in acetonitrile (1:9) and filtration through a 0.2 µm nylon filter.

Drug yield in nanosuspensions after purification and drug loading (DL) of the NPs were then calculated using **equations (4.1) and (4.2)** respectively.

$$\text{Drug yield (\%)} = \frac{\text{cholecalciferol mass in NPs formulation}}{\text{Total initial cholecalciferol mass}} * 100 \quad \text{Equation. 4.1}$$

$$\text{DL (\%)} = \frac{\text{mass of cholecalciferol in NPs formulation}}{\text{mass of NPs}} * 100 \quad \text{Equation. 4.2}$$

NPs concentration was determined by freeze-drying and accurate weighting 1 mL of NPs suspension. Measurements were done in triplicate.

#### 4.4.3.2.4 TEM imaging

Cholecalciferol/BHT drug-loaded NPs were imaged by transmission electronic microscopy. 3  $\mu\text{L}$  droplets of NP suspensions (0.1–1 mg/mL) were deposited on Formvar-Carbon 200 mesh copper grids (Canemco-Marivac, Lakefield, Canada) at room temperature. After 10 minutes, excess liquid was soaked with a wiper and grids were air-dried for 2-3 hours before image acquisition. No staining procedure was used. NP image were taken in bright-field mode in a JEM-2100F field-emission electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operating 200 kV acceleration voltage. The imaging procedure is as follows. The grids were introduced into the microscope column under vacuum and the samples were cooled with liquid nitrogen added in the sample holder (Gatan Inc., Warrendale, PA). A temperature controller (Smart Set model 900 cold stage controller; Gatan Inc., Warrendale, PA) maintained the grids at  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$  during the imaging process. Images were recorded with a digital camera at low electron dose to prevent damage to the heat-sensitive particles.

#### 4.4.3.2.5 Hydrophilic block surface density

Quantification of polymer surface grafting density was performed by  $^1\text{H}$  NMR following the method proposed in reference <sup>50</sup>. To enhance NMR signal, cholecalciferol/BHT drug-loaded NPs made of PLA-*b*-PEG or PLA-*b*-PMPC were first concentrated up to 5-fold by ultrafiltration (Ultrafiltration disk membranes, 10 kDa, 76 mm, Millipore®, Sigma Aldrich, Steinheim Germany) (final NPs concentration 10-15 mg/mL). For the quantification of total hydrophilic block in NPs (PMPC or PEG), NPs mass concentration was determined by freeze-drying and accurate weighting of 300  $\mu\text{L}$  of NPs suspension. Freeze-dried PLA-*b*-PEG NPs and PLA-*b*-

PMPC NPs were then dissolved respectively in CDCl<sub>3</sub> or CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD (1:1) and analyzed by <sup>1</sup>H NMR (Bruker AV500, Bruker, Germany). For the quantification of surface hydrophilic block, 500 μL of concentrated NPs suspension were diluted with 500 μL of deuterium oxide using DMF as an internal standard (6 mg/g) and analyzed by <sup>1</sup>H NMR (Bruker AV500, Bruker, Germany). Quantifications were conducted with reference to the intensity of one peak of DMF standard at 3.01 ppm (*3H, s, CH<sub>3</sub>*). PEG or PMPC chain surface densities measurements were done in duplicate.

#### 4.4.3.2.6 Percentage of pure drug NPs in polymeric nanosuspensions

The percentage of pure drug NPs, i.e. non-encapsulated in polymers, in cholecalciferol/BHT drug-loaded polymeric nanosuspensions was determined by a centrifugation test. Briefly, 1 mL of polymeric nanosuspensions was centrifuged at 60 000 g for 2 hours. 1 mL of pure drug NPs was also centrifuged to serve as control. 100 μL of supernatant were withdrawn and cholecalciferol in supernatant was quantified after dilution in acetonitrile (1:9) by UV-HPLC (method described below, paragraph 2.7). Measurements were done in triplicate.

#### 4.4.4 Cholecalciferol stability in NPs

Formulations with or without BHT antioxidant were studied. NPs were diluted if necessary to achieve a cholecalciferol concentration of 90 μg/mL and a NPs concentration of 1.2 mg/mL. A micellar solution of cholecalciferol at the same concentration was used as control. Surfactant concentration in the control micellar solution was 5 mg/mL. Nanosuspensions or micelles were incubated at 37 °C in a water bath protected from light. After 1, 2, 4, 8 and 24 hours of incubation, 100 μL of formulation were withdrawn. Cholecalciferol remaining in formulations was quantified after dilution in acetonitrile (1:9) by UV-HPLC (method described below, paragraph 2.7). Degradation was tested at least n=6.

#### 4.4.5 Cholecalciferol release from NPs

*In vitro* release of cholecalciferol from the formulations was performed in a membraneless 2 phases system. Cholecalciferol/BHT drug-loaded NPs were diluted in distilled water if necessary to achieve a cholecalciferol concentration of 90 μg/mL and a NPs concentration of 1.2 mg/mL. A micellar solution of cholecalciferol at the same concentration was used as control. Surfactant concentration in control micelles was 5 mg/mL. Briefly, 100 μL of NPs suspension

or micellar solution were mixed with 1 mL of isopropyl myristate (IPM). IPM was used as release medium because of its immiscibility with water and its similarities to the skin properties<sup>54</sup>. Cholecalciferol is fully soluble in IPM ensuring sink conditions. Release was performed under stirring at 400 rpm in a water bath heated at 37 °C and protected from light. After 1, 2, 4, 8 and 24 hours of incubation in the release medium, samples were centrifuged for 2 min at 2,000g to separate IPM from the aqueous phase. Cholecalciferol was quantified in IPM after dilution in acetonitrile (1:9) by UV-HPLC (method described below, paragraph 2.7). Release study was tested in triplicate for each nanosuspension.

#### 4.4.6 Cholecalciferol skin penetration studies

Skin flanks were obtained from young female pigs (30±2 kg) freshly sacrificed at the École de Chirurgie (Université Claude Bernard Lyon1, Lyon France). Porcine skin was used as a model of human skin in the penetration test due to its similarity in terms of morphology and permeability to human skin<sup>55</sup>. Skin was stored frozen flat at -20°C on aluminium foil until use. Skin flanks were used within 3 months of storage.

On the day of the experiments, skin was thawed at room temperature and hairs were cut with an electric clipper. The subcutaneous fatty tissue was removed with a scalpel and the excised skin was cleaned up with tap water. Skin thickness was measured with a caliper (Mitutoyo) (1.25 ± 0.10 mm). To evaluate skin integrity, transepidermal water loss (TEWL) was measured on each skin piece using a Tewameter TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Köln, Germany) according to OECD guidelines<sup>56</sup>. Skin pieces were considered suitable with a TEWL value lower than 15 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup>. For penetration studies on highly impaired skin, *stratum corneum* was removed by tape stripping (Standard D-Squame, Monaderm, Monaco) up to reach a TEWL value between 30-40 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup><sup>8,57</sup>.

Skin pieces were mounted between the donor and receptor chamber of Franz-type static diffusion cells. The effective skin area of diffusion was 2.54 cm<sup>2</sup>. The receptor medium was composed of HBSS buffer at pH 7.4 with 0.5 %<sub>w/w</sub> of oleth-20 to insure sink conditions and 0.002 %<sub>w/w</sub> of BHT to avoid drug oxidation. After 30 min of equilibration in a water bath at 37 °C, 1mL of formulations (polymeric NPs, pure drug NPs, surfactant micelles, with BHT as antioxydant) was deposited on the skin surface. NPs were diluted if necessary to achieve a

cholecalciferol concentration of 90 µg/mL and a NPs concentration of 1.2 mg/mL. A micellar solution of cholecalciferol at the same concentration was used as control. Surfactant concentration in control micelles was 5 mg/mL. All experiments were performed in a water bath heated at 37 °C under occlusive conditions, protected from light and with stirring of the receptor medium at 400 rpm. After 24 hours of incubation with formulations, the cells were disassembled. All the receptor fluid was removed, and freeze-dried. To remove non-absorbed NPs, the skin surface was washed thrice with 1 mL of fresh receptor fluid solution and wiped with a cotton swab. One tape-strip was also performed on the skin surface to remove the last residues of formulation adhering to the skin.

For intact skin, skin was separated in its three layers: *stratum corneum*, viable epidermis and dermis. For impaired skin, skin was separated in two layers: viable epidermis and dermis. *Stratum corneum* was isolated from viable layers by tape stripping (28 strips). The viable epidermis was peeled off from the dermis after heat treatment in water at 60 °C for 45 s. Both epidermis and dermis were cut into small pieces.

Cholecalciferol was extracted from all skin layers as well as from the freeze-dried receptor fluid and residual formulation using acetonitrile containing 0.002 %<sub>w/w</sub> BHT under ultrasounds for 1 hour. Cholecalciferol was quantified in each extract by UV-HPLC (method described below, paragraph 2.7) after filtration through a 0.2 µm nylon membrane.

Skins from at least 3 different pigs were tested in triplicate each (n = 9 in total).

#### 4.4.7 Drug quantification by UV-HPLC

UV-RP-HPLC was used to quantified cholecalciferol content in the different samples using a previously published method with some modifications<sup>58</sup>. The HPLC set up from Waters (St Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters e2695 separation module, a reverse phase column XSelect<sup>®</sup> HSS C18 (4.6 × 150 mm, 3.5µm) and a Waters 2998 photodiode array UV detector. The wavelength was set up at 266 nm and the column was heated at 30 °C. Cholecalciferol was eluted using an isocratic method at a flow rate of 1 mL.min<sup>-1</sup> with a mobile phase of methanol/acetonitrile (90:10). Retention time of cholecalciferol was 6.4 min. 20 or 40 µL of samples were injected. Calibration curves were prepared in ACN, water:ACN (10:90) or IPM :ACN (10:90). The linear range was 20 to 0.03 µg.mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup>=0.999). Data were analyzed with Empower 3 software.

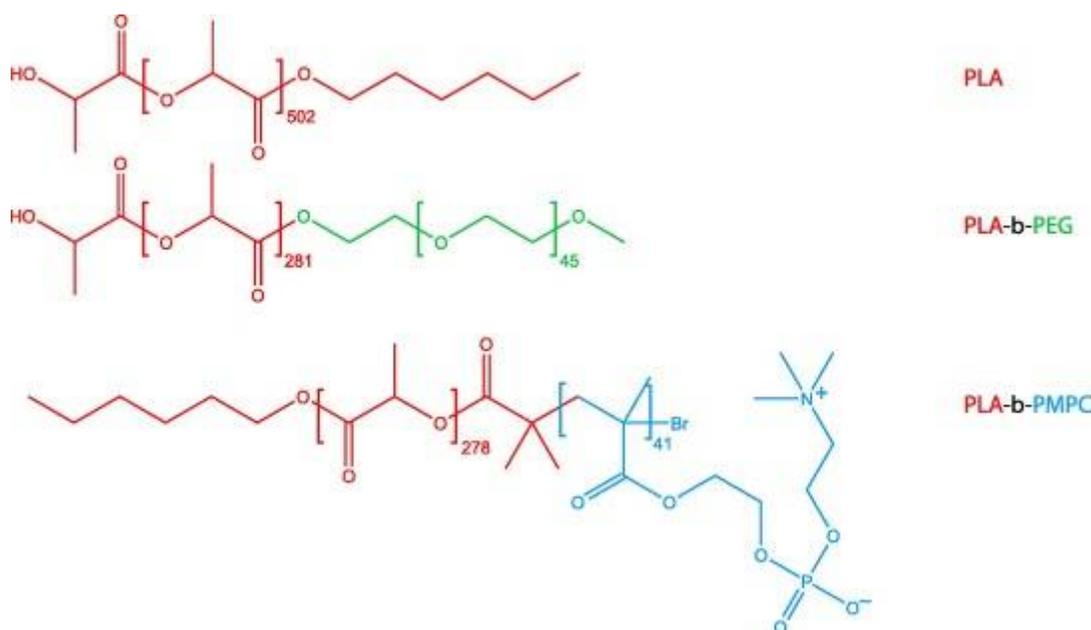
#### 4.4.8 Statistical analysis

Comparison of formulations was performed with a Student-t test. Significance level was set at  $p < 0.05$

### 4.5 Results and Discussions

#### 4.5.1 Polymers characteristics

PLA and PLA-*b*-PEG polymers were synthesized by ring opening polymerization of dilactide with either hexanol or mPEG-OH (2kDa) as chain initiator. PLA-*b*-PMPC was synthesized by chain elongation of PLA with MPC according to an ATRP polymerization after a PLA chain-end functionalization with  $\alpha$ -bromoisobutyryl bromide. The polymers were characterized by GPC and  $^1\text{H}$  NMR. The chemical structures of PLA, PLA-*b*-PEG, and PLA-*b*-PMPC polymers are presented in **Figure 4.1**. Mass molecular weight,  $M_w$ , and polydispersity index, are presented in **Table 4.1**. The three polymers have a PLA block of  $M_w = 20$  (PLA-*b*-PEG and PLA-*b*-PMPC) and 36 kDa (PLA) with a low dispersity. The length of the PLA block was chosen to facilitate the formation of NPs able to encapsulate lipophilic drugs by nanoprecipitation<sup>59</sup>. PMPC length was adjusted in order to have the same degree of polymerisation of PEG 2 kDa.



**Figure 4.1** Chemical structure of PLA, PLA-*b*-PEG, and PLA-*b*-PMPC polymers.

**Table 4.1** Polymer properties characterized by <sup>1</sup>H NMR and GPC. (<sup>1</sup>H NMR spectra of polymers and details of calculations are reported in Supporting Information (see Figure 4.S1 and 4.S2))

Polymer	PLA	PLA- <i>b</i> -PEG	PLA- <i>b</i> -PMPC
Hydrophobic block <i>M<sub>w</sub></i> [g/mol] *	36 300	20 300	20 100
Hydrophilic block <i>M<sub>w</sub></i> [g/mol] **	-	2 000	12 300
Total <i>M<sub>w</sub></i> [g/mol] ***	36 300	22 300	32 400
Polydispersity Index *	1.36	1.52	-
Polymerisation degree of hydrophilic block	-	45	41
Hydrophilic block content [%w/w <sub>t</sub> ] ***	-	8.9	37.9

\* calculated from GPC analysis

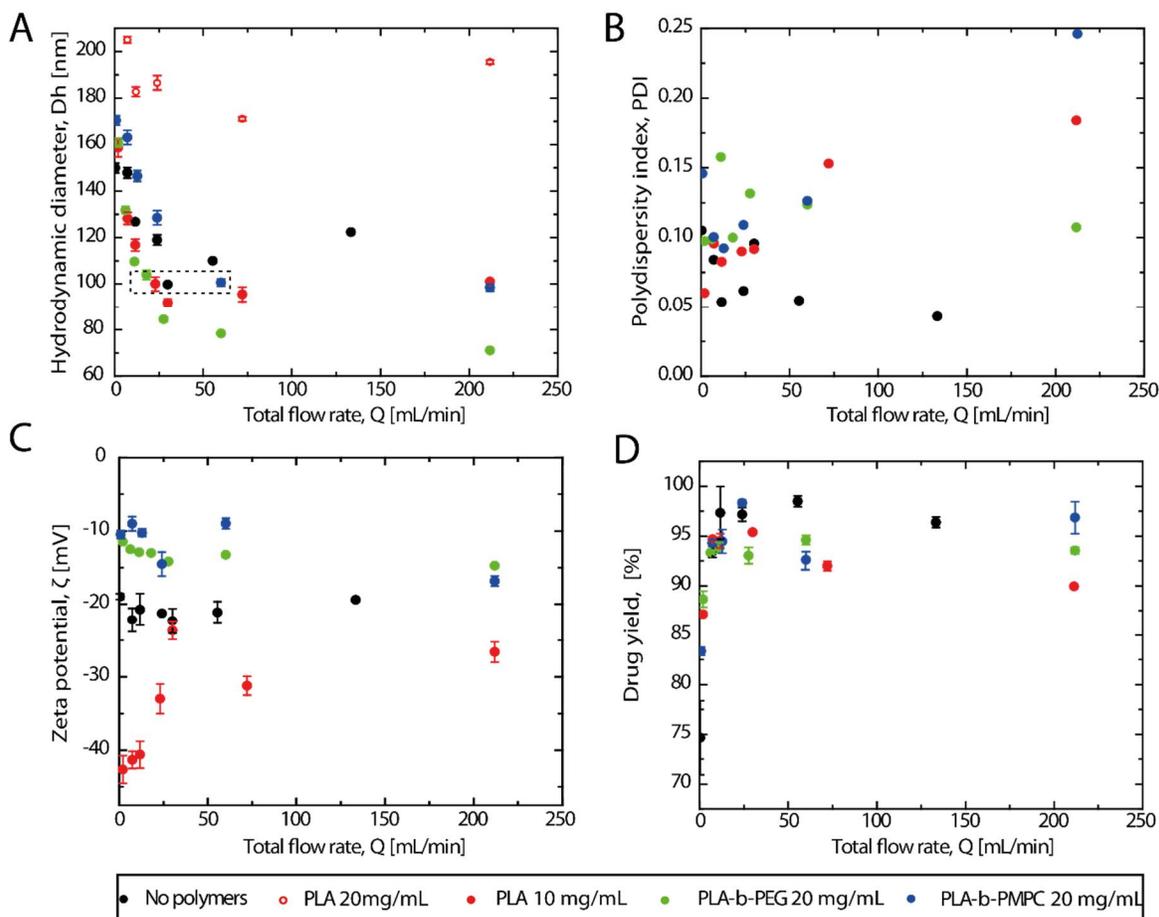
\*\* calculated from <sup>1</sup>H NMR and GPC analysis for PMPC

\*\*\* calculated from <sup>1</sup>H NMR and GPC analysis

#### 4.5.2 Optimisation of the NPs physicochemical properties

Particle size is a critical factor affecting drug penetration into skin <sup>31, 60-61</sup>. It is also known that, in the case of amphiphilic polymers, NPs size depends strongly on the ratio of hydrophilic to hydrophobic blocks length <sup>50</sup>. In order to separate the impact of surface composition of NPs from NPs size, it is therefore crucial to optimise NPs preparation method to obtain NPs of similar hydrodynamic diameter independently of polymer composition.

Nanoprecipitation is the most common and versatile method for the preparation of polyester-based NPs <sup>62</sup>. Its principle is based on the precipitation in water of a polymer initially dissolved in organic solvent through the solvent displacement phenomenon. Recently, micromixing devices, such as the CIJM or microfluidic mixing systems, have been developed to afford a better control over the mixing time of the organic and aqueous phase and therefore over the properties of the produced NPs <sup>52, 63-66</sup> compared to classic batch nanoprecipitation. NPs size can notably be finely tuned by varying the flow rate of the organic and aqueous phases <sup>67</sup>. In the present study, polymeric and pure drug NPs were produced using a CIJM. No surfactant was used during the preparation in order to reduce possible misinterpretation of the role of coating due to the presence of surfactant on NPs surface or in solution. NPs hydrodynamic diameter, polydispersity, zeta potential and encapsulation efficiency were studied as a function of total flow rate (**Figure 4.2**).



**Figure 4.2** Physicochemical characteristics of NPs as a function of total flow rate and polymer. A) Hydrodynamic diameter, B) Polydispersity Index, C) Zeta Potential, and D) Drug yield.

As already reported for particles produced from diblock polymers<sup>52, 63, 67-68</sup>, variation of the flow rate and therefore of the mixing time between aqueous and organic phases using a CIJM finely controlled the NPs hydrodynamic size (**Figure 4.2A**). Independently of the polymer composition, the resulting NPs size decreased as the injection rate increased up to reach a limit size. When the mixing time is larger than the diffusion/coalescence time scale of the NPs, NPs growth is controlled by diffusion and coalescence. On the contrary, when the mixing time is smaller than the diffusion/coalescence time, the polymer solution become homogeneously supersaturated before aggregation occurs, limiting particle growth<sup>63, 69</sup>. We observed that polymer concentration also influenced NPs size and the range of potential variation of NPs size as a function of flow rate. PLA NPs were first prepared at a polymer concentration of 20 mg/mL in the organic phase. At this concentration, PLA NPs size varied only between 200 and 170 nm. A lot of macroaggregates were also visible to the naked eye at the exit of the CIJM and in the

final suspension, indicating a low stabilization in aqueous medium of the bare PLA NPs. With a lower PLA polymer concentration (10 mg/mL), no aggregates were observable, and NP size was reduced in the range of 160-90nm. As expected, NPs size and limit size were relative to polymer composition. At the same initial polymer concentration, NPs produced with amphiphilic PLA-*b*-PEG or PLA-*b*-PMPC polymers were significantly smaller than NPs produced with lipophilic PLA. PEG or PMPC hydrophilic end chains contributed to a steric stabilization of the NPs which limited the growth of the particles during the solvent exchange. However, PLA-*b*-PMPC produced larger particles than PLA-*b*-PEG at the same flow rate and concentration even if the percentage of hydrophilic content was higher than for PLA-*b*-PEG.

Highly monodisperse particles were formed using pure drug without any polymer (PDI always < 0.1). Addition of a polymer tend to increase the dispersity of the NPs due to the inherent polydispersity of polymeric chains. Moreover, we observed a PDI increase for all polymeric NPs as a function of flow rate (**Figure 4.2B**). Smaller particles produced at high flow rate tend to be more polydisperse than larger ones.

Zeta potential was also measured as a function of flow rate and polymer composition (**Figure 4.2C**). On the one hand, PLA NPs and control pure drug NPs exhibited a negative zeta potential (< -20 mV) providing strong electrostatic interactions between particles in aqueous media. On the other hand, the presence of neutral PEG or zwitterionic PMPC moiety attached to PLA chain tend to shift ZP toward neutrality (~ - 10 mV) as expected due to a shielding of the PLA core surface charges by the PEG or PMPC layer<sup>70</sup>. Contrarily to the other NPs systems, bare PLA NPs exhibited a significant variation of ZP as a function of flow rate increase from -43 to -24 mV, indicating a gradual compositional change of the NPs surface.

Fabrication drug yields after purification were higher than 90% for total flow rates between 6 and 200 mL/min (**Figure 4.2D**). This trend is commonly observed for very lipophilic molecules not soluble in water<sup>38, 58</sup>. In the present case, the composition of the polymer had no impact on the drug content, but it has been reported that for more water-soluble lipophilic drug, such as curcumin (logP = 3.6), the hydrophilic / lipophilic ratio of the blocks forming the polymer may influence the encapsulation<sup>59</sup>. Between 6 and 200 mL/min, the flow rate did not impact drug content. These results were expected since it has been previously shown that drug encapsulation

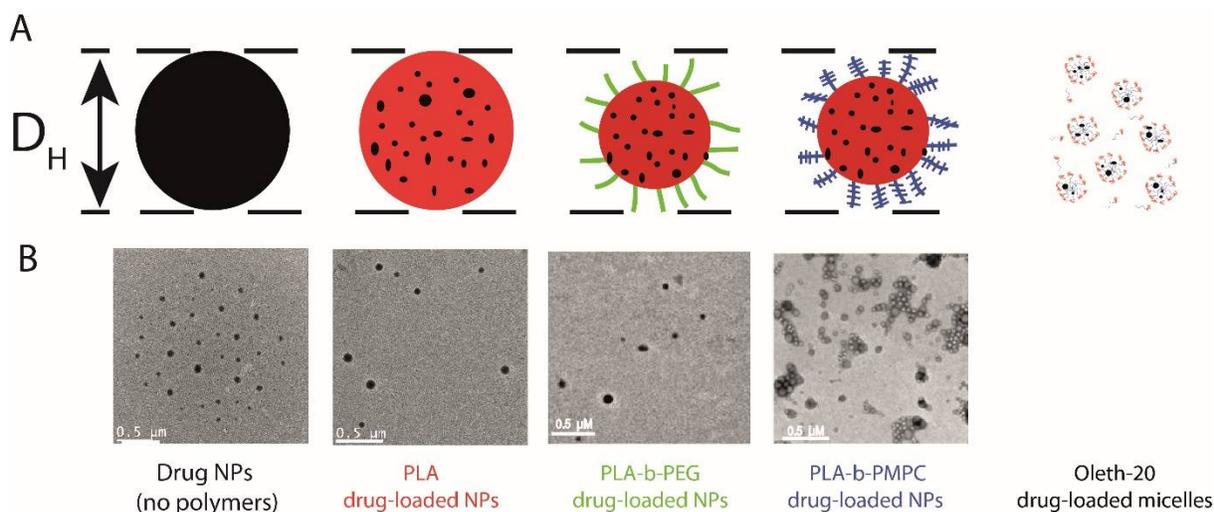
was more dependent of the molecule log P than on the process of NPs production <sup>67</sup>. However, when flow rate was very low (< 2 mL/min), a decrease of the drug content was observed. We hypothesized that some large aggregates of particles were formed in the CIJM at this mixing rate and were either trapped in the CIJM chamber or removed from the nanosuspensions during the centrifugation step.

These observations allowed to select fabrication conditions leading to NPs with a hydrodynamic diameter,  $D_H$ , of 100 nm independently of the polymer or formulation composition (selected data points in **Figure 4.2A** and **Figure 4.3**). The physicochemical characteristics of the NPs library eventually chosen are presented in **Table 4.2**. Monodisperse nanosuspensions of identical hydrodynamic diameters were produced by adjusting the flow rate of the injected phases depending on the polymer composition. Process was highly reproducible as shown by the small standard deviations of the NPs size. Drug loading and drug yield after purification were found identical whatever the NPs suspension (DL ~7 % and drug yield > 90%). The surface properties, i.e. the ZP and the hydrophilic block surface density, of the NPs were the only properties which varied as a function of the polymer composition. As discussed above, 100 nm-pure cholecalciferol and PLA NPs exhibited a negative surface whereas PLA-*b*-PEG and PLA-*b*-PMPC NPs were closer to neutrality. The hydrophilic block surface density was characterized by <sup>1</sup>H NMR in D<sub>2</sub>O. PLA solid core which is not soluble in water did not give a NMR signal; only mobile polymer chains in water are visible in the NMR spectrums, i.e. the hydrophilic polymer chains at the NP surface (see **Figure 4.S-3** and **4.S-4**, Supplementary data). PLA-*b*-PEG and PLA-*b*-PMPC displayed the same grafting density of hydrophilic block (~ 0.3 chains/nm<sup>2</sup>) or monomer density (~ 15 units/nm<sup>2</sup>) assuming a brush conformation of the hydrophilic chains at the NPs surface.

**Table 4.2.** Physicochemical characteristics of 100 nm-diameter NPs under study. Data are reported as mean over three or more separate formulations  $\pm$  SD. ( $^1\text{H}$  NMR spectra of NPs and details of density calculations are reported in Supporting Information (see Figure 4.S3 and 4.S4))

Formulation	Drug only	PLA	PLA- <i>b</i> -PEG	PLA- <i>b</i> -PMPC
% of hydrophilic block in polymer [%w/w <sub>t</sub> ]	-	0	8.9	37.9
Flow rate [mL/min]	35 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3	18 $\pm$ 1	64 $\pm$ 7
Z-average diameter [nm]	100 $\pm$ 7	105 $\pm$ 7	101 $\pm$ 3	95 $\pm$ 8
Number mean size [nm]	72 $\pm$ 4	77 $\pm$ 6	68 $\pm$ 7	60 $\pm$ 7
PDI	0.07 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.04
Zeta Potential [mV]	-21 $\pm$ 5	-32 $\pm$ 7	-13 $\pm$ 1	-14 $\pm$ 1
Drug yield [%]	90 $\pm$ 5	93 $\pm$ 7	95 $\pm$ 4	93 $\pm$ 6
Drug loading, DL [%w/w]	-	7.3 $\pm$ 0.3	7.4 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.3
Hydrophilic block surface density [PEG or PMPC chains/nm <sup>2</sup> ]	-	-	0.34 $\pm$ 0.05	0.33 $\pm$ 0.07
Monomer surface density [EO or MPC repeating units/nm <sup>2</sup> ]	-	-	15 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1

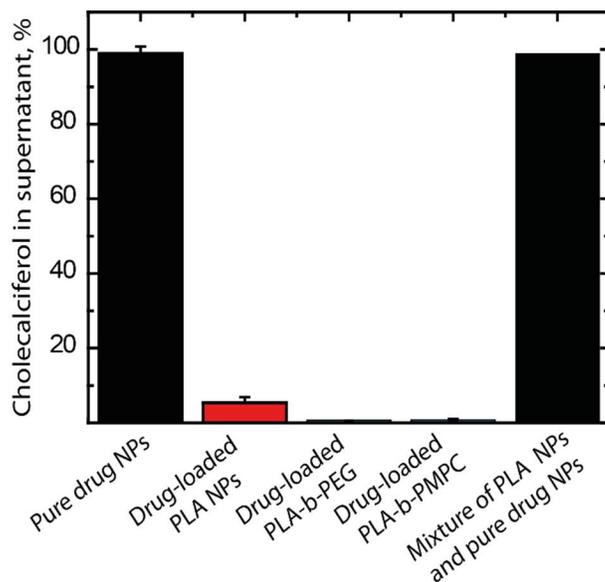
The morphology of the NPs is known to be dependant of the % of hydrophilic block in the polymer<sup>50, 59</sup>. TEM imaging was performed to assess the internal structure of the NPs used in this study. Solid-core NPs with a round-shaped morphology and a low polydispersity were observed irrespectively of the used polymer (**Figure 4.3**).



**Figure 4.3** (A) Schematic representations of the different 100 nm-NPs under study along with (B) their representative TEM images. Black regions in the schematic represent cholecalciferol.

Before testing the drug release, degradation of the drug and penetration from the polymeric NPs, we first evaluated if the drug in polymeric suspensions was really encapsulated in the polymeric

particles or if precipitated aside from the polymer particles. This is an important point to solve since cholecalciferol and the polymers can independently form NPs of similar size under similar manufacturing conditions. Indeed, pure drug NPs manufactured without the use of polymer with a size of 100 nm were found stable as colloidal suspension in aqueous medium. A centrifugation test was performed to separate polymer NPs from pure drug NPs. After centrifugation of the nanosuspensions at 60 000 g for 2 hours, the quantity of drug in supernatant was determined. No pellet of pure drug NPs was formed, proving the high colloidal stability of these formulations. As shown in **Figure 4.4**, pure drug NPs remained in the supernatant after centrifugation. In contrast, when the drug-loaded polymeric NPs were centrifuged, a solid pellet of NPs was observed and less than 5% of the total quantity of drug was present in the supernatant, indicating that drug sedimented along with the polymer. As a control, a mix of pure PLA NPs (no drug) and pure drug NPs (no polymer) of identical size were centrifuged. All the drug was recovered in the supernatant, proving no possible fortuitous coaggregation between polymer and drug particles during the centrifugation. Since cholecalciferol sedimented during centrifugation when formulated in polymeric nanosuspensions but did not sediment when formulated in pure drug nanosuspensions, these tests therefore confirmed that the drug cholecalciferol was entirely encapsulated in the polymeric NPs.



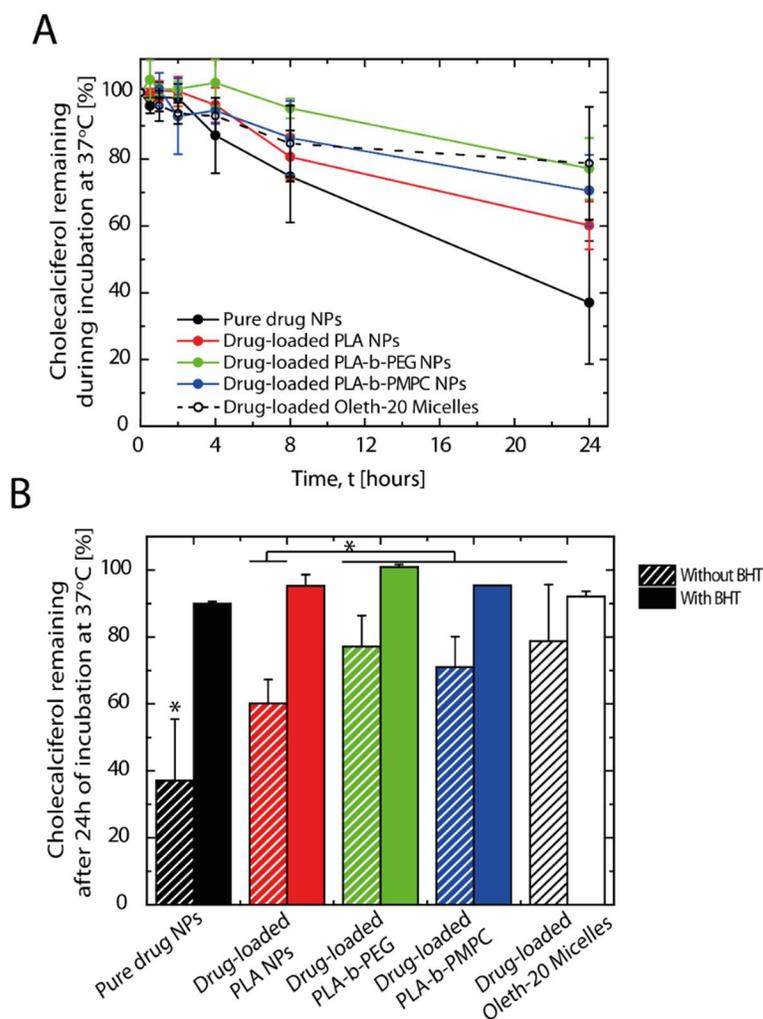
**Figure 4.4** Cholecalciferol percentage in supernatant after centrifugation of the NPs.

### 4.5.3 Cholecalciferol stability

Cholecalciferol is known to be sensitive to several environmental factors such as light, oxygen, temperature, humidity and acidic conditions<sup>71-72</sup>. Exposure to these environmental factors leads to the formation of previtamin-D, transvitamin-D, pyrovitamin-D, isopyrovitamin-D, suprasterols or isotachysterols metabolites<sup>71</sup> and decreases the bioavailability of the drug. It was demonstrated that cholecalciferol encapsulation inside polymeric particles was a way to reduce its degradation in aqueous medium<sup>39, 58, 73</sup>. However, to the best of our knowledge, the influence of NPs physical parameters and notably the composition of the surface coating on the chemical stability of any drug has rarely been studied. Clarifications about the role of the nanocarrier composition on drug stability may help to design or formulate more efficient carriers to protect drug from degradation.

To this purpose, 100 nm-size pure drug NPs, polymeric NPs with different coatings and control micellar suspensions were formulated with or without BHT as an antioxidant and were incubated at body temperature (37 °C) protected from light. Degradation kinetics of the drug in these formulations were quantified at different time points by UV-HPLC. The pH of the formulations ranged between 5.5 and 6.

As presented in **Figure 4.5A**, encapsulation of cholecalciferol in polymeric NPs or solubilisation in surfactant micelles without any antioxidant significantly improved the stability of the drug compared to pure drug NPs. Only 40 % of drug was remaining after 24 h of incubation when no polymer was used to protect the drug while more than 60% of the initial drug was still present after 24 h in polymeric nanoparticle suspensions. Drug encapsulation in polymeric NPs imparted its protection against degradation. This increased stability can be attributed to a reduction of the contact between water and drug thanks to the polymeric lipophilic core. The presence of a hydrophilic coating on PLA surface had a small but positive effect on drug protection. Compared to bare PLA NPs, PMPC and PEG coatings increased cholecalciferol stability (60, 71, and 79 % of initial dose remaining after 24 h, respectively). Since drug was theoretically entrapped within the PLA core, we hypothesized that the hydrophilic coating physically protected the PLA core and therefore protected the drug from degradation due to the formation of a second physical layer against water contact.



**Figure 4.5** Cholecalciferol degradation from different nanoformulations incubated at 37 °C (n = 6 ± SD. A) Cholecalciferol degradation from formulations without BHT antioxidant for 24 h. B) Percentage of remaining cholecalciferol in nanoformulations with (filled columns) or without BHT antioxidant (hatched columns) after 24 h of incubation. Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test ( $p < 0.05$ ) for degradation without BHT.

Contrary to expectations, surfactant micelles better protected the dispersed drug from degradation than bare PLA NPs, at similar levels than the hydrophilic-coated polymeric NPs, even though they are more dynamic than solid polymeric NPs. Accelerated degradation of the encapsulated drug in PLA-based NPs can occur due to local acidic conditions in the PLA core arising from the presence of carboxylic acid groups. In fact, some PLA chain with carboxylic chain-ends are inevitably present in polymer batches due to uncontrolled initiation of the PLA chains with water or/and lactic acid impurities instead of hexanol or PEG, or transesterification

reactions of the polymeric chains <sup>74</sup>. The presence of such anionic moieties in PLA was confirmed by the negative ZP of PLA NPs. Since no acidic group was present in the micelle core of oleth-20, drug degradation originating from acid conditions was not possible and was consequently reduced. Our results show therefore that drug encapsulation in a solid polymeric core is not a guarantee of drug protection against degradation.

When BHT was introduced during the preparation of NPs (**Figure 4.5B**), drug degradation was hindered. This also demonstrated that BHT was coencapsulated with cholecalciferol within the particles.

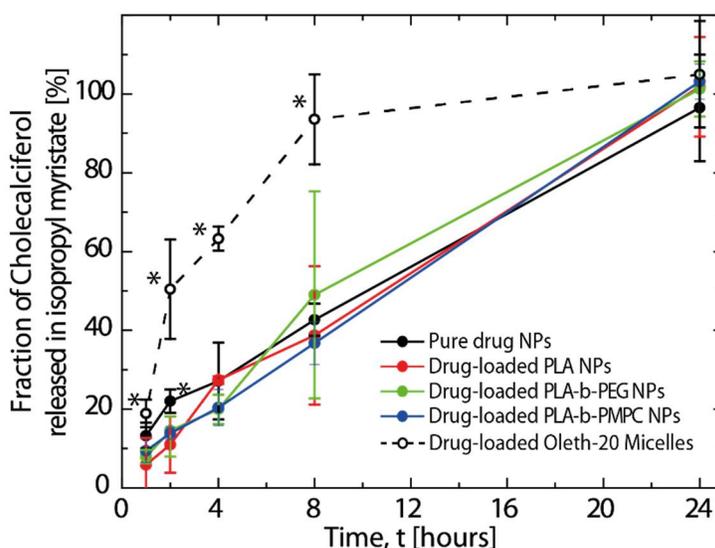
#### 4.5.4 Cholecalciferol release

In order to study the effect of NPs surface composition on cholecalciferol release, release profiles were performed *in vitro*. Cholecalciferol release from all formulations was studied using the same initial cholecalciferol content in NPs (90 µg/mL) and the same polymer concentration, if applicable, (1.2 mg/mL) over 24 hours. This duration of release was chosen because it represents the contact time with skin during the cutaneous penetration tests.

First, release studies were conducted by Franz diffusion cell method through a cellulose membrane and using the same receptor medium as the skin penetration experiments (HBSS with 0.5%<sub>w/w</sub> oleth-20 and 0.002%<sub>w/w</sub> BHT, pH 7.4). In any instance, no cholecalciferol was found in the release medium, even if sink conditions were respected (data not shown). This absence of release from polymeric particles in buffer medium was already observed for cholecalciferol and was attributed to the very low solubility of the drug in water <sup>39</sup>. The membrane itself can also hinder the diffusion of the free drug in the receptor medium due to cholecalciferol adsorption on cellulose.

Drug release was then performed in a biphasic system which did not require the use of a porous membrane. Isopropyl myristate was chosen as lipophilic artificial membrane representative of skin outer layers due to its polar and non polar properties mimicking skin lipids <sup>54</sup>. **Figure 4.6** shows the release profiles of cholecalciferol from NPs or surfactant micelles in IPM at 37 °C. Release behaviour of drug from oleth-20 surfactant micelles was significantly different from solid NPs ( $p < 0.05$ ). All the drug initially present was released in 12 hours from micelles according to a first-order kinetic while release from solid NPs was 2-fold slower following a

zero-order kinetic with no initial burst release. This release behavior from polymeric NPs in lipophilic medium was different from conventional release in aqueous medium. A zero-order kinetic reflected a limited dissolution rate of cholecalciferol from NPs to the medium. Even though cholecalciferol is fully soluble in IPM, IPM phase is not miscible with water phase. When the two phases are mixed by magnetic stirring, a coarse emulsion is formed but contact between NPs and IPM was not optimal. Only NPs in direct contact and wetted with IPM may have released their content, limiting the release rate. An aqueous film may have also remained around the NPs acting as a secondary membrane which could slow down the diffusion of the drug in IPM. On the contrary for the surfactant micelles, droplet size of the water: IPM emulsion was smaller than for particles due to a reduction of the interfacial tension. The bigger transfer area between aqueous and lipophilic phase led to faster drug diffusion to the IPM phase from surfactant micelles. Moreover, the more dynamic structure of the micelles compared to solid NPs may also favor drug release.



**Figure 4.6** Cholecalciferol release in a model lipophilic medium (isopropyl myristate) from different nanoformulations over a period of 24 h at 37 °C ( $n = 3 \pm SD$ ). Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test ( $p < 0.05$ ).

Release profiles of cholecalciferol from NPs followed the same trend independently of the nature of surface composition of the NPs. These results were unexpected since it has been previously shown that presence of a PEG corona on polyester NPs surface slowed down the release of a hydrophobic molecule<sup>59,75</sup>. Interestingly, even the presence of a polymer protecting

the drug in its core did not slow down the release of the drug, since no release difference was found between drug particles made with or without polymer. The sole factor controlling cholecalciferol delivery in IPM was therefore the surface contact between NPs and IPM and it seems that the composition of the NPs coating did not alter the interfacial tension between water and the lipophilic release medium. After 24 hours of release, a layer of aggregated NPs was also observed for NPs formulation at the water-IPM interface, independently of the NPs coating. Rancan *et al*, already observed a loss of colloidal stability of polyester NPs at the interface between water and IPM which was explained the reduction of electrostatic interactions between NPs due to the low dielectric constant of IPM <sup>76</sup>.

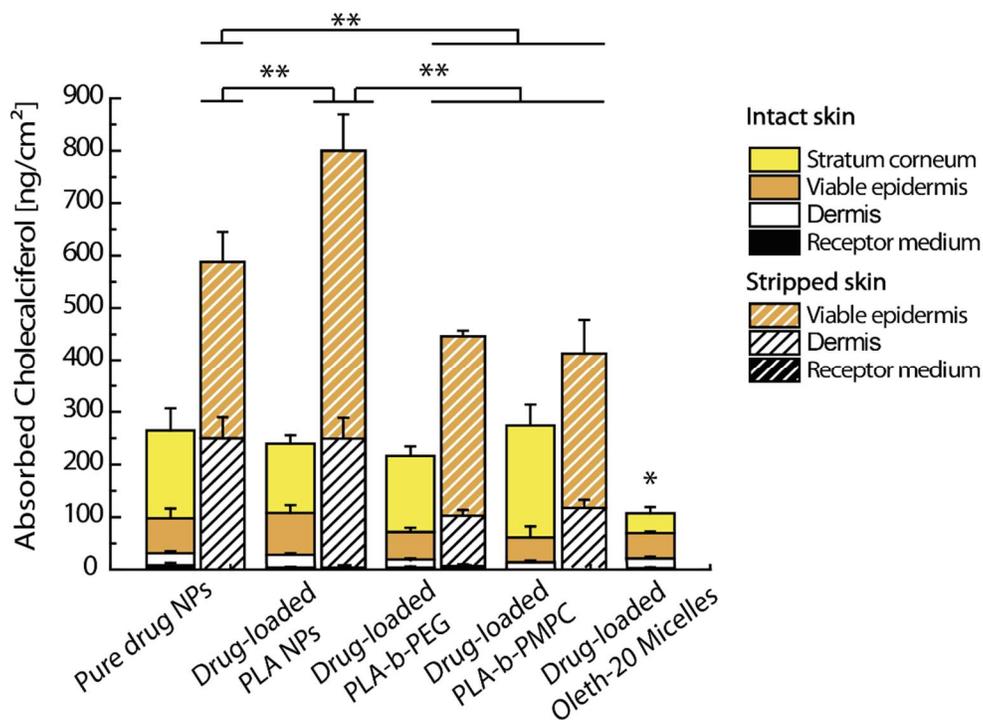
It should be noted that this release test was not discriminative to evaluate the interactions between drug and NPs matrix since the release of the cholecalciferol in an aqueous or lipophilic medium was rather dictated by the rate of solubilization of the drug in the medium than by the diffusion of drug through the polymeric matrix.

#### 4.5.5 Cholecalciferol skin absorption

The influence of NPs coating on the delivery of cholecalciferol to intact skin was evaluated by the Franz cell method, the gold standard for percutaneous studies <sup>56</sup>. Penetration in an impaired skin model (stripped skin) was also investigated to determine if the composition of the skin surface, i.e. the presence or not of the *stratum corneum* barrier, influences the interactions skin-NPs. On intact skin, NPs were deposited on the *stratum corneum* surface, which is a stratified layer of cornified keratinocytes embedded in a lipid rich medium, forming a relatively impermeable layer. On impaired skin, *stratum corneum* was removed by tape stripping. The majority of the *stratum corneum* was removed when the TEWL value was comprised between 30-40 g.m<sup>2</sup>.h<sup>-1</sup> <sup>8, 57</sup>. NPs were in this case in contact with a layer of living cells (the viable epidermis), more hydrophilic and permeable than the *stratum corneum*. The penetration of the drug from pure drug NPs (no polymer) and surfactant micelles was assessed as control. Cholecalciferol absorption in all layers of intact and impaired skin after 24 hours of incubation with formulations is presented in **Figure 4.7**.

Results showed that the distribution of drug in the different skin layers was dependent on both skin condition and NPs surface coating. In intact skin, drug was poorly absorbed (less than 300

ng/cm<sup>2</sup>, i.e. less than 1% of the applied dose) and accumulated significantly in the *stratum corneum* (up to 210 ng/cm<sup>2</sup>) and, to a lesser extent, in the viable epidermis (up to 80 ng/cm<sup>2</sup>). Such very low penetration in intact skin is well reported for this drug<sup>39, 77</sup> and the affinity of cholecalciferol to the lipophilic layer of the *stratum corneum* was expected due to the strong hydrophobic character of the drug. In addition, drug lipophilicity inhibited the permeation of the active compound to the receptor medium.



**Figure 4.7** Effects of nanoformulation type on skin distribution of cholecalciferol in intact and impaired pig skin after 24 h exposure. Applied dose of cholecalciferol was 35 µg/cm<sup>2</sup>. Filled and hatched columns represent respectively absorption in intact and impaired skin. Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test ( $p < 0.05$ ) for  $n > 6$  independent experiments. (\*stands for intact skin, \*\*stands for impaired skin).

As can be seen in **Figure 4.7**, solid NPs (with or without polymer) exhibited a significantly higher skin absorption of cholecalciferol compared to the oleth-20 micelles (up to 2.8-fold,  $p < 0.05$ ). The ability of polymeric NPs to improve drug penetration compared to micelles and to accumulate in the outer layers of the skin was already reported for retinol, another lipophilic drug<sup>38</sup>. We hypothesized that the better absorption of the drug in the skin was relative to a better accumulation or a deeper penetration of solid NPs in the *stratum corneum* than surfactant micelles.

However, the encapsulation of drug in polymer did not modulate its penetration within skin layers. Interestingly, the same quantity of drug was recovered in skin treated with solid NPs made with or without polymer ( $\sim 250 \text{ ng/cm}^2$ ), confirming that polymer did not hinder or favor cholecalciferol diffusion and/or NPs penetration when NPs were in contact with the *stratum corneum*. The composition of NPs surface had also no influence on the total drug absorption into intact skin, indicating that the *stratum corneum* acts as a non-selective barrier against the penetration of solid NPs. Since NPs aggregated at the IPM surface during the release studies, we can suppose that they may also aggregate when they were in close contact with the lipophilic *stratum corneum*, *i.e.* on its surface or deeper if they accumulated in the *stratum corneum*.

When deposited on impaired skin and independently of the formulation, cholecalciferol was better absorbed in all viable skin layers compared to intact skin (up to 3.4-fold, **Figure 4.7**). As expected, drug diffusion was facilitated due to the removal of the *stratum corneum*<sup>9-11</sup>. In this case and contrary to intact skin, absorption of cholecalciferol into impaired skin depended on the NPs surface composition. At equivalent drug content, the addition of a hydrophilic coating of a neutral layer (PEG) or a zwitterionic layer (PMPC) on PLA core decreased penetration in both epidermis ( $\sim -70 \%$ ) and dermis ( $\sim -130 \%$ ), which decreased the overall penetration 1.8-fold compared to bare PLA ( $p < 0.05$ , **Figure 4.7**). We had however found that the nature of the hydrophilic coating (neutral PEG or zwitterionic PMPC) did not influence total skin absorption ( $440 \text{ ng/cm}^2$  for PLA-*b*-PEG NPs and  $410 \text{ ng/cm}^2$  for PLA-*b*-PMPC NPs). Contrary to initial expectations, PMPC coating did not offer any advantages over the other NPs surfaces for skin delivery, at least at these studied density and NPs concentration. It acted similarly to the PEG coating. Interestingly, we also found that encapsulation of the drug in a polymer core did not offer substantial improvement of the percutaneous delivery. The penetration of cholecalciferol from pure drug NPs was 1.3-fold lower than penetration from bare PLA NPs but was better than penetration from PLA-based NPs coated with PEG or PMPC ( $\sim 1.3$ -fold). Compared to non-polymeric aggregates, the presence of the hydrophilic coating decreased drug penetration 1.3-fold with a lower accumulation in dermis.

NPs displaying a negative ZP (pure drug and bare PLA NPs) improved cholecalciferol penetration compared to globally non-charged coated NPs (PLA-*b*-PEG and PLA-*b*-PMPC NPs) only on impaired skin. Accordingly, enhancement of drug penetration is rather relative to

the solid particulate and charged structure than to the drug encapsulation in a polymeric core. We suggested that these differences of drug penetration were the results of different rates of NPs accumulation on the skin surface or NPs penetration in the skin which are dependent of electrostatic interactions between skin and NPs. In fact, NPs surface charge already proved its importance in penetration of NPs themselves, even if results are often contradictory<sup>23-27</sup>. The significance of these electrostatic interactions seems depended of the composition of the skin surface. Abdel-Mottaleb *et al.* already reported that skin pathology may condition the accumulation of NPs in skin depending on their charges. The authors noticed no difference of cutaneous penetration between anionic, neutral and cationic ethylcellulose NPs in healthy mice ear skin. However, in inflamed skin conditions, an improved therapeutic effect of bethamethasone by charged NPs compared to neutral NPs was observed<sup>29</sup>. In our case, we propose that negatively charged NPs are not attracted with skin cells since they have slightly negative membranes, but rather may interact with extracellular charged skin elements of the epidermis, such as proteins or salt species, which can trigger their accumulation on the skin. The quasi neutral charge of PEG and PMPC-coated NPs did not allow such electrostatic interactions with skin elements from the viable epidermis, reducing their adhesion/interactions with the skin and so the absorption of the drug.

#### 4.6 Conclusions

The modifications of the surface properties of NPs impacted at different levels the steps of the delivery of a lipophilic labile drug into the skin. Drug encapsulation in a polymeric core improved the protection of the drug from degradation, with a slight positive effect of the hydrophilic coatings, but did not alter the *in vitro* drug release kinetics into a lipophilic medium mimicking skin lipids. Regarding cholecalciferol penetration within healthy intact skin, all solid NPs displayed the same efficiency to carry cholecalciferol in the skin, irrespective of the NPs surface properties, highlighting the non-selective role of the *stratum corneum* barrier. However, the surface properties of the NPs carrying the drug clearly affected cholecalciferol penetration when *stratum corneum* was removed to resemble to diseased skin, pointing out the importance to consider the influence of skin pathology when designing topical formulations. Detailed characterizations of the mechanisms of NPs-skin interactions depending of the NP surface are currently under investigation.

## **Supplementary Data**

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.046> or in annexe A.

## **Acknowledgments**

AL is grateful to the Région Auvergne-Rhône-Alpes for their mobility grant (Explo'RA Doc) and the Faculty of Pharmacy of Université de Montréal for their financial support. JF is grateful to the Arthritis Society and the Université de Montréal for PhD grants. PLL acknowledges financial support from NSERC, the GRUM and the Faculty of Pharmacy of Université de Montréal. CR acknowledges the Région Auvergne-Rhône-Alpes for support (mobility grant, Explo'RA Sup). AGA is supported by the TransMEDTech Institute. PH is thankful for the financial support of FRQNT. XB acknowledges the financial support from the Canada Research Chair Program and NSERC. TEM imaging was performed at the "Centre de Caractérisation Microscopique des Matériaux" of the École Polytechnique (Montréal, Québec, Canada) with the help of Jean-Philippe Massé. Alexander Cunningham is acknowledged for his help in GPC analysis.

## **Declaration of interest**

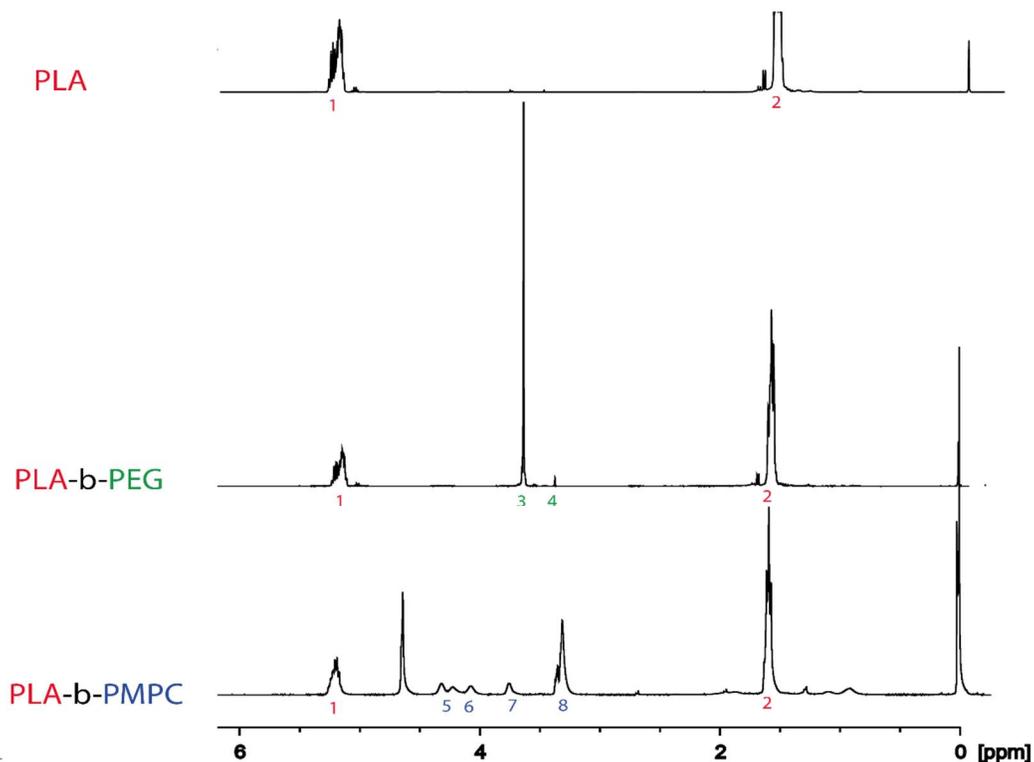
Authors declare no competing interest.

## 4.7 Annexe A: *Supplementary data* de l'article

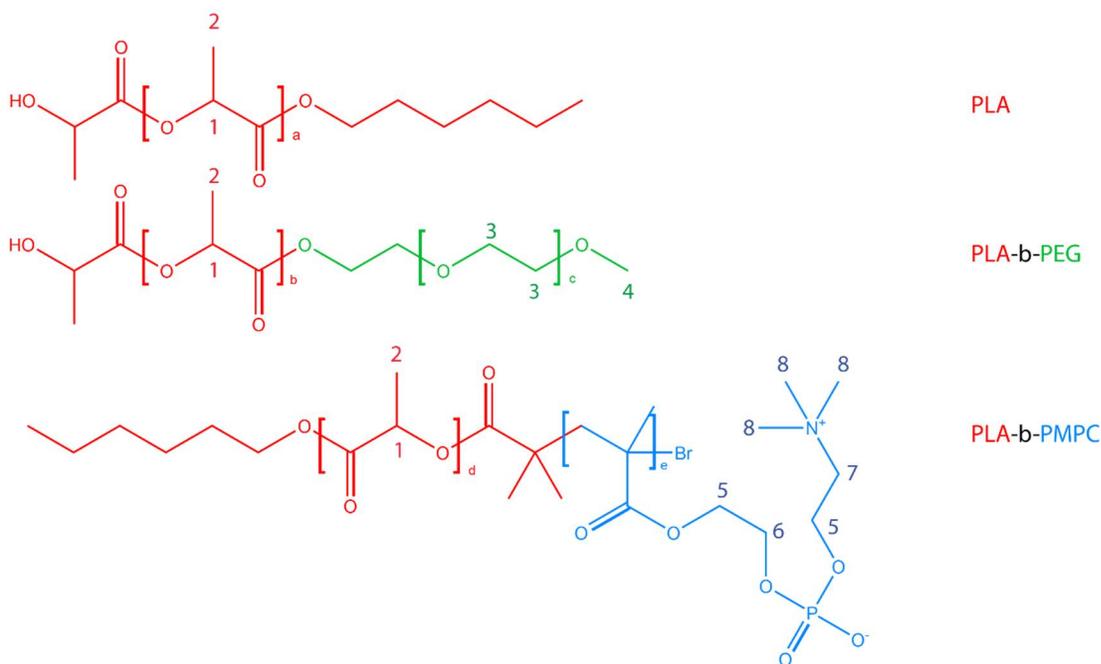
### 4.7.1 Determination of the hydrophilic block content in NPs

#### 4.7.1.1 NMR spectra of polymers

$^1\text{H}$ -NMR spectra of polymers were recorded according to the procedure detailed in Materials and Methods and are presented in **Figure 4.S1**. Signal attributions are explained in **Figure 4.S2**.



**Figure 4.S1**  $^1\text{H}$  NMR spectra of PLA, PLA-b-PEG and PLA-b-PMPC polymers.



**Figure 4.S2**  $^1\text{H}$ -NMR signals attribution of PLA, PLA-b-PEG and PLA-b-PMPC polymers. (1:  $\delta$  5.2 (m, 1H, CH), 2:  $\delta$  1.3–1.5 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 3:  $\delta$  3.65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 4:  $\delta$  3.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5:  $\delta$  4.3 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 6:  $\delta$  4.1 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7:  $\delta$  3.8 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 8:  $\delta$  3.4 (s, 9H, CH<sub>3</sub>)

#### 4.7.1.2 Calculations of PEG and PMPC content in PLA-b-PEG and PLA-b-PMPC polymers from $^1\text{H}$ NMR spectrum

##### 4.7.1.2.1 PLA-b-PEG

PEG content in polymer is expressed by the following equation:

$$\%_{\text{PEG}} = \frac{M_{\text{PEG}}}{M_{\text{PLA}} + M_{\text{PEG}}} * 100 \quad (\text{Equation 4.S1})$$

with  $M_{\text{PEG}}$  and  $M_{\text{PLA}}$  the molecular weights of the PEG and PLA moieties.

In this case,  $M_{\text{PEG}}$  was known ( $M_{\text{PEG}} = 2,000$  g/mol) but  $M_{\text{PLA}}$  was first unknown. Assuming that all polymer chains contain only one PEG moiety, it is possible to determine from NMR spectrum the number of lactic acid (LA) units (b,  $M_{\text{LA}} = 72$  g/mol) per one PEG moiety ( $M_{\text{PEG}} = 2,000$  g/mol) and therefore determine  $M_{\text{PLA}}$  ( $b.M_{\text{LA}}$ ) (**Table 4.1**).

##### 4.7.1.2.2 PLA-b-PMPC

PMPC content in polymer is expressed by the following equation:

$$\%_{PMPC} = \frac{M_{PMPC}}{M_{PLA} + M_{PMPC}} * 100 \text{ (Equation 4.S2)}$$

with  $M_{PMPC}$  and  $M_{PLA}$  the molecular weights of the PMPC and PLA moieties.

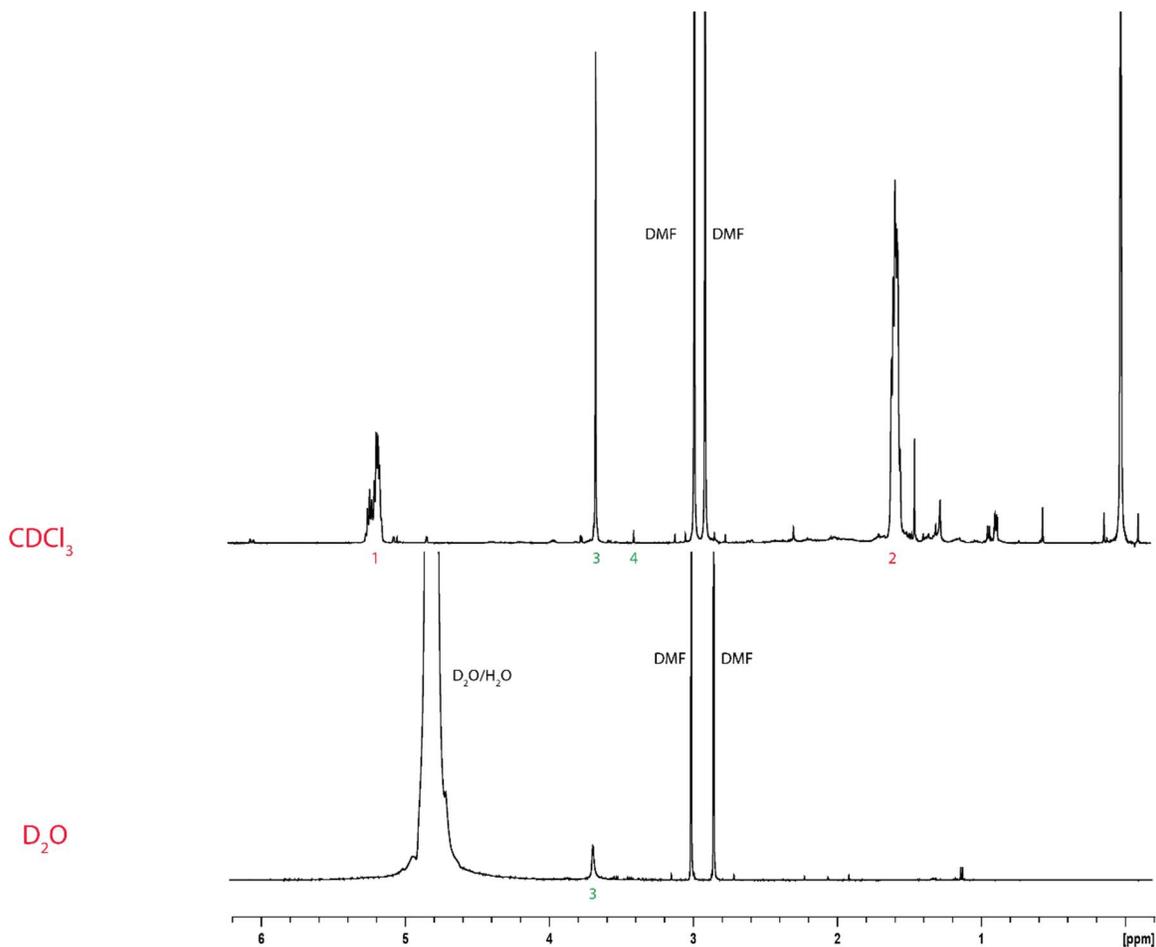
In this case,  $M_{PLA}$  was determined by GPC but  $M_{PMPC}$  was first unknown. Assuming that all polymer chains contain only one PMPC moiety, we can determine from NMR spectrum the number of MPC units (e,  $M_{MPC} = 297$  g/mol) per PLA chain ( $M_{PLA-Br} = 20,100$  g/mol) and therefore determine  $M_{PMPC}$  (e. $M_{MPC}$ ) (**Table 4.1**).

#### **4.7.2 Determination of the hydrophilic block density on NPs surface**

##### 4.7.2.1 PLA-b-PEG

###### 4.7.2.1.1 *PLA-b-PEG NMR quantification spectra*

$^1\text{H}$ -NMR spectra of PLA-*b*-PEG NPs were recorded both in  $\text{CdCl}_2$  and  $\text{D}_2\text{O}$  according to the procedure detailed in Materials and Methods and are presented in **Figure 4.S3**. Signal attributions are explained in **Figure 4.S2**.



**Figure 4.S3**  $^1\text{H}$  NMR spectra of PLA-b-PEG NPs in  $\text{CDCl}_3$  and  $\text{D}_2\text{O}$

#### 4.7.2.1.2 Calculations of PEG surface density based on NMR results

##### **PEG density on the NPs surface (PEG/nm<sup>2</sup>)**

The PEG surface coverage-density,  $\sigma_{\text{PEG}}$  (PEG/nm<sup>2</sup>), is the number of PEG chains per surface unit and was calculated from the following equation:

$$\sigma_{\text{PEG}} = \frac{\rho_c R_c \mathcal{N} W_{\text{PEG}}}{3 M_{\text{PEG}} W_c} \quad (\text{Equation 4.S3})$$

where  $\rho_c$  is the density of the NPs (1.253 g/cm<sup>3</sup> <sup>50</sup>),  $R_c$  is NPs core radius (based on the distribution in number obtained by DLS),  $\mathcal{N}$  is the Avogadro number,  $W_{\text{PEG}}$  is the weight of PEG on the NPs surface in the sample,  $M_{\text{PEG}}$  is the molecular weight of the PEG chains, and  $W_c$  is the weight of NPs core in the sample. The demonstration of this equation can be found in the

supporting information section of Rabanel *et al.*<sup>50</sup>.  $R_c$  was determined from the NPs radius obtained by DLS (distribution in number), assuming a monodisperse population of NPs centered on average mean size.  $W_{PEG}$  was calculated from  $^1H$  NMR in  $D_2O$ . In this solvent, it is assumed that only surface PEG is detected. The weight of surface PEG in the analyzed sample was calculated using DMF as internal standard (concentration of 0.5 %<sub>w/w</sub>).

$W_c$  was calculated from gravimetry assays of freeze-dried NPs.

$$W_c = W_{NPS} - W_{PEG} \text{ (Equation.4.S4)}$$

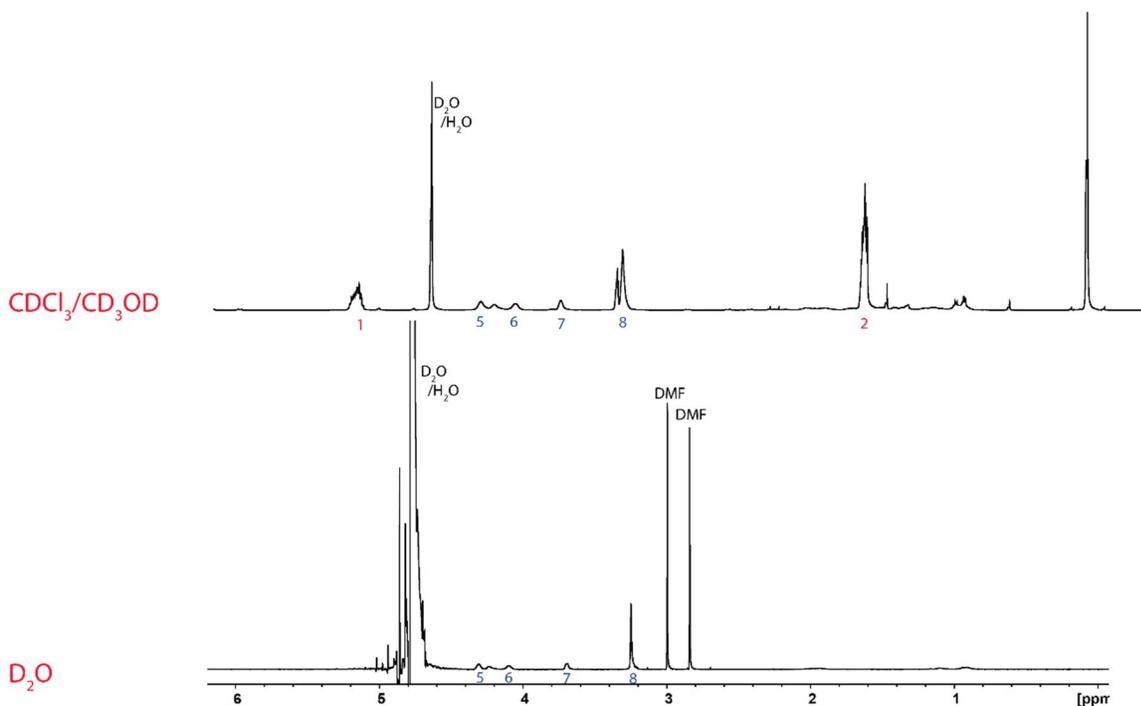
#### *EG density on the NPs surface (EG/nm<sup>2</sup>)*

The EG surface coverage-density,  $\sigma_{EG}$  (EG/nm<sup>2</sup>), is the number of EG chains per surface unit. It is calculated by multiplying the PEG surface coverage density  $\sigma_{PEG}$  by the molecular weight of a EG unit ( $M_{EG} = 45$  g/mol).

#### 4.7.2.2 PLA-b-PMPC

##### 4.7.2.2.1 PLA-b-PMPC NMR quantification spectra

$^1H$ -NMR spectra of PLA-*b*-PMPC NPs were recorded both in  $CdCl_3$  and  $D_2O$  according to the procedure detailed in Materials and Methods and are presented in **Figure 4.S4**. Signal attributions are explained in **Figure 4.S2**.



**Figure 4.S4**  $^1\text{H}$  NMR spectra of PLA-b-PMPC NPs in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$  and  $\text{D}_2\text{O}$

#### 4.7.2.2.2 Calculations of PMPC surface density based on NMR results

##### ***PMPC density on the NPs surface (PMPC/nm<sup>2</sup>)***

The PMPC surface coverage-density,  $\sigma_{\text{PMPC}}$  (PMPC/nm<sup>2</sup>), is the number of PMPC chains per surface unit and was calculated from the following equation:

$$\sigma_{\text{PMPC}} = \frac{\rho_c R_c \mathcal{N} W_{\text{PMPC}}}{3 M_{\text{PMPC}} W_c} \quad (\text{Equation 4.S5})$$

where  $\rho_c$  is the density of the NPs (1.253 g/cm<sup>3</sup><sup>50</sup>),  $R_c$  is NPs core radius (based on the distribution in number obtained by DLS),  $\mathcal{N}$  is the Avogadro number,  $W_{\text{PMPC}}$  is the weight of PMPC on the NPs surface in the sample,  $M_{\text{PMPC}}$  is the molecular weight of the PMPC chains, and  $W_c$  is the weight of NPs core in the sample. The demonstration of this adapted equation can be found in the supporting information section of Rabanel *et al.*<sup>50</sup>.  $R_c$  was determined from the NPs diameter obtained by DLS (distribution in number), assuming a monodisperse population of NPs centered on average mean size.  $M_{\text{PMPC}}$  was calculated from as described in section 1.

$W_{PMPC}$  was calculated from  $^1H$  NMR of NPs suspended in  $D_2O$ . In this solvent, it is assumed that only surface PMPC is detected. The weight of surface PMPC in the analyzed sample was calculated using DMF as internal standard (concentration of 0.5 %<sub>w/w</sub>).

$W_c$  was calculated from gravimetry assays of freeze-dried NPs.

$$W_c = W_{NPS} - W_{PMPC} \text{ (Eq.4.S6)}$$

***MPC density on the NPs surface (MPC/nm<sup>2</sup>)***

The MPC surface coverage-density,  $\sigma_{MPC}$  (MPC/nm<sup>2</sup>), is the number of MPC units per surface unit. It is calculated by multiplying the PMPC surface coverage density  $\sigma_{PMPC}$  by the molecular weight of MPC unit ( $M_{MPC} = 297$  g/mol).

## 4.8 Conclusion générale du chapitre IV

### Points Clés

- La nature de la composition polymérique influence la taille et les propriétés de surface des NPs mais pas l'encapsulation du cholécalciférol
- Le type de surface des NPs a montré des effets variables sur différents aspects du transport du cholécalciférol dans la peau
  - **Libération** : Aucune influence de la chimie de surface sur la libération du cholécalciférol dans un milieu modèle lipophile.
  - **Dégradation** : L'encapsulation du cholécalciférol dans les NPs polymériques ralentit sa dégradation par rapport à la forme nanoparticulaire d'actif pur (60 % dégradé après 24 h sans polymère contre moins de 40 % si encapsulé) avec un léger effet protecteur supplémentaire émanant d'une couronne polymérique hydrophile de surface.
  - **Absorption cutanée** :
    - Si barrière cutanée intègre : aucune influence de la chimie de surface sur la pénétration du cholécalciférol dans la peau à partir des NPs testées ici. Néanmoins, une meilleure absorption de l'actif à partir des NPs est observée en comparaison aux micelles de tensioactifs (jusqu'à 2,8 fois)
    - Si barrière cutanée lésée : la présence d'un revêtement globalement « neutre » hydrophile à la surface des NPs diminue l'absorption cutanée du cholécalciférol par rapport à des NPs lipophiles chargées (1,8 et 1,3 fois par rapport aux NPs de PLA et aux NPs d'actif pur)
    - Aucune différence observable entre une composition hydrophile de PEG et une composition hydrophile de PMPC

En résumé, cette étude a permis de montrer l'importance non négligeable du choix de la surface des NPs dans le développement de formulations et cela notamment pour le traitement de peaux dont la barrière cutanée est endommagée. Un point souligné par cette étude est que l'amélioration de l'absorption cutanée d'un principe actif non soluble dans l'eau ne dépend pas systématiquement de son « encapsulation » dans un matériau polymère et de sa libération depuis

celui-ci, mais dépend surtout de sa mise en forme sous forme de particules solides chargées en surface. L'encapsulation est toutefois nécessaire pour ralentir la dégradation des principes actifs qui pourrait avoir un effet délétère sur l'efficacité des traitements.

## Références bibliographiques Chapitre IV

- (1) Couvreur, P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2013**, *65* (1), 21-23
- (2) Albanese, A.; Tang, P. S.; Chan, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2012**, *14*, 1-16
- (3) Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 44s-49s
- (4) Wester, R. C.; Maibach, H. I. Percutaneous absorption in diseased skin. In *Topical Corticosteroids*; Karger Publishers: 1992; pp 128-141.
- (5) Prow, T. W.; Grice, J. E.; Lin, L. L.; Faye, R.; Butler, M.; Becker, W.; Wurm, E. M. T.; Yoong, C.; Robertson, T. A.; Soyer, H. P.; Roberts, M. S. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63* (6), 470-491
- (6) Bolzinger, M. A.; Briançon, S.; Chevalier, Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2011**, *3* (5), 463-478
- (7) Alnasif, N.; Zoschke, C.; Fleige, E.; Brodewolf, R.; Boreham, A.; Rühl, E.; Eckl, K.-M.; Merk, H.-F.; Hennies, H. C.; Alexiev, U.; Haag, R.; Küchler, S.; Schäfer-Korting, M. Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core-multishell nanotransporters. *J. Controlled Release* **2014**, *185*, 45-50
- (8) Tsai, J.-C.; Shen, L.-C.; Sheu, H.-M.; Lu, C.-C. Tape stripping and sodium dodecyl sulfate treatment increase the molecular weight cutoff of polyethylene glycol penetration across murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* **2003**, *295* (4), 169-174
- (9) Knudsen, N. Ø.; Jorgensen, L.; Hansen, J.; Vermehren, C.; Frokjaer, S.; Foged, C. Targeting of liposome-associated calcipotriol to the skin: effect of liposomal membrane fluidity and skin barrier integrity. *Int. J. Pharm.* **2011**, *416* (2), 478-85
- (10) Jensen, L. B.; Petersson, K.; Nielsen, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (1), 68-75
- (11) Döge, N.; Hönzke, S.; Schumacher, F.; Balzus, B.; Colombo, M.; Hadam, S.; Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Schäfer-Korting, M.; Schindler, A.; Rühl, E.; Skov, P. S.; Church, M. K.; Hedtrich, S.; Kleuser, B.; Bodmeier, R.; Vogt, A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J. Controlled Release* **2016**, *242*, 25-34
- (12) Verma, A.; Stellacci, F. Effect of surface properties on nanoparticle–cell interactions. *Small* **2010**, *6* (1), 12-21
- (13) Venkataraman, S.; Hedrick, J. L.; Ong, Z. Y.; Yang, C.; Ee, P. L. R.; Hammond, P. T.; Yang, Y. Y. The effects of polymeric nanostructure shape on drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2011**, *63* (14–15), 1228-1246
- (14) Zhong, Y.; Meng, F.; Deng, C.; Zhong, Z. Ligand-directed active tumor-targeting polymeric nanoparticles for cancer chemotherapy. *Biomacromolecules* **2014**, *15* (6), 1955-1969
- (15) Gref, R.; Minamitake, Y.; Peracchia, M. T.; Trubetskoy, V.; Torchilin, V.; Langer, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* **1994**, *263* (5153), 1600-1603
- (16) Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf., B* **2000**, *18* (3–4), 301-313

- (17) Xu, Q.; Ensign, L. M.; Boylan, N. J.; Schön, A.; Gong, X.; Yang, J.-C.; Lamb, N. W.; Cai, S.; Yu, T.; Freire, E. Impact of surface polyethylene glycol (PEG) density on biodegradable nanoparticle transport in mucus ex vivo and distribution in vivo. *ACS nano* **2015**, *9* (9), 9217-9227
- (18) Tang, B. C.; Dawson, M.; Lai, S. K.; Wang, Y. Y.; Suk, J. S.; Yang, M.; Zeitlin, P.; Boyle, M. P.; Fu, J.; Hanes, J. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106* (46), 19268-73
- (19) Forier, K.; Messiaen, A. S.; Raemdonck, K.; Deschout, H.; Rejman, J.; De Baets, F.; Nelis, H.; De Smedt, S. C.; Demeester, J.; Coenye, T.; Braeckmans, K. Transport of nanoparticles in cystic fibrosis sputum and bacterial biofilms by single-particle tracking microscopy. *Nanomedicine* **2013**, *8* (6), 935-49
- (20) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287-6305
- (21) Graf, C.; Gao, Q.; Schütz, I.; Noufele, C. N.; Ruan, W.; Posselt, U.; Korotianskiy, E.; Nordmeyer, D.; Rancan, F.; Hadam, S. Surface functionalization of silica nanoparticles supports colloidal stability in physiological media and facilitates internalization in cells. *Langmuir* **2012**, *28* (20), 7598-7613
- (22) Manson, J.; Kumar, D.; Meenan, B. J.; Dixon, D. Polyethylene glycol functionalized gold nanoparticles: the influence of capping density on stability in various media. *Gold bull.* **2011**, *44* (2), 99-105
- (23) Wu, X.; Landfester, K.; Musyanovych, A.; Guy, R. H. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2010**, *23* (3), 117-123
- (24) Fernandes, R.; Smyth, N. R.; Muskens, O. L.; Nitti, S.; Heuer-Jungemann, A.; Ardern-Jones, M. R.; Kanaras, A. G. Interactions of skin with gold nanoparticles of different surface charge, shape, and functionality. *Small* **2015**, *11* (6), 713-721
- (25) Kohli, A. K.; Alpar, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int. J. Pharm.* **2004**, *275* (1-2), 13-7
- (26) Hsiao, P. F.; Peng, S.; Tang, T.-C.; Lin, S.-Y.; Tsai, H.-C. Enhancing the in vivo transdermal delivery of gold nanoparticles using poly(ethylene glycol) and its oleylamine conjugate. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 1867-1878
- (27) Mahmoud, N. N.; Alkilany, A. M.; Dietrich, D.; Karst, U.; Al-Bakri, A. G.; Khalil, E. A. Preferential accumulation of gold nanorods into human skin hair follicles: Effect of nanoparticle surface chemistry. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *503* (Supplement C), 95-102
- (28) Ryman-Rasmussen, J. P.; Riviere, J. E.; Monteiro-Riviere, N. A. Surface Coatings Determine Cytotoxicity and Irritation Potential of Quantum Dot Nanoparticles in Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **2007**, *127* (1), 143-153
- (29) Abdel-Mottaleb, M. M.; Moulari, B.; Beduneau, A.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Surface-charge-dependent nanoparticles accumulation in inflamed skin. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (11), 4231-9
- (30) Otsuka, H.; Nagasaki, Y.; Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2012**, *64*, 246-255
- (31) Shim, J.; Seok Kang, H.; Park, W. S.; Han, S. H.; Kim, J.; Chang, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *97* (3), 477-84
- (32) Bachhav, Y.; Mondon, K.; Kalia, Y.; Gurny, R.; Möller, M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J. Controlled Release* **2011**, *153* (2), 126-132
- (33) Knudsen, N. Ø.; Rønholt, S.; Salte, R. D.; Jørgensen, L.; Thormann, T.; Basse, L. H.; Hansen, J.; Frøkjær, S.; Foged, C. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81* (3), 532-539
- (34) Kilfoyle, B. E.; Sheihet, L.; Zhang, Z.; Laohoo, M.; Kohn, J.; Michniak-Kohn, B. B. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. *J. Controlled Release* **2012**, *163* (1), 18-24

- (35) Vega, E.; Egea, M. A.; Garduño-Ramírez, M. L.; García, M. L.; Sánchez, E.; Espina, M.; Calpena, A. C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: Role of hydroxy- $\beta$ -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surf., B* **2013**, *110* (0), 339-346
- (36) Lapteva, M.; Santer, V.; Mondon, K.; Patmanidis, I.; Chiriano, G.; Scapozza, L.; Gurny, R.; Möller, M.; Kalia, Y. N. Targeted cutaneous delivery of ciclosporin A using micellar nanocarriers and the possible role of inter-cluster regions as molecular transport pathways. *J. Controlled Release* **2014**, *196*, 9-18
- (37) Lapteva, M.; Mondon, K.; Moller, M.; Gurny, R.; Kalia, Y. N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (9), 2989-3001
- (38) Laredj-Bourezg, F.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Rovère, M.-R.; Smatti, B.; Chevalier, Y. Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). *Int. J. Pharm.* **2015**, *496* (2), 1034-1046
- (39) Ramezanli, T.; Kilfoyle, B. E.; Zhang, Z.; Michniak-Kohn, B. B. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516* (1), 196-203
- (40) Park, D.; Lee, J. Y.; Cho, H. K.; Hong, W. J.; Kim, J.; Seo, H.; Choi, I.; Lee, Y.; Kim, J.; Min, S.-J.; Yoon, S.-H.; Hwang, J. S.; Cho, K. J.; Kim, J. W. Cell-Penetrating Peptide-Patchy Deformable Polymeric Nanovehicles with Enhanced Cellular Uptake and Transdermal Delivery. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (7), 2682-2690
- (41) Jin, Q.; Chen, Y.; Wang, Y.; Ji, J. Zwitterionic drug nanocarriers: A biomimetic strategy for drug delivery. *Colloids Surf., B* **2014**, *124*, 80-86
- (42) Kojima, M.; Ishihara, K.; Watanabe, A.; Nakabayashi, N. Interaction between phospholipids and biocompatible polymers containing a phosphorylcholine moiety. *Biomaterials* **1991**, *12* (2), 121-124
- (43) Ishihara, K.; Nakabayashi, N. Specific interaction between water-soluble phospholipid polymer and liposome. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **1991**, *29* (6), 831-835
- (44) Feng, W.; Zhu, S.; Ishihara, K.; Brash, J. L. Protein resistant surfaces: Comparison of acrylate graft polymers bearing oligo-ethylene oxide and phosphorylcholine side chains. *Biointerphases* **2006**, *1* (1), 50-60
- (45) Chrit, L.; Bastien, P.; Biatry, B.; Simonnet, J. T.; Potter, A.; Minondo, A. M.; Flament, F.; Bazin, R.; Sockalingum, G. D.; Leroy, F.; Manfait, M.; Hadjur, C. In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: Assessment of a new moisturizing agent, pMPC. *Biopolymers* **2007**, *85* (4), 359-369
- (46) Lee, A.-R. C. Phospholipid polymer, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine and its skin barrier function. *Arch. Pharmacol Res.* **2004**, *27* (11), 1177-1182
- (47) Kanekura, T.; Nagata, Y.; Miyoshi, H.; Ishihara, K.; Nakabayashi, N.; Kanzaki, T. Beneficial effects of synthetic phospholipid polymer, poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate), on stratum corneum function. *Clin. Exp. Dermatol.* **2002**, *27* (3), 230-234
- (48) Pegoraro, C.; Cecchin, D.; Madsen, J.; Warren, N.; Armes, S. P.; MacNeil, S.; Lewis, A.; Battaglia, G. Translocation of flexible polymersomes across pores at the nanoscale. *Biomaterials science* **2014**, *2* (5), 680-692
- (49) van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* **2014**, *1841* (3), 295-313
- (50) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10374-10385
- (51) Hsiue, G. H.; Lo, C. L.; Cheng, C. H.; Lin, C. P.; Huang, C. K.; Chen, H. H. Preparation and characterization of poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine)-block-poly(D,L-lactide) polymer nanoparticles. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45* (4), 688-698

- (52) Han, J.; Zhu, Z.; Qian, H.; Wohl, A. R.; Beaman, C. J.; Hoye, T. R.; Macosko, C. W. A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (10), 4018-4023
- (53) Lowry, G. V.; Hill, R. J.; Harper, S.; Rawle, A. F.; Hendren, C. O.; Klaessig, F.; Nobbmann, U.; Sayre, P.; Rumble, J. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. *Environ. Sci.: Nano* **2016**, *3* (5), 953-965
- (54) Hadgraft, J.; Ridout, G. Development of model membranes for percutaneous absorption measurements. I. Isopropyl myristate. *Int. J. Pharm.* **1987**, *39* (1-2), 149-156
- (55) Simon, G. A.; Maibach, H. I. The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2000**, *13* (5), 229-234
- (56) OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies*, OECD Publishing.
- (57) Dey, S.; Rothe, H.; Page, L.; O'connor, R.; Farahmand, S.; Toner, F.; Marsh, R.; Wehmeyer, K.; Zhou, S. An in vitro Skin Penetration Model for Compromised Skin: Estimating Penetration of Polyethylene Glycol [14C]-PEG-7 Phosphate. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2014**, *28* (1), 12-21
- (58) Almouazen, E.; Bourgeois, S.; Jordheim, L. P.; Fessi, H.; Briançon, S. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation. *Pharm. Res.* **2013**, *30* (4), 1137-1146
- (59) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Paka, G. D.; Ramassamy, C.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of polymer architecture on curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: Toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *96*, 409-420
- (60) Patzelt, A.; Richter, H.; Knorr, F.; Schäfer, U.; Lehr, C.-M.; Dähne, L.; Sterry, W.; Lademann, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J. Controlled Release* **2011**, *150* (1), 45-48
- (61) Alvarez-Roman, R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *99* (1), 53-62
- (62) Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J. P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55* (1), R1-R4
- (63) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. Flash NanoPrecipitation of Organic Actives and Block Copolymers using a Confined Impinging Jets Mixer. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56* (10), 1021-1024
- (64) Zhigaltsev, I. V.; Belliveau, N.; Hafez, I.; Leung, A. K. K.; Huft, J.; Hansen, C.; Cullis, P. R. Bottom-Up Design and Synthesis of Limit Size Lipid Nanoparticle Systems with Aqueous and Triglyceride Cores Using Millisecond Microfluidic Mixing. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3633-3640
- (65) Valencia, P. M.; Farokhzad, O. C.; Karnik, R.; Langer, R. Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 623
- (66) Hickey, J. W.; Santos, J. L.; Williford, J.-M.; Mao, H.-Q. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *J. Controlled Release* **2015**, *219*, 536-547
- (67) Rode García, T.; García Ac, A.; Lalloz, A.; Lacasse, F.-X.; Hildgen, P.; Rabanel, J.-M.; Banquy, X. Unified Scaling of the Structure and Loading of Nanoparticles Formed by Diffusion-Limited Coalescence. *Langmuir* **2018**, *34* (20), 5772-5780
- (68) Shen, H.; Hong, S.; Prud'homme, R.; Liu, Y. Self-assembling process of flash nanoprecipitation in a multi-inlet vortex mixer to produce drug-loaded polymeric nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13* (9), 4109-4120
- (69) Stepanyan, R.; Lebouille, J. G. J. L.; Slot, J. J. M.; Tuinier, R.; Stuart, M. A. C. Controlled Nanoparticle Formation by Diffusion Limited Coalescence. *Phys. Rev. Lett.* **2012**, *109* (13), 138301
- (70) Gref, R.; Miralles, G.; Dellacherie, E. Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis. *Polym. Int.* **1999**, *48* (4), 251-256
- (71) Grady, L. T.; Thakker, K. D. Stability of solid drugs: Degradation of ergocalciferol (vitamin D2) and cholecalciferol (vitamin D3) at high humidities and elevated temperatures. *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69* (9), 1099-1102

- (72) Mahmoodani, F.; Perera, C. O.; Fedrizzi, B.; Abernethy, G.; Chen, H. Degradation studies of cholecalciferol (vitamin D3) using HPLC-DAD, UHPLC-MS/MS and chemical derivatization. *Food Chem.* **2017**, *219*, 373-381
- (73) Luo, Y.; Teng, Z.; Wang, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (3), 836-843
- (74) Gupta, A. P.; Kumar, V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *Eur. Polym. J.* **2007**, *43* (10), 4053-4074
- (75) Peracchia, M. T.; Gref, R.; Minamitake, Y.; Domb, A.; Lotan, N.; Langer, R. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics1. *J. Controlled Release* **1997**, *46* (3), 223-231
- (76) Rancan, F.; Papakostas, D.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Delair, T.; Primard, C.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Investigation of Poly(lactic Acid) (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (8), 2027-2036
- (77) Alsaqr, A.; Rasouly, M.; Musteata, F. M. Investigating Transdermal Delivery of Vitamin D3. *AAPS PharmSciTech* **2015**, 1-10

# **-Chapitre V-**

**Approfondissement des mécanismes  
d'interactions nanoparticules-peau  
liés à la surface et la structure de  
nanoparticules polymériques**

## 5.1 Introduction générale du chapitre V

Dans le chapitre IV précédent, l'influence **du type de surface** polymérique de NPs (PLA : lipophile et négativement chargée, PEG : hydrophile et globalement non chargée, PMPC : hydrophile et zwitterionique) sur différents aspects de la délivrance dans la peau d'une molécule modèle lipophile (cholécalférol) a été étudiée. Il a notamment été remarqué que l'absence d'une surface hydrophile recouvrant les NPs (NPs nues de PLA lipophile) favorisait la pénétration du cholécalférol par rapport aux NPs de surface hydrophile, et ce uniquement sur peau lésée.

Dans ce chapitre V, l'intérêt est de déterminer comment **la quantité de bloc hydrophile** (PEG) présente dans des NPs polymériques conditionnait la pénétration cutanée du cholécalférol. Un soin particulier a ainsi été apporté dans la mise en évidence des interactions possibles entre ces NPs et les composants de la peau pour comprendre plus précisément les mécanismes de pénétration cutanée liés aux NPs polymériques. Une librairie de NPs a été fabriquée par Nanoprécipitation Flash à partir de polymères diblocs à base de PLA, comprenant différentes quantités de PEG, préalablement synthétisés (Chapitre II). La taille des NPs a été gardée constante indépendamment du polymère utilisé. L'influence de la quantité de bloc hydrophile dans les polymères sur les propriétés structurales des NPs a été évaluée grâce à des mesures de rendement, de microscopie électronique et de stabilité colloïdale. La surface des NPs, a quant à elle, été caractérisée par la mesure du potentiel zêta et du dosage du PEG en surface par une méthode RMN. La pénétration cutanée de l'actif modèle a ensuite été étudiée sur peau de porc pour comprendre le rôle de la composante hydrophile des NPs, conditionnant notamment leur surface et leur dynamique, sur la délivrance cutanée. L'étude a été réalisée à la fois sur peau intacte et sur peau lésée afin de mettre en évidence l'importance de l'état pathologique de la peau sur l'absorption cutanée. Les interactions entre les NPs et deux composants essentiels de la peau, le sel et les lipides, ont été par la suite évaluées par des mesures de stabilité colloïdale et mouillabilité, respectivement. La sédimentation/adhésion des NPs sur la peau a également été examinée par microscopie de fluorescence.

Ce chapitre est présenté sous forme d'un article scientifique soumis pour publication le 20/11/2018 dans International Journal of Pharmaceutics et intitulé : *Subtle and unexpected role*

*of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nano-formulations into intact and impaired skin.*

La synthèse des polymères et leurs caractérisations structurelles ont été réalisées au sein du Laboratoire de Nanotechnologie Pharmaceutique, avec l'aide du Dr Jean-Michel Rabanel. Les aspects de formulations et de caractérisations physicochimiques de NPs ont été étudiés au sein du Laboratoire de Biomatériaux et Interfaces Structurées et du LAGEP. Les tests de pénétration cutanée ont été menés au sein du LAGEP. Les tests d'interactions avec les composants de la peau (sel et lipides) ont été réalisés au sein du Laboratoire de Biomatériaux et Interfaces Structurées, avec l'aide de Jimmy Faivre. Le manuscrit a été préparé par les Pr Stéphanie Briançon, Pr Marie-Alexandrine Bolzinger, Pr Patrice Hildgen, Pr Xavier Banquy et par moi-même.

## **Subtle and unexpected role of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nanoformulations into intact and impaired skin.**

Augustine Lalloz<sup>1,2</sup>, Marie-Alexandrine Bolzinger<sup>2\*</sup>, Stéphanie Briançon<sup>2</sup>, Jimmy Faivre<sup>1</sup>, Jean-Michel Rabanel<sup>1,‡</sup>, Araceli Garcia Ac<sup>1</sup>, Patrice Hildgen<sup>1\*</sup>, Xavier Banquy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada*

<sup>2</sup>*Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEP UMR 5007, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, F-69100, Villeurbanne, France*

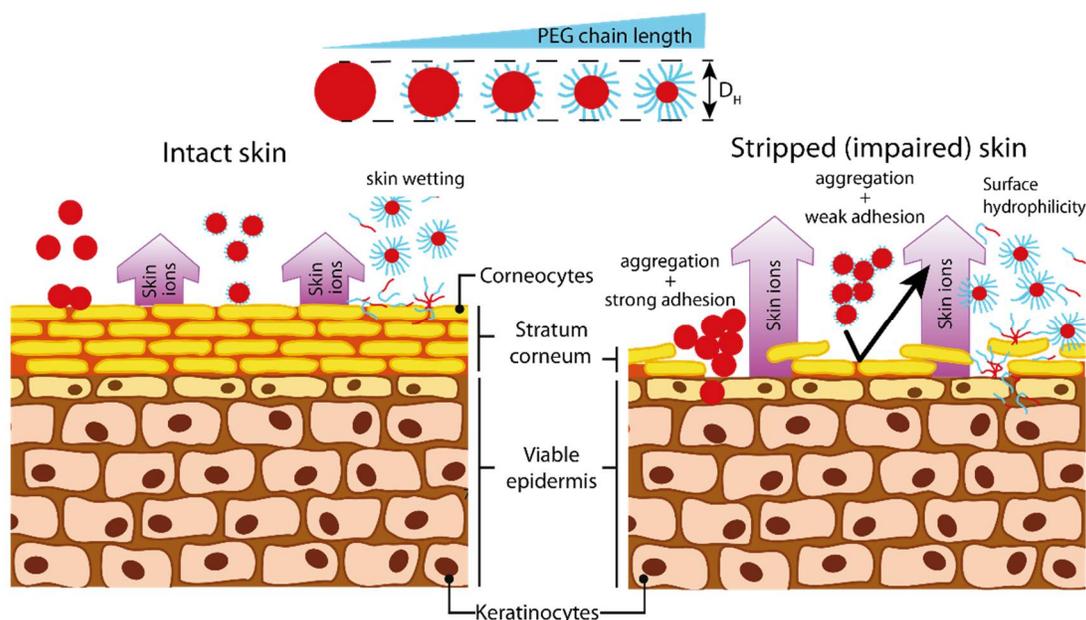
<sup>‡</sup>*Present address : INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada*

\*Corresponding authors: [xavier.banquy@umontreal.ca](mailto:xavier.banquy@umontreal.ca); [patrice.hildgen@umontreal.ca](mailto:patrice.hildgen@umontreal.ca); [marie.bolzinger@univ-lyon1.fr](mailto:marie.bolzinger@univ-lyon1.fr)

## 5.2 Abstract

We present a systematic study of the role of poly(ethylene glycol) (PEG) content in NPs on drug skin absorption. Cholecalciferol-loaded NPs of 100 nm of diameter were prepared by flash nanoprecipitation from PLA-*b*-PEG copolymers of various PEG lengths. As PEG content increased in the polymer, we observed a transition from a frozen solid particle structure to a more dynamic particle structure. Skin absorption studies showed that polymer composition influenced drug penetration depending on skin condition (intact or impaired). In intact skin, highly PEGylated NPs achieved the best skin absorption, even if the penetration differences between the NPs were low. In impaired skin, on the contrary, non-PEGylated NPs (PLA NPs) promoted a strong drug deposition. Further investigations revealed that the strong drug accumulation from PLA NPs in impaired skin was mediated by aggregation and sedimentation of NPs due to the release of charged species from the skin. In contrast, the dynamic structure of highly PEGylated NPs promoted wetting of the surface and interactions with skin lipids, improving drug absorption in intact skin. Since NPs structure and surface properties determine the drug penetration mechanisms at the NP-skin interface, this work highlights the importance of properly tuning NPs composition according to skin physiopathology.

## Graphical Abstract



## Keywords

Polymeric nanoparticles, poly(ethylene glycol), skin penetration, interactions, penetration mechanisms, cholecalciferol

### 5.3 Introduction

The dermal route for local skin delivery or systemic drug delivery has many advantages, such as easy, non-invasive administration, and avoidance of first pass metabolism, but poses challenges. If no particular formulation is developed, diffusion of drugs towards the viable layers of the skin and the systemic circulation is limited, and confined to drugs with very specific properties, such as medium lipophilicity, low size and high potency<sup>1</sup>. This formidable barrier function of the skin is notably achieved by the specific structure of the *stratum corneum*, the upper layer of the skin, made of dead keratinized cells embedded in a mixture of organized lipids assembled as “brick and mortar”<sup>2</sup>. To counteract the barrier properties, several types of formulations offer the opportunity to modulate the skin drug penetration. Among them, nanoparticles (NPs) have gained great attention in skin delivery research due to their ability to formulate lipophilic drugs, to control the drug release, and to target specific skin layers and follicular pathway. The modulation of the drug penetration was found related to the nanocarrier type (liposomes, lipid particles, polymeric particles) and its physicochemical properties which influence the surface effects on the skin (interactions with lipids, film formation, occlusion) as well as drug release from the nanocarrier<sup>3-4</sup>. A strong accumulation of nanocarriers in the *stratum corneum* or their penetration in skin appendages also help drugs to overcome the skin barrier<sup>5</sup>, even if the penetration of the NPs themselves into the viable skin layers is uncertain and unlikely on intact skin<sup>6</sup>.

Nevertheless, the possible interactions between the skin components and the NPs which control the mechanisms of drug delivery are still unclear, as well as the role of the skin physiopathology on these interactions. In fact, pharmaceutical skin formulations are mainly topical products intended to treat cutaneous diseases and therefore to be used on a non-intact skin characterized by an alteration of the cutaneous barrier function due to histological and skin microenvironment changes. For example, wounds, scratches, inflammation or alteration of the lipid composition and organization, as in the case of atopic dermatitis, are responsible for a damage of the skin barrier<sup>7</sup>. In other cases, disorders of the epidermal differentiation (psoriasis, ichthyosis, skin

cancer...) are characterized by an epidermal thickening <sup>8-9</sup>, also altering the skin barrier properties. In addition, skin of premature newborn children is also characterized by a less efficient cutaneous barrier <sup>10</sup>. Since skin penetration studies from NPs are in most cases performed on healthy skin models, the effect of the pathological condition of the skin is often underestimated when developing efficient nanocarriers for skin delivery. It is however a key effect to consider. In fact, it was notably found that the penetration profiles of drug in injured skin (abraded, stripped, inflamed, delipidated) was clearly different than from intact skin <sup>11-14</sup>, as well as the fate of the nanoparticles in skin <sup>15-16</sup>, due to the damages of the *stratum corneum* which weaken the skin barrier function. Nonetheless, an increased skin penetration was not systematically reported <sup>15, 17-18</sup>, highlighting the importance to systematically study this effect.

Even though no general rules concerning skin drug penetration were defined so far, a lot of NPs characteristics have been reported to affect both drug and NPs skin penetration. Among them, the physical properties of the NPs such as size <sup>19-20</sup>, and deformability <sup>21-22</sup> are well-known. Some evidences also recently demonstrated the influence of the NPs shape <sup>23-24</sup>. Drug accumulation in the skin also depends on the composition of the NPs core, since the solubilizing properties of the encapsulating material towards the drug influence the partition coefficient of the drug from particles to the skin <sup>25</sup>. The surface properties are other important NPs characteristics which likely control skin NPs-interactions. A lot of studies have shown the influence of NPs surface charge on the skin penetration <sup>23, 26-27</sup>, even though conclusions were often contradictory. In fact, in addition to surface charge, other surface properties must also be considered, such as the composition. For example, the hydrophilic or hydrophobic composition of the particle surface is still a poorly systematically studied characteristic although it may also play a role in the mechanisms of drug penetration by dictating the type and intensity of NPs interactions with the skin surface and so the nanoparticle fate on skin. For example, a study by Rancan *et al.* showed that bare lipophilic PLA NPs loaded with a lipophilic fluorochrome tend to lose their particulate morphology after incubation on human skin surface <sup>28</sup>. It was also been demonstrated that the surface functionalization of gold particles with a hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) corona was beneficial to prevent their aggregation induced by skin <sup>29</sup> and, to improve the deposition of particles in skin layers <sup>30</sup> or in follicles <sup>31</sup>. It is also likely that the interactions between skin and NPs surface strongly depend on the skin surface condition.

In fact, on intact skin, NPs are deposited on a non-viable lipophilic surface. On the contrary, if the *stratum corneum* is damaged, the interactions are expected to be drastically different since the particles may interfere directly with the more hydrophilic and viable suprabasal layers.

Recently, amphiphilic block copolymer particles which form a lipophilic core-hydrophilic surface structure, have demonstrated their potential for skin drug delivery compared to commercial formulations or to lipid nanoformulations<sup>20,25,32-35</sup>. The use of this kind of particles to favour drug absorption in topical treatment seems to be an interesting strategy compared to bare lipophilic NPs in order to reduce NPs destabilization and to possibly interact more efficiently with the hydrophilic skin layers in case of damaged skin. Nonetheless, we recently observed the inverse trend since we showed that the presence of a hydrophilic coating of PEG or poly(2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine) on PLA-based polymeric NPs significantly reduced absorption of cholecalciferol in damaged skin (stripped skin) compared to bare lipophilic PLA NPs<sup>36</sup>. In addition to the hydrophilic or lipophilic nature of the skin, other parameters are therefore likely to affect the interactions of the NPs with the skin and so the drug absorption, depending of the NPs hydrophilic composition.

The objective of this systematic study was thus to understand more specifically the role of the hydrophilic polymeric content of PLA-based NPs on the penetration of cholecalciferol in both intact and impaired skin, *via* skin-NPs interactions studies. Cholecalciferol was chosen as a strong lipophilic model drug due to its chemical structure closely related to its active metabolite, calcitriol, which is a first-line treatment of psoriasis. Firstly, a library of cholecalciferol-loaded PLA based NPs with increasing PEG content in NPs was prepared. PEG content in NPs was varied by using PLA-b-PEG polymer of different PEG lengths. The preparation process was tuned to obtain identically sized NPs regardless of the chemical composition of the polymer, in order to rule out potential size effects across all formulations. The physicochemical properties and structures of the NPs were fully characterized as a function of polymer composition. The NPs formulations were then systematically compared with regard to drug penetration into intact skin and into a model of barrier-disrupted skin. Special attention was paid to the examination of the interactions between NPs and skin components to gain insights into the mechanisms of drug skin penetration enhancement from polymeric NPs according to NPs hydrophilic composition.

## 5.4 Materials and Methods

### 5.4.1 Materials

Analytical grade acetonitrile, methanol and chloroform were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Acetone was obtained from Biosolve Chimie (Dieuze, France). Dimethylformamide (DMF) was obtained from Prolabo (Paris, France). Solvents were used as received. Deionized water of 18 M $\Omega$  cm resistivity was used throughout the work. Cholecalciferol, deuterated chloroform, and deuterated water have been supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Butylhydroxytoluene (BHT) was a gift from Clariant (Frankfurt, Germany). Oleth-20 surfactant (Brij® O20) was bought from Croda (Cleveland, UK). Ceramide IIIB was a kindly gift from Evonik (Essen, Germany).

For the preparation of Hank's Balanced salt solution (HBSS), potassium chloride, sodium chloride and D-glucose anhydrous were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK), potassium dihydrogenophosphate was obtained from Prolabo (Paris, France), sodium bicarbonate was purchased from Cooper (Melun, France) and di-sodium hydrogenophosphate dihydrate was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

### 5.4.2 Formulations Preparation and Purification

Cholecalciferol-loaded polymeric nanoparticles were prepared from a library of PLA and PLA-*b*-PEG polymers with PEG of different lengths ranging from 1 to 10 kDa (PLA, PLA-*b*-PEG1K, PLA-*b*-PEG2K, PLA-*b*-PEG5K and PLA-*b*-PEG10K). The polymers were synthesized by ring opening polymerization and characterized in terms of molecular weight and %<sub>w/wtotal</sub> of PEG in polymers, according to the protocols described in Supporting Information.

A typical procedure of nanoparticle fabrication using a Confined Impingement Jet (CIJ) Mixer (Flash Nanoprecipitation) is described below. The CIJ mixer was fabricated in house according to the blueprint of Han et al.<sup>37</sup>.

The organic phase was composed of 30 mg of PLA or 60 mg of PLA-*b*-PEG polymer (1 or 2 % w/v<sub>organic phase</sub>), cholecalciferol (7% w/w<sub>polymer</sub> i.e. 0.07 or 0.14 % w/v<sub>organic phase</sub>) and BHT (4 % w/w<sub>polymer</sub>, i.e. 0.04 or 0.08 % w/v<sub>organic phase</sub>) dissolved in 3 mL of acetone. BHT was used to prevent cholecalciferol degradation. The organic solution was transferred in a 3mL syringe and a second syringe was loaded with 3 mL of distilled water. The two syringes were connected to

the CIJ mixer and the two phases were injected into the mixing chamber at an equal flow rate by hand motion. In order to obtain NP of same size, the total flow rate was varied depending on the polymer. Immediately after mixing, the nanosuspension was diluted in 12 mL of distilled water stirred at 400 rpm to allow a rapid quenching.

To remove the organic solvent, the nanosuspensions were dialyzed against distilled water under stirring during 3h in a regenerated cellulose membrane bag with a cut-off of 10-12kDa (Spectra Por, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez USA). Then, organic solvent residuals were gently evaporated under reduced pressure. Finally, the nanosuspensions were purified by centrifugation at 2 300 g for 5 minutes to remove aggregates of polymers. The supernatant loaded in nanoparticles was collected (polymer yield > 85%).

### 5.4.3 Nanoparticles Characterization

#### 5.4.3.1 Size measurements

The NP size was determined by dynamic light scattering (DLS) on a Malvern Zetasizer NanoSeries (Malvern, Worcester, U.K.) at a diffraction angle of 173°. Measurements were done in triplicate in deionized water.

#### 5.4.3.2 Zeta potential measurements

The NP Zeta potential was determined by electrophoretic light scattering on a Malvern Zetasizer (Malvern, Worcester, U.K.). Measurements were done in triplicate after suspension of NPs in 5 mM NaCl solution.

#### 5.4.3.3 Drug loading and drug yield

Cholecalciferol content in NPs suspensions after purification were determined by dissolving 100 µL of NP in 900 µL of acetonitrile. The solutions were then filtered through a 0.2 µm nylon membrane filter (Uptidisc®, 13 mm, Interchim, Montlucon, France) and analyzed by an UV-HPLC method described below (Material & Methods, paragraph 5). NPs concentration was determined by freeze-drying and accurate weighing 1mL of NPs suspension.

Drug loading and drug yield were calculated using **equations (5.1) and (5.2)** respectively.

#### **Equation. 5.1**

$$\text{Drug loading} = \frac{\text{weight of cholecalciferol in nanosuspension}}{\text{weight of NPs}} * 100$$
$$\text{Drug yield} = \frac{\text{weight of cholecalciferol in nanosuspension}}{\text{weight of cholecalciferol fed initially}} * 100 \quad \text{Equation. 5.2}$$

#### 5.4.3.4 Quantification of fabrication yield

In order to determine the amount of nanoparticles fabricated from the polymers, 5 mL of cholecalciferol/BHT loaded nanosuspensions were centrifuged (2 h at 50 000 g). The nanoparticle pellet and the supernatant obtained after centrifugation were freeze-dried and accurately weighed. The composition of the polymer in the supernatant was determined by <sup>1</sup>H NMR (Varian 400-MR, Varian, USA). The fraction of free polymer chains/micelles remaining in suspensions and which did not form nanoparticles was calculated using the **equation (5.3)**:

$$\text{Fraction of free polymer chains} = \frac{\text{weight of polymer in supernatant}}{\text{weight of polymer and drug after purification}} * 100 \quad \text{Equation. 5.3}$$

#### 5.4.3.5 Total and surface PEG quantification by NMR Analysis

NPs were first concentrated (up to 5-fold) by ultrafiltration (Ultrafiltration disk membranes, 10 kDa, 76 mm, Millipore®, Sigma Aldrich, Steinheim Germany)

To determine total PEG content in the NPs, 1 mL of the concentrated nanosuspension was freeze-dried in an Eppendorf tube, then dissolved in CDCl<sub>3</sub> with tetramethylsilane as internal standard and analyzed by <sup>1</sup>H NMR (Bruker AV500, Bruker, Germany). The mass concentration of the NPs was also determined for PEG surface density calculations.

For surface PEG quantification, 500 μL of concentrated NPs suspension were added to 500 μL of deuterium oxide using DMF as an internal standard and analyzed by <sup>1</sup>H NMR (Bruker AV500, Bruker, Germany). Quantifications were conducted with reference to the internal standard peak intensity. PEG chain surface densities were calculated as previously described<sup>38</sup>.

#### 5.4.3.6 Cryo-Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM)

Drug-loaded NPs were imaged at the Centre de Caractérisation Microscopique des Matériaux (CM<sup>2</sup>) technical facility of the Université de Montréal. 3 μL droplets of NP suspensions (0.1–1

mg/mL) were deposited on Formvar-Carbon 200 mesh copper grids (Canemco-Marivac, Lakefield, Canada) at room temperature for 10 minutes. After incubation, excess of suspension was soaked with a wiper and grids were air-dried for 2-3 hours before imaging. No staining procedure was used.

The microscope used for the acquisition is a JEM-2100F field-emission electron microscope (Jeol Ltd., Tokyo, Japan) operating 200 kV acceleration voltage. The grids were introduced into the microscope column under vacuum. The samples were cooled with liquid nitrogen added in the sample holder (Gatan Inc., Warrendale, PA). Image acquisition was performed in bright-field mode with a digital camera at low electron dose to prevent damage to the heat-sensitive particles. A temperature controller (Smart Set model 900 cold stage controller; Gatan Inc., Warrendale, PA) maintained the grids at -150 °C during the imaging process.

#### 5.4.3.7 Colloidal Stability studies

The colloidal stability of all polymeric nanoparticles in aqueous suspensions was investigated by monitoring the hydrodynamic diameter and zeta potential of the particles stored at 4°C.

### 5.4.4 Skin Penetration Studies

#### 5.4.4.1 Skin preparation

Porcine flank skin from 4 donors was used for the skin absorption studies. Skin was obtained from young female pigs freshly sacrificed at the École de Chirurgie (Université Claude Bernard Lyon-1, Lyon France). Skin was frozen at -20°C until use for a maximum of 3 months. On the day of experiments, skin was thawed at room temperature. Hairs were removed with an electric clipper. The subcutaneous fatty tissue was removed with a scalpel and the excised skin was cleaned up with tap water. Skin thickness was measured with a caliper (Mitutoyo) ( $1.25 \pm 0.10$  mm). Transepidermal water loss (TEWL) on each skin piece was determined using a Tewameter TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Köln, Germany) to evaluate the skin integrity according to OECD guidelines<sup>39</sup>. Skin pieces with a TEWL value higher than  $15 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$  were discarded.

To highly impair skin barrier, SC was removed by tape stripping (Standard D-Squame, Monaderm, Monaco) up to reach a TEWL value between  $30\text{-}40 \text{ g.m}^2.\text{h}^{-1}$ <sup>40-41</sup>.

#### 5.4.4.2 In vitro assessment of cholecalciferol skin absorption

Cholecalciferol transport through skin from the nanosuspensions was assessed on Franz static diffusion cells. Skin pieces were mounted between the donor and receptor chambers of Franz cells (diffusion area = 2.54 cm<sup>2</sup>, n > 7 independent experiments). The 10 mL receptor compartment was filled with HBSS buffer at pH 7.4 containing 0.5 % of oleth-20 to ensure sink conditions and 0.002 % of BHT to avoid drug oxidation. After 30 min of equilibration, 0.4 mL/cm<sup>2</sup> of freshly prepared polymeric formulations was deposited on the skin surface, which corresponds to a cholecalciferol deposition of 35 µg/cm<sup>2</sup>. NPs were diluted if necessary to achieve a cholecalciferol concentration of 90 µg/mL in all formulations (skin deposition of 35µg/cm<sup>2</sup>) and a polymer concentration of 1.2 mg/mL (skin deposition of 0.47 mg/cm<sup>2</sup>). The receptor compartment was stirred at 400 rpm. All experiments were carried out under occlusive conditions and in a dark place for 24 h to avoid drug degradation. The water bath was maintained at 37°C to ensure 32±2°C at the surface of the skin. At the end of the study the receptor fluid was removed, and freeze-dried. Franz cells were dismantled. The skin surface was washed three times with 1 mL of a fresh receptor fluid solution and wiped with a cotton swab to recover the non-absorbed fraction. The skin surface was stripped once to remove the last residues of NPs adhering to the skin. For intact skin only, *stratum corneum* was removed by tape stripping (28 strips) (Standard D-Squame, Monaderm, Monaco). The viable epidermis and dermis were separated by heat treatment in water at 60 °C for 45 s and were cut into small pieces with a scalpel. Cholecalciferol was extracted from each fraction (skin layers, freeze dried receptor fluid and residual formulation) with acetonitrile containing 0.002 %<sub>w/w</sub> BHT under ultrasounds for 1 hour. Samples were filtered through a 0.2 µm nylon membrane filter (Uptidisc®, 13 mm, Interchim, Montlucon, France) before analysis by an UV-HPLC method described below (Material & Methods, paragraph 5).

#### 5.4.5 HPLC Titration of Cholecalciferol

Cholecalciferol content was analyzed using liquid chromatography with a reverse phase column using a previously published method with a slight modification<sup>42</sup>. The HPLC set up from Waters (St Quentin en Yvelines, France) was composed of a Waters 717 injector, a Waters 600 pump, a reverse phase column XSelect® HSS C18 (4.6 × 150 mm, 3.5µm) and a Waters 2998 photodiode array UV detector working at 266 nm wavelength. The isocratic elution with

methanol/acetonitrile (90:10) solvent at 1 mL min<sup>-1</sup> flow rate and 30 °C gave a retention time of 6.6 min for cholecalciferol. Injection volume was 20 or 40 µL. The calibration curve for quantitative analysis was from 20 to 0.03 µg.mL<sup>-1</sup>. Data were analyzed with Empower 3 software.

#### 5.4.6 Interactions Between Skin Components and Nanoparticles

##### 5.4.6.1 NPs stability in suspension upon exposure to skin-conditioned solution

Because the physical state of the NPs upon skin exposure may affect skin penetration<sup>43-44</sup>, the colloidal stability of NPs due to species released from skin or present on skin surface was carefully studied. In brief, pieces of intact skin or damaged skin were mounted on Franz diffusion cells using the same protocol as used for the penetration studies in section “*In vitro assessment of cholecalciferol skin absorption*”. 0.4 mL/cm<sup>2</sup> of deionized water was deposited on skin. After 24 hours of incubation, the “skin-conditioned solutions” were filtered through 0.2 µm nylon membrane filter to remove skin debris and protein aggregates. The content of soluble species in conditioned-solutions was quantified with an osmometer through determining the osmolarity of the (Micro-Osmette<sup>TM</sup>, Precision Systems Inc, Natick, USA).

In order to evaluate the NPs stability in the same conditions as during skin penetration studies (i.e. same concentration of NPs and same concentration of soluble species originating from skin), the filtrated “skin-conditioned solutions” were first concentrated. To concentrate, the filtrates were freeze-dried, and the dry residues were dissolved in a known smaller volume of deionized water. The concentrated “skin-conditioned solutions” were then diluted with NP suspensions to reach skin penetration concentrations of NPs (1.2 mg/mL) and soluble species. The stability of the NPs was evaluated after mixing with the “skin-conditioned solutions” by monitoring NPs size for 24 hours by DLS. For each condition (intact or stripped skin), tests were replicated with n=6 skin pieces from 6 different pigs.

##### 5.4.6.2 Visualization of NPs sedimentation on impaired skin surface

0.4 mL/cm<sup>2</sup> of fluorescent NPs (diluted at 1.2 mg/mL) made of a mixture of PLA / PLA-Cy5 (90/10 %w/w) or PLA-*b*-PEG1K/PLA-Cy5 (90/10 %w/w) was deposited onto stripped skin pieces mounted in Franz cell according to the same protocol than described in section “*In vitro assessment of cholecalciferol skin absorption*”. After 24h of incubation, residual formulation

was removed, and skin pieces were wiped with a cotton swab. One tape strip was performed to remove the formulation residues adhering/sticking to the skin. Skin strip was deposited on a microscopy slide and imaged using an Olympus IX81 microscope equipped with a Olympus UPlanSApo 10×/0.40 Infinity/0.17 FN26.5 objective (Olympus Canada Inc., Toronto, ON, Canada), a 12 bits Retiga-2000R CCD Camera (QImaging, Surrey, BC, Canada) and MetaMorph® Advanced software. The mean fluorescence intensities of the images were calculated using ImageJ software (Image J. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.). Tests were replicated with  $n = 5$  skin pieces from 3 different pigs. Three images at least were taken per strip.

#### 5.4.6.3 Evaluation of the alteration of lipid surface model

Ceramides IIIB coatings on cleaved mica slides were performed at room temperature with a built-in house spin coater. 40  $\mu\text{L}$  of ceramide IIIB in chloroform (0.5 mg/mL) were spin coated on mica sheets of 1cm diameter at 1000 rpm for 30 seconds. After coating, the lipid films were air-dried for 2 hours. The contact angles of a water droplet (10  $\mu\text{L}$ ) on the lipid surfaces were then measured with a contact angle meter (Tantec, Model CAM Micros, Schaumburg, USA) before and after 24h of incubation at 32°C in 1mL of nanosuspensions (diluted at 1.2 mg/mL). All contact angles were determined at room temperature. Three replicated experiments were performed for each nanosuspension. The work of adhesion  $W_{LS}$  was calculated from the contact angle data using the Young-Dupré equation (**equation 5.4**):

$$W_{LS} = \sigma_{LV}(1 + \cos\theta) \quad \text{Equation 5.4}$$

where  $W_{LS}$  is the work of adhesion liquid-solid,  $\sigma_{LV}$  the interfacial tension liquid-vapor and  $\theta$  the contact angle.

#### 5.4.7 Data analysis

Statistical analysis of differences between the different treatments were performed using Student  $t$ -test. The significance level ( $p$ ) was set at 0.05.

## 5.5 Results and Discussion

### 5.5.1 Increase of PEG chain length induces structural changes from solid NPs to micellar NPs

The NPs were fabricated from PLA or PLA-*b*-PEG copolymers synthesized by ring opening polymerization. PLA-*b*-PEG copolymers exhibited a PLA block in the range of  $M_w$  14 to 25 kDa and a PEG block of  $M_w$  ranging from 1 to 10 kDa with narrow polydispersity index (PDI). PLA and fluorescent PLA homopolymers have a lipophilic block of 36 kDa. The PEG content in the polymers measured by NMR varied from 0 to 24.9% w/w. Mass molecular weight,  $M_w$ , polydispersity index, and PEG content are presented in **Table 5.1**.

**Table 5.1** Polymer characteristics

Polymer	PEG size [g/mol]	Total Mn (GPC) [g/mol]	Total Mw (GPC) [g/mol]	Total Mw (NMR) * [g/mol]	PdI (GPC) **	PEG content (NMR) *** [%w/w <sub>total</sub> ]
PLA	-	26 700	36 300	ND	1.4	-
PLA-Cy5	-	26 700	36 300	ND	1.4	-
PLA- <i>b</i> -PEG1K	1 000	18 200	26 500	32 300	1.5	3.1
PLA- <i>b</i> -PEG2K	2 000	14 600	22 300	23 300	1.5	8.6
PLA- <i>b</i> -PEG5K	5 000	14 700	19 140	20 100	1.3	24.9
PLA- <i>b</i> -PEG10K	10 000	20 100	27 900	40 800	1.4	24.5

\* calculated from the number of LA residues per PEG chain given by the integration of peak intensity ratios of PEG (3.6 ppm) and PLA (5.2 ppm) by  $^1\text{H}$  NMR

\*\* calculated from the GPC analysis:  $\text{PdI} = M_w/M_n$

\*\*\* calculated from the  $^1\text{H}$  NMR results:  $\text{PEG}\%w/w = \frac{M_w \text{ PEG}}{(M_w \text{ PEG} + M_w \text{ PLA chain})} \times 100$

Since particle size is a factor known to control drug penetration into skin <sup>20, 45-46</sup>, NPs with identical hydrodynamic diameter were produced and used throughout the study. To obtain NPs of identical hydrodynamic size, the flow rate used during Flash Nanoprecipitation (FN) was tuned according to the PEG weight content in the polymer. Indeed, it has been reported that NPs size made of diblock copolymers depends heavily on the weight ratio of the hydrophobic/hydrophilic blocks <sup>36, 38</sup> and can be modulated by varying the flow rate of each

injected phase<sup>36-37, 47-48</sup>. As measured by DLS, NPs with a hydrodynamic diameter  $D_H = 100$  nm (PDI < 0.1) were successfully obtained regardless the polymer used (**Table 5.2**).

The surface properties of the NPs, i.e. the zeta potential and the surface PEG content, were measured as a function of the total PEG content in the polymers. The surface density of PEG increased from 0 to 48 ethylene oxide units per nm<sup>2</sup> with the total PEG content in the polymer (**Table 5.2**). Along with the increase of PEG content on NPs surface, a decrease of the ZP from -33 to -3 mV was observed as expected due to shielding of the NP surface charges by the PEG layer.<sup>49</sup>

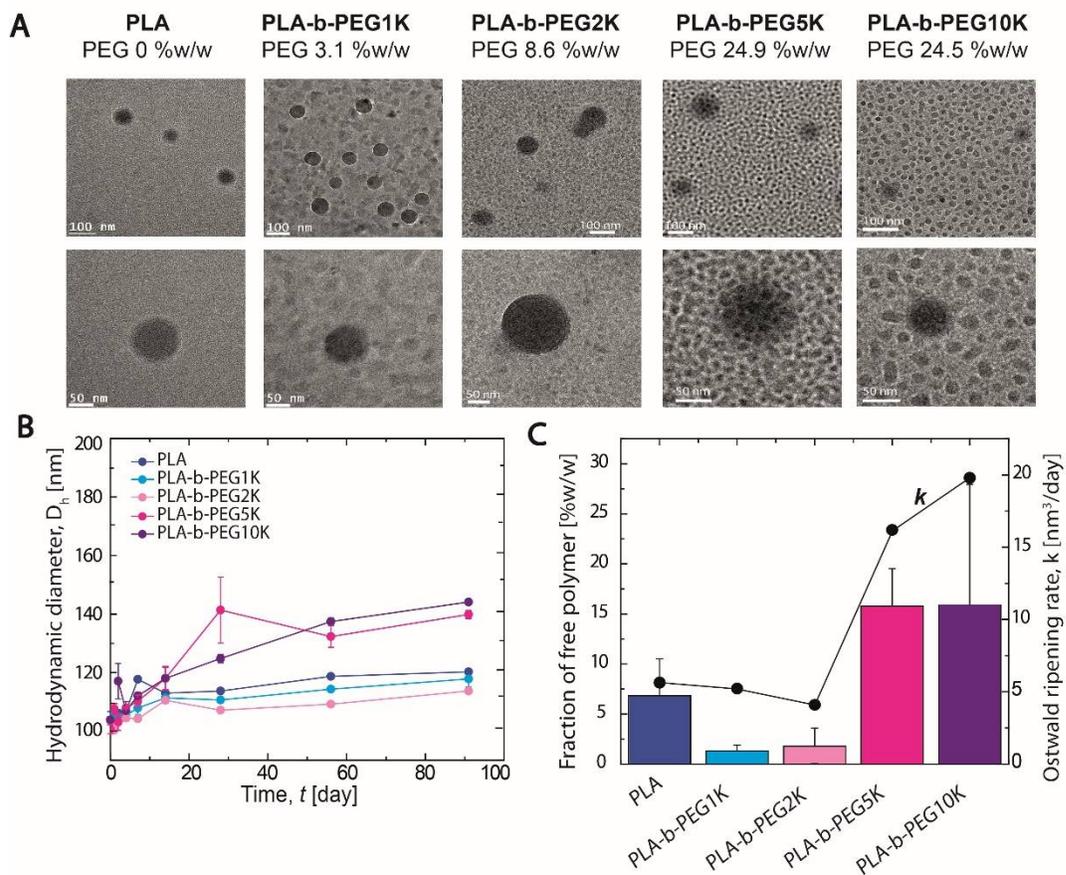
**Table 5.2** Physico-chemical characteristics of NPs. Data are reported as mean over three separate formulations  $\pm$  SD

Polymer	PLA	PLA- <i>b</i> -PEG1K	PLA- <i>b</i> -PEG2K	PLA- <i>b</i> -PEG5K	PLA- <i>b</i> -PEG10K
% PEG in polymer	0	3.1	8.6	24.9	24.5
Z-average size [nm]	100 $\pm$ 3	103 $\pm$ 3	104 $\pm$ 2	102 $\pm$ 6	102 $\pm$ 1
Number mean size [nm]	73 $\pm$ 6	74 $\pm$ 3	72 $\pm$ 6	69 $\pm$ 2	70 $\pm$ 2
PDI	0.09 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01
Zeta potential [mV]	-33 $\pm$ 2	-23 $\pm$ 2	-13 $\pm$ 2	-6 $\pm$ 1	-3.5 $\pm$ 0.2
Drug loading [%w/w]	7.3 $\pm$ 0.2	7.2 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.1
Drug yield [%]	95 $\pm$ 2	96 $\pm$ 2	98 $\pm$ 1	97 $\pm$ 1	98 $\pm$ 3
PEG surface density [ethylene glycol units/nm <sup>2</sup> ]	-	3 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	48 $\pm$ 6	41 $\pm$ 5

The morphology of the NPs was imaged by cryo-TEM. Samples were cryogenized to prevent the collapse and deformation of the NPs during imaging. All particles presented a round-shaped morphology (**Figure 5.1A**). However, clear differences of particle structure were observed depending on the quantity of PEG in the polymers. For polymers with 8 %w/w of PEG or less (**Figure 5.1A**), only solid core nanoparticles were observed while for higher PEG contents (> 24 %w/w), a background of loosely aggregated polymer chains was systematically observed.

These first observations suggested a marked difference in structure between low and highly PEGylated NPs. The evolution of NPs size over time was then investigated to corroborate these first results (**Figure 5.1B**). Once again, when PEG content was 8 %w/w or lower, the size of the NPs was stable at 4°C varying less than 10 nm over 3 months. Oppositely, at higher PEG content, a continuous increase of the NPs size with time, ranging from 100 nm to 143 nm, was noticed. The ZP was however found to be stable over the same period of time (**Figure 5.S4**,

Supplementary data) for all the polymers, indicating that no significant change of the NP surface properties such as PEG degrafting from the NP surface has occurred.



**Figure 5.1** Comparison of the dynamics of the NPs structures. A) Representative cryo-TEM images of the different NPs. B) Colloidal stability of NP suspension represented by the evolution of NPs size as a function of storage time at 4°C. C) Fraction of free polymer in the nanosuspensions after dialysis, which does not form NPs, recovered by ultracentrifugation correlated with the rate of Ostwald ripening as a function of PEG proportion in polymers.

To gain more insights into the destabilization mechanism occurring for the highly PEGylated NPs, we quantified the amount of free polymer in each nanosuspension. Indeed, considering the wide range of hydrophobic (PLA) / hydrophilic (PEG) block length ratio of the PLA-*b*-PEG copolymers, we can anticipate that a substantial fraction of the most hydrophilic copolymers might remain soluble in water in equilibrium with the NPs. The fraction of polymer forming particles and the fraction remaining as free chains in solution were therefore recovered after ultracentrifugation, in the pellet and supernatant respectively. As showed in **Figure 5.1C**, in

nanosuspensions produced with 8 %w/w of PEG or less (PLA, PLA-b-PEG1K and PLA-b-PEG2K NPs), only a small fraction of polymer did not form aggregates and remained as free chains (< 7 %w/w). In contrast, when the PEG content in the polymer was superior to 8 %w/w (PLA-b-PEG5K and PLA-b-PEG10K NPs), a significant fraction of free polymer chains in the supernatant could be observed. In these nanosuspensions, the block-copolymer existed in the form of (1) 85 %w/w aggregates and (2) 15 %w/w single polymer chains. The PEG content in the fraction of free polymer chains was significantly higher compared to bulk polymer (63 vs 25 %w/w) explaining their propensity to stay in their unimolecular form. The presence of both aggregates and PLA-*b*-PEG free chains suggests a greater mobility of these chains in the dispersion medium and therefore faster NPs - medium exchange rates. Such high mobility should promote Ostwald ripening of the NPs and therefore mediate their observed instability.<sup>50</sup> The Ostwald ripening rate,  $k$ , was quantified using **Equation 5.5** (Lifshitz-Slyozov-Wagner theory<sup>51-52</sup>) from the size stability data:

$$R^3 - R_0^3 = kt \quad \text{Equation 5.5}$$

where  $R$  and  $R_0$  are the hydrodynamic radii of the particle at time  $t$  and  $t = 0$ , respectively.

It was found that  $k$  drastically increased for highly PEGylated NPs and correlated well with the fraction of free polymer chains in nanosuspension (**Figure 5.1C**). This observation confirmed that a significant Ostwald ripening occurred for these highly PEGylated NPs.

Two different structures were therefore detected depending on the PEG content in polymer. Nanoparticles produced from polymers with low or no PEG content (PLA, PLA-b-PEG1K, PLA-b-PEG2K) exhibit a "solid" or "frozen" behavior (low free polymer content, long term colloidal stability in pure water) whereas highly PEGylated nanoparticles (PLA-b-PEG5K and PLA-b-PEG10K) presented a more dynamic structure similar to polymeric micelles (high free polymer content, low colloidal stability). Interestingly, the present data tend to demonstrate that the transition from solid-like to micelle-like particles with polymer composition is abrupt and similar to already reported data for comb-polymers.<sup>38</sup>

However, these differences in structure did not affect the encapsulation of the active compound due to the strong lipophilic character of the latter ( $\log P = 7.5$ ). Drug loading and drug yield were found independent of the polymer composition (**Table 5.2**). In addition, DSC analysis was

performed to identify the physical state of the drug according to the polymer used. No fusion peak appeared in the DSC thermograms suggesting that cholecalciferol is present in an amorphous state in all the suspensions (**Figure 5.S5**, Supplementary data).

### 5.5.2 Skin penetration of encapsulated active compound is PEG-dependent

Skin penetration of cholecalciferol was performed to evaluate the influence of copolymer composition and NPs structure on the delivery of a lipophilic drug to the skin. It was verified beforehand that less than 10% of cholecalciferol degradation occurred when the formulations are incubated in the conditions of skin penetration tests (37°C in a dark place for 24 hours) (**Figure 5.S6**, **Supplementary data**). Porcine skin was used as the most relevant animal model because of its high structural similarities with human skin<sup>53</sup>. Penetration in both intact and stripped (impaired) skins was investigated to elucidate the role of the skin condition on NPs / skin interactions. Stripped skin was chosen as a basic model for skin presenting impairment of the skin barrier as is the case in some skin pathologies (scratches, diseases, sunburns...). The tape-stripping method allows a highly homogeneous and effective removal of the *stratum corneum* with no substantial alteration of the viable epidermis<sup>54</sup>. On intact skin, NPs were in direct contact with the *stratum corneum*, which is a lipophilic and dense layer of dead cells. On the contrary, on stripped skin, NPs were in contact with the viable epidermis surface, which is a porous and hydrophilic layer of living cells.

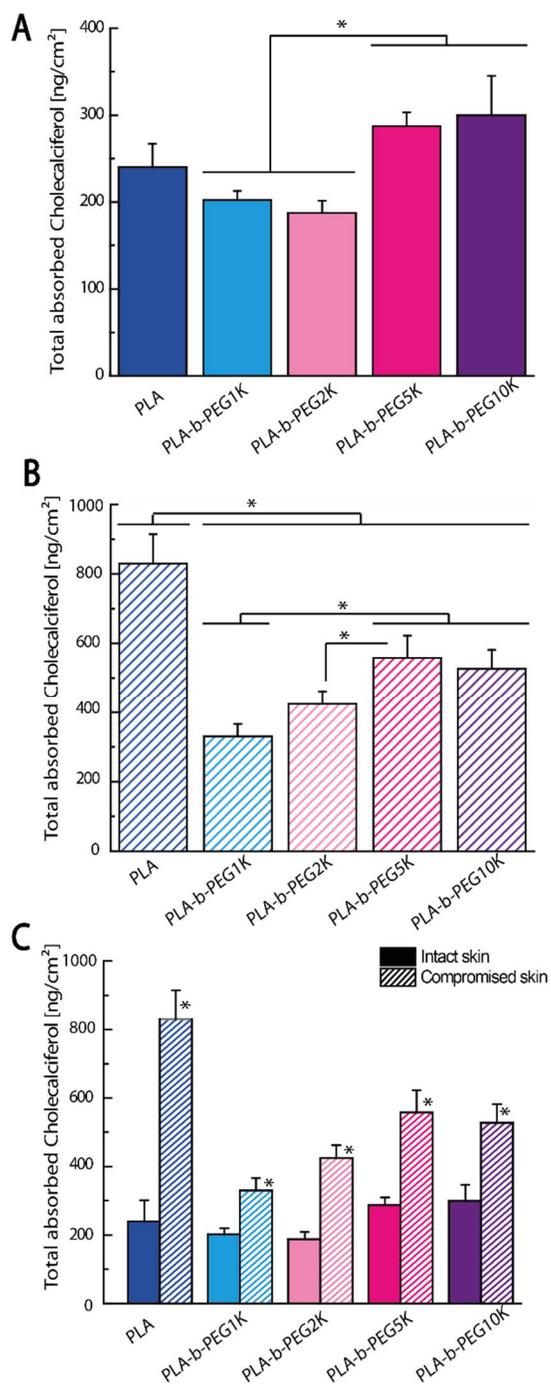
The amount of cholecalciferol in skin and its distribution throughout the skin layers after 24 hours exposure to the NPs formulations are presented in **Figure 5.2A and B**. The results clearly showed that the amount of PEG in the formulation modulated the total cholecalciferol absorption in impaired and to a lesser extent in intact skin.

In intact skin and independently of the NPs formulation, cholecalciferol was poorly absorbed (less than 300 ng/cm<sup>2</sup>, i.e. less than 1% of the applied dose) (**Figure 5.2A** and **Table 5.3**) and accumulated significantly in the *stratum corneum* (up to 200 ng/cm<sup>2</sup>) and, to a lesser extent, in the viable epidermis (up to 100 ng/cm<sup>2</sup>) (**Table 5.3**). Drug absorption in dermis was limited (less than 25 ng/cm<sup>2</sup>) and none of the NPs formulations allowed a quantifiable permeation of the active compound in the receptor medium (**Table 5.3**). Such very low absorption in intact skin is commonly reported for this drug<sup>35,55</sup> and the affinity of cholecalciferol to the lipophilic

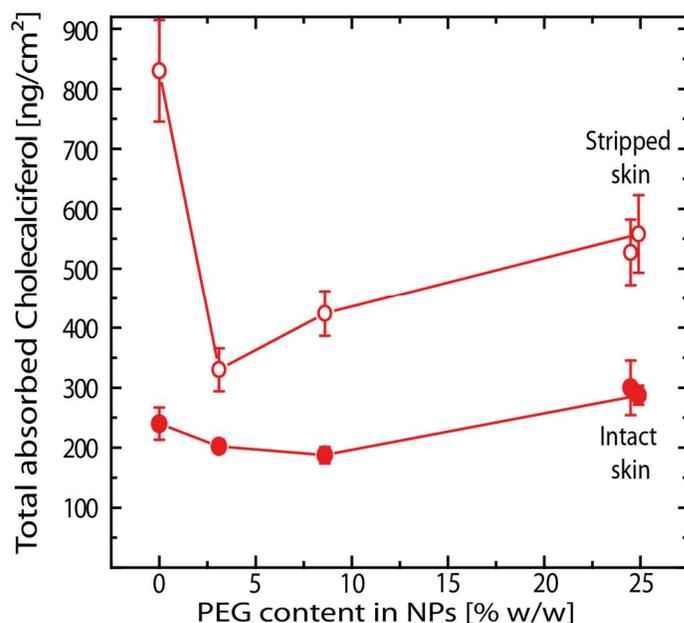
layer of the *stratum corneum* was expected due to the strong hydrophobic character of the drug. These observations were also in line with other reports which showed that polymeric NPs favored the epidermis storage of lipophilic drugs while limiting their permeation in receptor compartment<sup>25,56</sup>. As mentioned, NPs composition had only a slight influence on the total drug absorption into intact skin. Small but significant differences were however found between low and high PEG content NPs formulations. The highest total absorptions of cholecalciferol in skin were observed for high PEG content NPs (PLA-b-PEG5K NPs: 0.29  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and PLA-b-PEG10K NPs: 0.30  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) while the lowest absorption was measured for low PEG content NPs (PLA-b-PEG1K NPs: 0.20  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and PLA-b-PEG2K NPs: 0.19  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (**Figure 5.2A**). PLA NPs allowed a medium skin penetration, but which was not significantly different from PEGylated NPs. The distribution in the skin layers followed the same trends as the total amount absorbed in skin (**Table 5.3**).

On stripped skin, total active compound absorption was significantly increased compared to intact skin for all tested formulations (from 0.3 to 0.8  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) (**Figures 5.2C and Figure 5.3**), as expected due to the impairment of the barrier function<sup>13, 18, 57-58</sup>. The penetration was enhanced in all viable layers of the skin but remained negligible in the receptor compartment (<0.02% of the dose) (**Table 5.3**). Such particles are therefore favorable for topical treatment of skin diseases since, even in impaired skin, they exhibited the highest skin penetration associated with the lowest permeation, allowing therefore to maximize drug efficacy while limiting adverse events<sup>59</sup>. As for intact skin, when considering the PEGylated nanoformulations only, we can also notice that the increase in PEG content in the polymer (from 3.1 to 24.9 %w/w) resulted in a marked increase in drug penetration into stripped skin, ranging from 0.33 to 0.56  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (**Figure 5.2B and Figure 5.3**). A better accumulation in viable epidermis was notably achieved as the PEG content in NPs increased (**Table 5.3**). This penetration increase seems controlled by the PEG content only and not by the PEG chain length since results obtained with PLA-b-PEG5K (24.9% w/w) and PLA-b-PEG10K (24.5% w/w) were identical (**Figure 5.3**). However, and contrary to intact skin, cholecalciferol loaded in PLA NPs displayed a significantly higher absorption in impaired skin compared to all the other NPs formulations ( $p < 0.05$ ) (**Figure 5.2B and Figure 5.3**) due to a better accumulation in both viable epidermis and dermis (**Table 5.3**). Notably, a 2.5-fold difference in drug penetration was found between PLA NPs and PLA-*b*-

PEG1K NPs, which was significantly more pronounced compared to intact skin (1.2-fold). Moreover, the variation of drug penetration from intact to impaired skin was the most important for PLA NPs (+ 247 %) and the least important for PLA-b-PEG1K NPs (+ 72%) (**Figure 5.2C**), indicating that the impairment of the barrier function displayed various influences on drug absorption according to the NPs composition.



**Figure 5.2** Effects of formulation type on total skin absorption of cholecalciferol after 24 h exposure in A) intact, B) stripped pig skin and C) both compared. Applied dose was 35  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Data are given as mean  $\pm$  SEM. Stars show the statistically significant differences according to the Student t-test ( $p < 0.05$ ) for  $n > 7$  independent experiments.



**Figure 5.3** Total cholecalciferol retained in intact and stripped skin as a function of PEG content in NPs. Data are given as mean  $\pm$  SEM.

**Table 5.3** Effects of formulation type on cholecalciferol distribution in skin layers in intact and impaired pig skin after 24 h exposure. Applied dose was  $35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Data are given as mean  $\pm$  SEM.

	PLA NPs ( $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		PLA-b-PEG1K NPs ( $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		PLA-b-PEG2K NPs ( $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		PLA-b-PEG5K NPs ( $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ )		PLA-b-PEG10K NPs ( $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ )	
	<i>Intact skin</i>	<i>Stripped skin</i>	<i>Intact skin</i>	<i>Stripped skin</i>	<i>Intact skin</i>	<i>Stripped skin</i>	<i>Intact skin</i>	<i>Stripped skin</i>	<i>Intact skin</i>	<i>Stripped skin</i>
<i>SC</i>	132 $\pm 16$	-	99 $\pm 12$	-	109 $\pm 16$	-	163 $\pm 12$	-	196 $\pm 31$	-
<i>VE</i>	80 $\pm 15$	567 $\pm 72$	78 $\pm 11$	218 $\pm 31$	58 $\pm 9$	326 $\pm 29$	100 $\pm 14$	426 $\pm 61$	78 $\pm 14$	382 $\pm 76$
<i>D</i>	25 $\pm 2$	258 $\pm 41$	22 $\pm 1$	126 $\pm 19$	16 $\pm 1$	92 $\pm 17$	20 $\pm 5$	127 $\pm 32$	19 $\pm 3$	142 $\pm 41$
<i>Total</i>	237 $\pm 26$	823 $\pm 86$	200 $\pm 11$	344 $\pm 35$	183 $\pm 14$	418 $\pm 37$	283 $\pm 17$	552 $\pm 56$	295 $\pm 43$	525 $\pm 57$

In the light of these results, different trends appeared according to NPs hydrophilic composition. In intact skin, the best cholecalciferol absorption was achieved by NPs

having the most hydrophilic surfaces (PLA-*b*-PEG5000 or PLA-*b*-PEG10000 NPs), even if the differences of penetration between the different NPs formulations were low. In impaired skin, on the contrary, non-PEGylated NPs (PLA NPs) promoted a strong drug deposition. An increasing penetration of the drug was however also found as PEG content increased but was systematically lower than the cholecalciferol amount quantified for PLA NPs. We therefore hypothesized that such differences should arise from different interaction mechanisms of the NPs with the skin layers.

First, an increase of PEG surface coverage at the NPs surface enhanced the penetration of encapsulated cholecalciferol from PEGylated NPs, both in intact and impaired skin. On intact skin, these results are at first sight unexpected considering the lipophilicity of the *stratum corneum* and the high surface hydrophilicity of the highly PEGylated NPs (PLA-*b*-PEG5K and PLA-*b*-PEG10K). However, different hypothesis may explain these results independently of the hydrophilic/lipophilic balance. First, we have shown that PEGylated particles can have a structure of solid NPs or micelle-like particles depending on their PEG content (**Figure 5.1**). As a consequence, the structure of highly PEGylated NPs is more dynamic, and free polymer concentration is significantly higher than weakly PEGylated NPs. These two factors are expected to play an important role in drug penetration. In fact, Deng *et al.* proposed that the deposition of micellar polymeric formulation onto skin provide a better wetting of the skin surface, making the drug carrier readily accessible to the skin <sup>60</sup>. Free highly PEGylated chains in suspensions may also act similarly to permeation enhancers. Conte *et al.* suggested that PEG brush affected the organization of lamellar phase in the intercellular spaces of the *stratum corneum* <sup>61</sup>, which could favor drug penetration. On impaired skin, nanocarriers are deposited on a more hydrophilic structure (viable epidermis). The interactions between highly PEGylated NPs and skin surface seems therefore favored, allowing a better penetration of the drug compared to low PEGylated NPs. In addition, due to their loosely aggregated dynamic structure, it is possible that highly PEGylated NPs were more deformable than no or low PEGylated NPs through possible molecular dynamic reorganization. It was for example reported that PLA-*b*-PEG NPs may deform more than two-fold compared to PLA NPs <sup>62</sup>. Such possible deformation along with their non-aggregation in skin may allow them penetrating deeper

in the intercellular spaces of the skin favoring therefore the penetration of the drug. With respect to this hypothesis, Rancan *et al.* have for example showed that the shrinkage of nanogels in response to thermal trigger allowed them better penetrating human disrupted barrier of skin explants<sup>58</sup>.

On the opposite, non-PEGylated NPs (PLA NPs) exhibited reverse trend since they demonstrated the highest drug absorption into impaired skin amongst all the formulations tested. This trend is curious since these particles are hydrophobic and negatively charged, which may disfavor their affinities with the hydrophilic and negatively surface of impaired skin. It was however already reported that PLA nanoparticles formed aggregates after exposure to human skin explants<sup>28,63</sup>. Such a destabilization may enhance the release of the drug in the skin.

In order to understand more precisely the differences in drug penetration as a function of PEG content in PLA-based NPs formulations, interactions between NPs and some skin components were characterized.

### **5.5.3 Colloidal stability and aggregates adhesion drive the penetration of encapsulated active compounds in non- and weakly PEGylated particles**

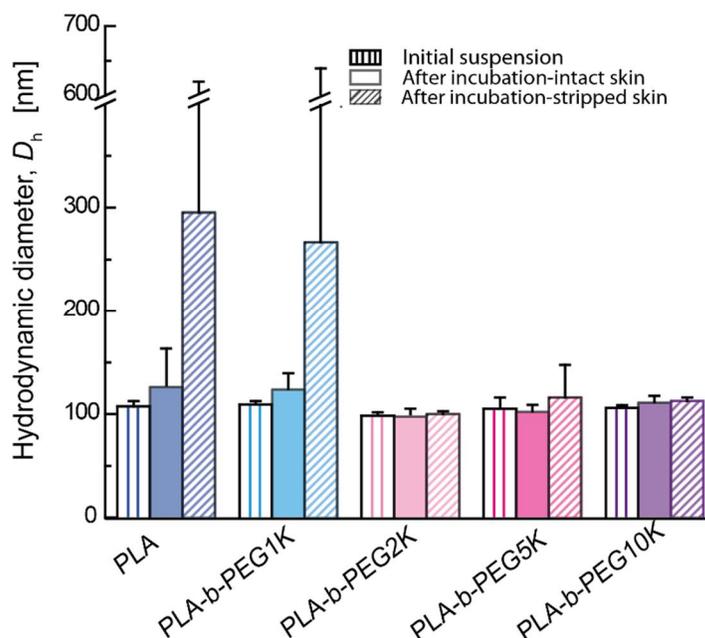
A first key point to understand NPs interaction with skin components is to precisely assess the NPs stability once in contact with the skin surface. As recently pointed out by Mahmoud *et al*<sup>29</sup>, this parameter is usually underestimated when interpreting skin penetration results even though NPs unstabilities may alter the biological effects of the NPs<sup>44, 64-65</sup>. Therefore, the stability of the NPs suspensions in filtered aqueous solutions previously exposed to intact or damaged skin for 24 hours was assessed by DLS. These tests allowed quantifying NPs stability in presence of soluble species such as ions potentially released from skin into the suspension medium.

When immersed in a solution which was conditioned 24 hours with intact skin, all polymeric NPs suspensions showed no variation in hydrodynamic size which indicates excellent colloidal stability (**Figure 5.4**). In contrast, when exposed to solutions conditioned with impaired skin, PLA and PLA-*b*-PEG1K NPs were rapidly destabilized. NPs with higher PEG content

maintained their size over long period of time (24 h at least) indicating robust colloidal stability mostly imparted by steric repulsion between the NPs (**Figure 5.4**). These observations of skin induced aggregation depending of the NPs surface chemistry supported the study of Mahmoud *et al.* which also reported that the skin-induced destabilization of cationic gold nanorods was prevented by the presence of a PEG layer on their surface, providing steric stabilization <sup>29</sup>.

Among all the soluble species released from skin that could potentially destabilize the NPs suspensions, ions are certainly the most abundant ones. Indeed, solutions deposited on impaired skin were in direct contact with the viable epidermis, a layer which contains high level of salt species <sup>66</sup> susceptible to be rapidly released. To confirm this assumption, we measured the osmotic concentration of solutions exposed to intact and stripped skin and compared these values to the critical coagulation concentration (CCC) of each type of NPs measured using NaCl as destabilizing salt. The CCC is the minimal concentration of salt leading to a rapid aggregation of particles <sup>38</sup>. As shown in **Figure 5.S7** (Supplementary data), for PLA and PLA-*b*-PEG1K NPs, CCC was 17 and 40 mM respectively (34 and 80 mOsm/L respectively). Such aggregations arise from a diminution of the electrostatic repulsions between these NPs due to a neutralisation of their surface charges by saline species. In fact, these NPs are negatively charged as demonstrated by their Zeta potential values (-33 and -23 mV respectively). NPs with higher PEG content were found to be stable even in presence of a high concentration of salt (CCC > 2 M NaCl) due to the dense steric layer of PEG chains on the NP surface, as previously reported<sup>38</sup>. These observations were in excellent agreement with osmotic concentration measurements of solutions exposed to skin surface. Osmolarity values measured on impaired skin were significantly higher ( $116 \pm 41$  mOsm/L) compared to intact skin ( $48 \pm 52$  mOsm/L) as expected. Since osmotic concentration values obtained from impaired skin were significantly higher than the values of the osmotic concentration at the CCC of PLA and PLA-*b*-PEG1K NPs, these NPs aggregated. These observations demonstrated that ionic species released from impaired skin trigger rapid aggregation of weakly PEGylated NPs in suspension when deposited on skin and therefore may accelerate their sedimentation onto skin surface. On the contrary, due to the dense PEG layer on their surface, PLA-*b*-PEG2K PLA-*b*-PEG5K PLA-*b*-PEG10K were stable in suspension when deposited on impaired skin.

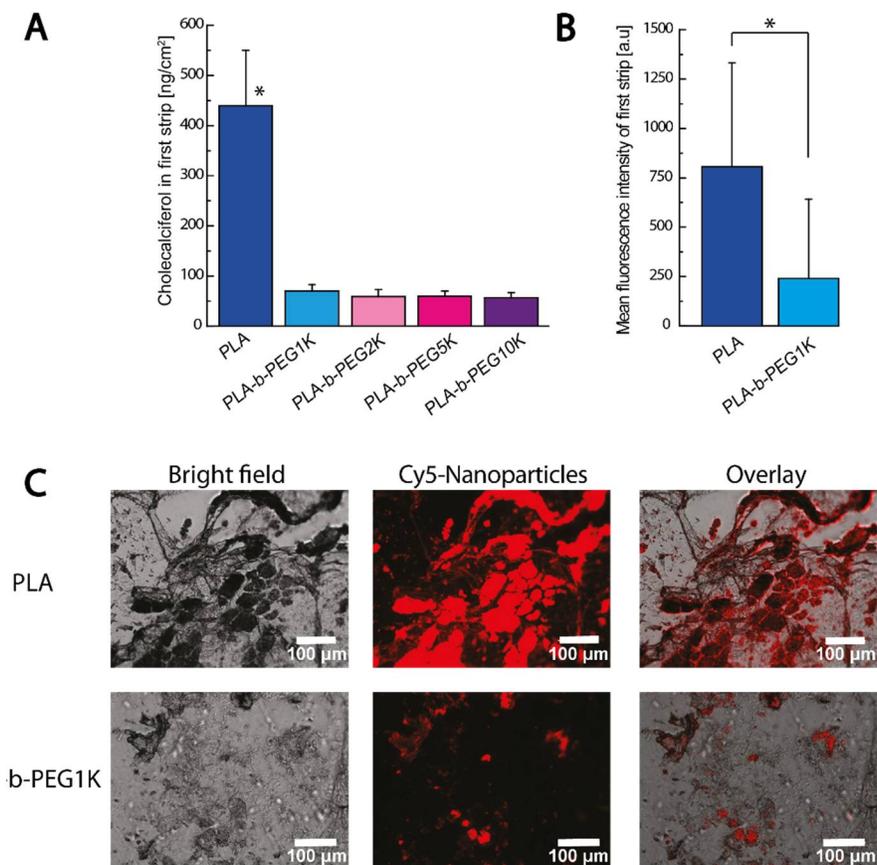
Nonetheless, NPs aggregation only does not explain the drug penetration results reported in **Figure 5.2**. Indeed, non-PEGylated PLA NPs presented a 2.3-fold higher penetration of cholecalciferol in impaired skin compared to PLA-*b*-PEG1K NPs (**Figures 5.2 and 5.3**), even though both types of formulation are expected to form aggregates when in contact to impaired skin. Drug penetration appears therefore to rather depend on the adhesion of these aggregates to the skin surface.



**Figure 5.4** NPs hydrodynamic diameter before and after exposure to intact skin-conditioned solution or impaired skin-conditioned solution. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation.

To confirm this hypothesis, the affinity of the aggregates to the surface of impaired skin was investigated by analyzing the first adhesive tape strip usually performed to remove the last residues of formulation onto skin surface. A strong accumulation of drug from PLA NPs ( $0.44 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) on damaged skin was found on the tape strip. In contrast, such accumulation was not observed for all the other NPs ( $< 0.08 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) even for highly PEGylated NPs which have also shown high penetration (**Figure 5.5A**). To determine if this drug accumulation stemmed from a release process from aggregates in solution or from sedimentation of the NPs on the skin surface, we repeated the experiment with PLA and PLA-*b*-PEG1K NPs covalently labelled with fluorescent dye cyanine 5 (Cy5) and measured the mean fluorescence intensity on

the first strip. The average mean fluorescence intensity of three experiments was  $807 \pm 526$  a.u for PLA NPs and  $243 \pm 399$  a.u for PLA-*b*-PEG1K NPs (**Figure 5.5B**) confirming the significant deposition and adhesion of PLA aggregates on the first strip. In addition, we confirmed by fluorescence microscopy that both PLA and PLA-*b*-PEG1K NPs were indeed unstable and formed aggregates upon incubation with stripped skin (**Figure 5.5C**). However, a stronger build-up of micron-sized PLA NPs aggregates was clearly observed on the strips but were absent for PLA-*b*-PEG1K NPs (**Figure 5.5C**). These observations showed that PLA-*b*-PEG1K NPs formed aggregates when deposited on impaired skin but they staid in suspension and did not adhere to the skin surface, conversely to PLA aggregates. As shown in **Figure 5.5A** and B, the correlation between NPs adherence and drug accumulation at skin surface test is very strong, confirming that interactions between NPs and skin surface play an important role in the drug penetration. The strong penetration of the drug from PLA NPs in impaired skin is therefore the result of the strong adhesion of NPs aggregates formed *in situ* upon exposure to released ions. In fact, such an aggregates adhesion was responsible for a higher local concentration of drug on skin surface, promoting therefore the penetration. Moreover, it is likely that the destabilization of the NPs promotes the release of the drug from the polymeric carrier into the skin.



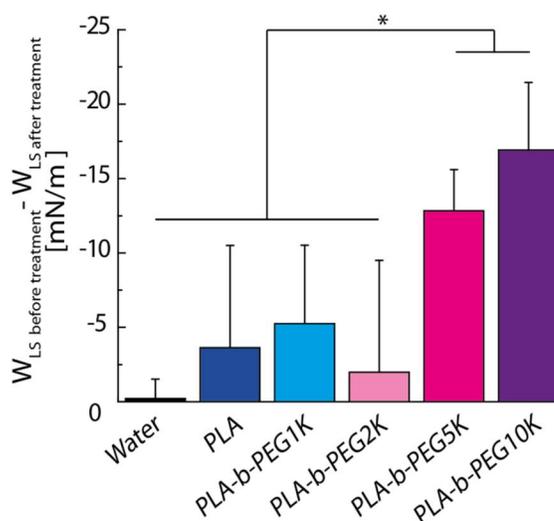
**Figure 5.5** NPs adhesion/sedimentation onto damaged skin surface. A) Cholecalciferol quantity recovered in the first strip of impaired skin after treatment. B) Mean fluorescence intensities measured on the first strip relative to the fluorescent NPs aggregated on skin. C) Representative microscopy images of the first strip of revealing the presence of PLA polymer aggregates on damaged skin surface. Data in A) and B) are given as mean  $\pm$  standard deviation.

#### 5.5.4 Affinity between highly PEGylated NPs and skin surface lipids mediate active compound penetration

Since highly PEGylated particles do not suffer from salt-induced colloidal aggregation, their capacity to increase drug penetration with the PEG content must be the result of their dynamic amphiphilic structure and free polymer presence. These two factors are expected to play an important role in the resulting affinity of the NPs with the skin surface, and especially with skin lipids.

We first try to detect any changes in the lipid organization of intact skin samples after exposure to the different nanoformulations using FTIR<sup>67-68</sup>. We found that the nanosuspensions were too

diluted (1.2mg/mL of NPs), to be able to cause any significant changes in skin structure. At this concentration, even sodium dodecyl sulfate did not induce any detectable alterations of lipid organization (data not shown). We therefore used a mica surface coated with ceramides to mimic the skin surface and characterize its interaction with the different nanosuspensions by measuring the Liquid/Solid work of adhesion,  $W_{LS}$ , before and after 24 h of treatment with the NPs. As shown in **Figure 5.6**, treatment with pure water had no effect on the interfacial properties of the ceramide film since the difference in work of adhesion before and after treatment was close to zero. A substantial difference of work of adhesion before and after the treatment was observable only for highly PEGylated NPs (-13 mN/m for PLA-b-PEG5K NPs and -17 mN/m for PLA-b-PEG10K NPs). The variation of work of adhesion was significantly smaller for weakly PEGylated NPs (< 5 mN/m). These results indicate a strong change in surface hydrophobicity only after treatment with highly PEGylated NPs suspensions. These interfacial changes are the concomitant result of ceramide dissolution into the NPs suspension (an effect similar to detergency) and the adsorption of micelle-like aggregates and free polymer chains on the ceramides film.



**Figure 5.6** Difference of work of adhesion of a water droplet on a ceramide surface before and after treatment with NPs suspension. Negative values indicate an increase of surface hydrophilicity. Data are given as mean  $\pm$  standard deviation.

Thanks to their dynamic structure allowing i) a better wetting of the skin surface and ii) a possible alteration of the lipid packing in the skin and which counteracted the unfavorable interactions with the lipophilic *stratum corneum*, the micelle-like highly PEGylated NPs promote the skin penetration of the drug in intact skin compared to the solid weakly PEGylated NPs. Such observations were in line with Deng *et al.* conclusions, who showed that Y-shaped PEG-PCL<sub>2</sub> micelles disturbed significantly the skin barrier<sup>60</sup>. As previously hypothesized<sup>33</sup>, we can also expect that highly PEGylated micelle-like NPs disassembled upon contact with the skin and diffuse in their molecular state, as liposome does<sup>69</sup>. An experimental evidence of the disaggregation tendency of the micelle-like NPs was provided by mixing the NPs and oleth-20 surfactant (**Figure 5.S8**, Supplementary data). We observed a complete disassembly of micelle-like NPs in presence of surfactant. On the contrary, the solid NPs remained stable and were insensitive to the presence of the surfactant.

### 5.5.5 Summary of the mechanisms

The present study provides mechanistic insights on the interactions between NPs and skin layers.

In intact skin, we showed that cholecalciferol penetration only slightly depends of the NPs PEG content. The penetration of the active compound was therefore mostly controlled by its release rate from the NPs and by the affinity of the active compound to the different skin layers. The micelle-like structure of highly PEGylated NPs and the presence of free polymer chains in the medium, facilitated nonetheless the wetting of the skin surface, favoring therefore the penetration of the encapsulated compound compared to weakly PEGylated NPs. A possible disaggregation of highly PEGylated NPs into the skin may also occurred.

In impaired skin, the role of NPs composition on the penetration of the active compound was much more pronounced. In addition to a weaker barrier function which favor drug skin penetration, impairment of the *stratum corneum* triggered the release of ionic species able to destabilize non- or poorly PEGylated particles. The sedimentation and the adhesion of the non-PEGylated aggregates favored therefore a strong accumulation of the drug on the skin-medium interface. Adhesion of NPs aggregates with impaired skin surface was however significantly weaker for poorly PEGylated particles, due to a reminiscent effect of the antifouling properties

of grafted PEG chains. Hydrophilic highly PEGylated particles, which resisted skin colloidal aggregation, are likely to promote drug penetration via preferential affinities with the hydrophilic layer of viable epidermis. The possible penetration of intact NPs through deformation or their disassembly in impaired skin needs further investigations. The hydrophilic dynamic structure was nonetheless less effective than NPs aggregation/adhesion mechanism in facilitating lipophilic drug penetration in impaired skin.

## **5.6 Conclusion**

The present analysis indicates that delivery of a highly lipophilic active compound to the skin via NPs encapsulation involves extremely subtle mechanisms of skin interactions, the prevalence of which depends on the NPs composition and on the physical state of the skin. This last conclusion suggests an interesting avenue to design drug delivery systems able to efficiently tune their penetration capacity accordingly to the pathological state of the skin.

## **Acknowledgments**

AL is grateful to the Faculty of Pharmacy of Université de Montréal for their financial support and to the Région Auvergne-Rhône-Alpes for their mobility grant (Explo'RA Doc) and. JF is grateful to the Arthritis Society and the University of Montreal for PhD grants. AGA is supported by the TransMEDTech Institute. PH is thankful for the financial support of FRQNT. XB acknowledges the financial support from the Canada Research Chair Program and NSERC.

Technical assistance of Victor Badescu in polymer synthesis and NPs optimisation is acknowledged. Alexandre Melkoumov is acknowledged for the synthesis of the fluorophore Cy5-COOH. TEM imaging was performed with the help of Jean-Philippe Massé. Authors declare no competing interest.

## **Supplementary Data**

Supplementary data to this article (Polymer synthesis and characterizations protocols, Zeta potential stability studies, DSC analysis, drug degradation studies, NPs colloidal stability in saline and surfactant medium) can be found in Annexe B.

## 5.7 Annexe B: Supplementary data de l'article

### 5.7.1 Materials

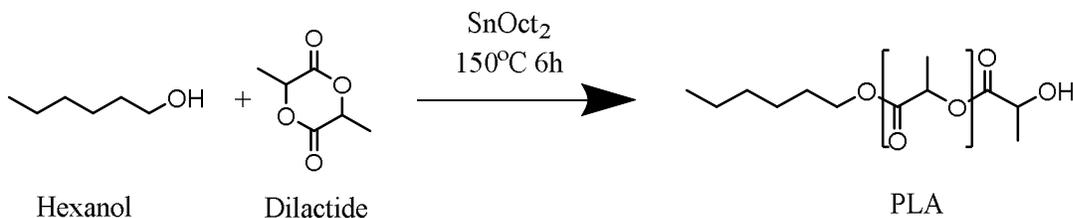
Toluene, methanol, dichloromethane (DCM), hexane, analytical grade tetrahydrofurane (THF), anhydrous sodium sulfate and sodium chloride (NaCl) were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Hexanol was from Laboratoires MAT (Québec, Canada). D,L-Lactide (3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2,5-dione), poly(ethylene glycol) monomethyl ether (mPEG) (1, 2, 5 and 10 kg/mol), stannous 2-ethylhexanoate ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 4'-Dimethylaminopyridine (DMAP), deuterated chloroform, anhydrous DCM and oleth-20 (Brij®O20) were supplied by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Solvents were used as received. Dilactide was purified by recrystallization in toluene and dried overnight in vacuum before use. mPEG was dried over anhydrous sodium sulfate in DCM and dried overnight in vacuum before use.

### 5.7.2 Polymer Synthesis and Characterization

#### 5.7.2.1 PLA synthesis

PLA polymer was synthesized in bulk by ring opening polymerization (ROP) of D,L-dilactide with hexanol as initiator and  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  as catalyst, as previously reported<sup>38</sup> (**Figure 5.S1**). D,L-dilactide, hexanol (ratio 1 : 250 lactic acid (LA) units,  $4.10^{-3}$  eq. LA) and  $\text{Sn}(\text{Oct})_2$  ( $2.10^{-4}$  eq. AL) were weighted into a round double neck glass flask equipped with a stirring blade. The flask was stirred at 100 rpm and heated at 150°C for 6 hours and kept under argon atmosphere. At the end of the reaction, the mixture was cooled down to room temperature and the polymer was dissolved in DCM. To remove unreacted D,L-dilactide and oligomers, the organic phase was washed twice with distilled water in a separating funnel and dried over anhydrous sodium sulfate. Polymer was finally precipitated twice in hexane and dried over vacuum 48 h prior analyses.

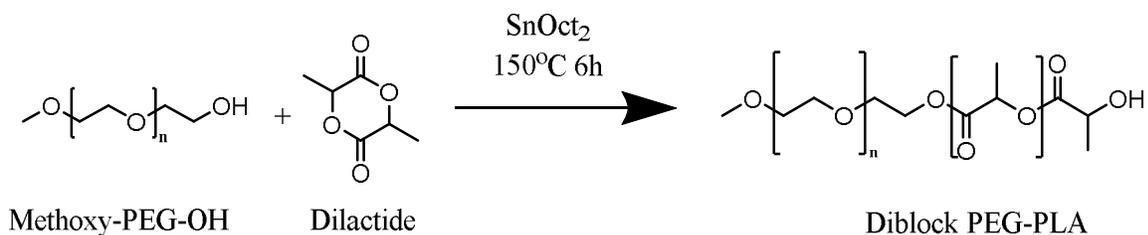
*NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.3–1.5 (m, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 5.2 (m, 1H, CH).*



**Figure 5.S1** PLA synthesis route

### 5.7.2.2 PLA-b-PEG diblock synthesis

Similarly, PEG-*b*-PLA polymers were synthesized by ROP using Sn(Oct)<sub>2</sub> as the catalyst. Briefly, methoxyPEG-OH of different molecular weights (1, 2, 5, 10 kDa) were substituted to hexanol for the macroinitiation of PLA chains elongation (ratio 1 : 250 LA units, 4.10<sup>-3</sup> eq. LA) (**Figure 5.S2**). After a 6 h reaction at 150°C, the reaction mass was dissolved in DCM. The organic phase was washed twice with water to remove unreacted D,L-dilactide and oligomers and dried over anhydrous sodium sulfate. Polymer was finally precipitated twice in cold methanol to remove unreacted mPEG chains. The diblock polymer was collected with a Buchner funnel and dried over vacuum 48 h prior analyses.

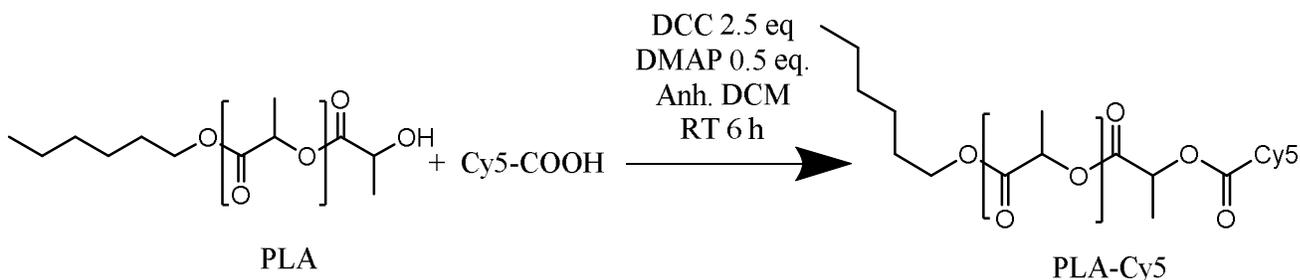


**Figure 5.S2** PEG-*b*-PLA synthesis route (n=22, 45, 114 or 228)

*NMR* (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  1.3–1.5 (*m*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.38 (*s*, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.65 (*m*, 2H), 5.2 (*m*, 1H, CH).

### 5.7.2.3 Fluorescent polymer PLA-Cy5

Cyanine 5-COOH (Cy5) was synthesized in our laboratory according to a previously published procedure<sup>70</sup>. Cy5 (2.5 eq, 18 mg, 3.5×10<sup>-5</sup> mol), DMAP (0.5 eq, ~ 1.2 mg, 0.7×10<sup>-5</sup> mol), DCC (2.5 eq, 35  $\mu$ L, 3.5×10<sup>-5</sup> mol) were introduced in a dried round bottomed flask filled with 5 mL of anhydrous DCM. The solution was left 15 min under argon bubbling and mild stirring. PLA polymer (1 eq, 0.5 g, 1.4×10<sup>-5</sup> mol of OH chain ends) was then added to the reaction medium. The reaction was left at room temperature for 6 h (**Figure 5.S3**). The fluorescent polymer was purified by repetitive precipitations in cold methanol, until a colorless methanol phase was obtained. Polymer was finally dried over vacuum for 48 h.



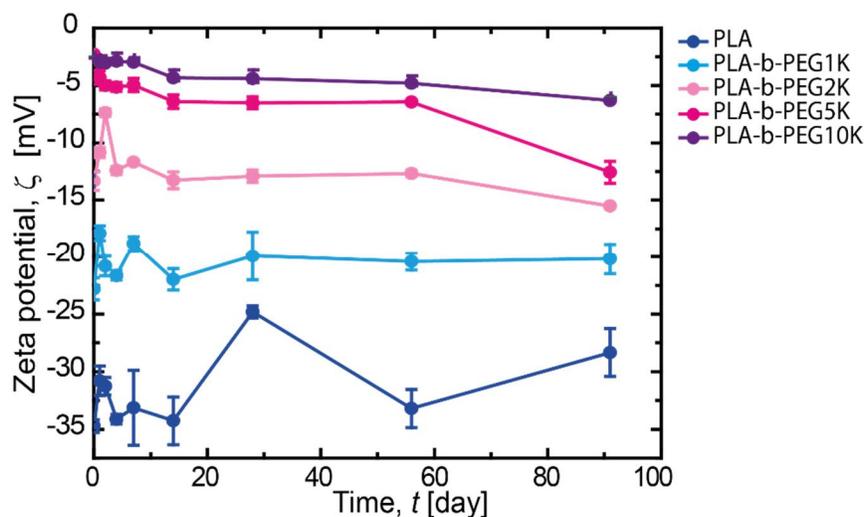
**Figure 5.S3** PLA-Cy5 synthesis route

#### 5.7.2.4 Polymer Characterization

$^1\text{H}$  NMR analyses were performed on a Bruker Advanced 400 MHz spectrometer (Bruker, Germany) and analyzed using MestRe-C® software. Samples were dissolved in  $\text{CDCl}_3$ . The average molecular weights by weight ( $M_w$ ), by number ( $M_n$ ) and the polydispersity index (PDI) of the polymers were obtained by gel permeation chromatography in tetrahydrofuran (THF). A Breeze® system from Waters (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipped with a 717 plus autosampler, a 1525 Binary HPLC pump, 3 consecutive GPC columns (Phenogel 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA) and a refractive index detector, (Waters Corp., Milford, MA, USA) was used. The columns temperature was set at  $35^\circ\text{C}$  and the THF flow rate at 1 mL/min. Linear polystyrene with different molecular weights (ranging from  $M_w = 600$  to 400,000 g/mol) were used as calibration standards.

#### 5.7.3 Colloidal Stability: evolution of zeta potential

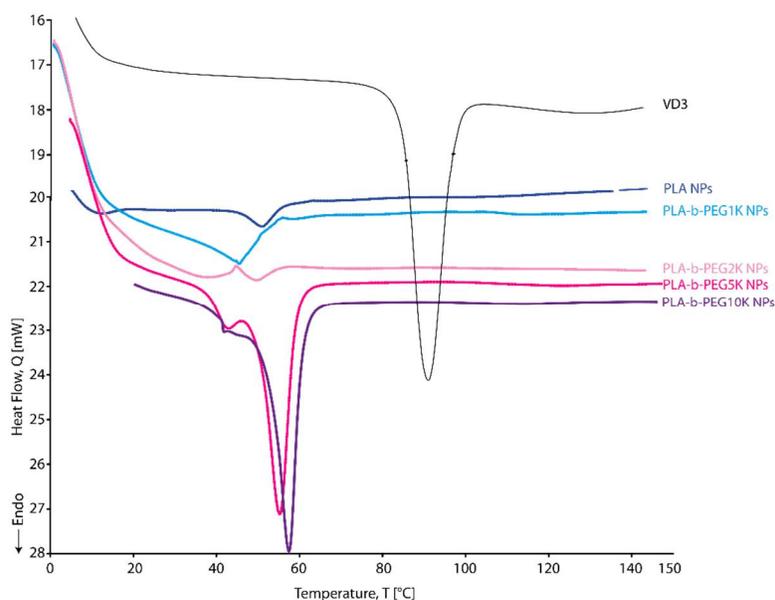
The colloidal stability of all nanoparticles in aqueous suspensions was investigated by monitoring the zeta potential of the particles stocked at  $4^\circ\text{C}$  by DLS on a Malvern Zetasizer NanoSeries (Malvern, Worcester, U.K.)



**Figure 5.S4** Colloidal stability of NP suspension represented by the evolution of the Zeta Potential of NPs as a function of storage time at 4°C.

#### 5.7.4 Differential scanning calorimetry

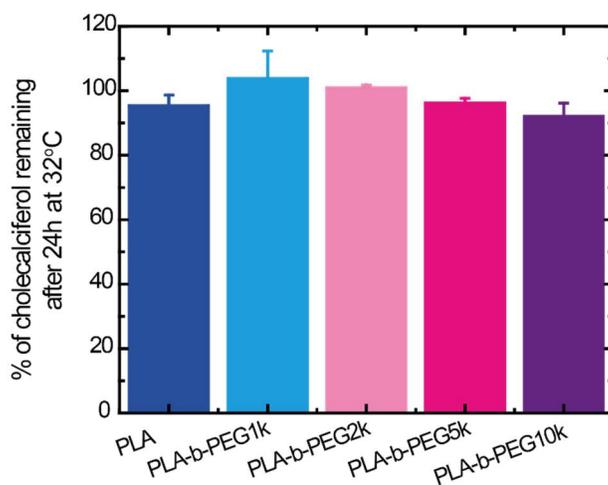
The state of the drug in the different nanoparticle formulations was characterized by DSC (DSC 4000, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Weighed samples freeze-dried NPs were sealed in crimped aluminium pans and were heated from 10 to 150°C at a rate of 20°C/min. The purge gas was purified nitrogen.



**Figure 5.S5** DSC curves of cholecalciferol (VD3) and VD3-loaded polymeric NPs.

### 5.7.5 Drug-loaded NP degradation study

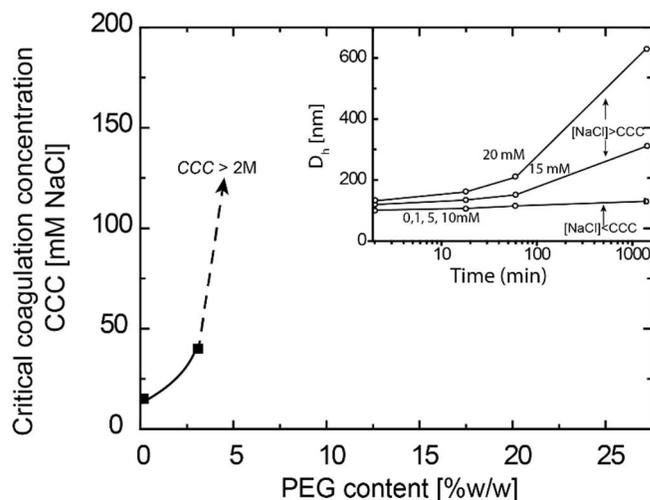
Suspensions of nanoparticles loaded with both cholecalciferol and BHT were placed into amber glass vial and incubated at 32°C in a water bath. At various exposure times, 100 µL of nanosuspensions were withdrawn, dissolved in 900 µL of acetonitrile and analyzed by HPLC (method described in the article, Material & Methods, paragraph 5) to determine the drug content. Experiments were performed in triplicate.



**Figure 5.S6** Percentage of the remaining dose of cholecalciferol after 24 hours of incubation protected from light at 32°C (n=3).

### 5.7.6 NPs colloidal stability in saline

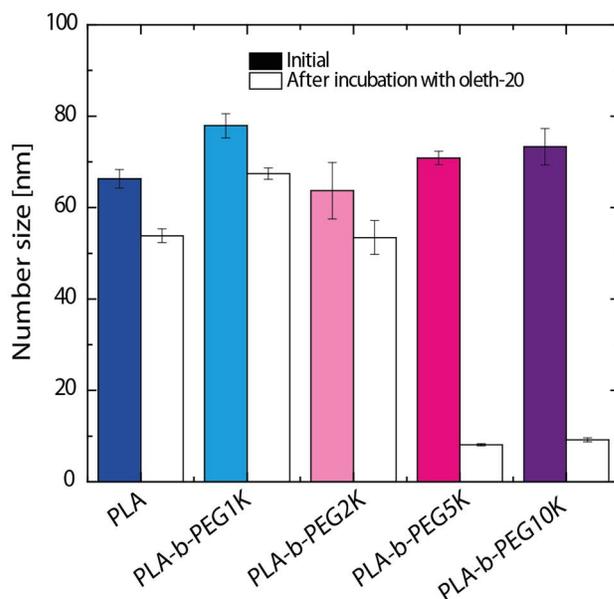
The colloidal stability of the NPs was evaluated in NaCl solutions, from 5 mM to 2 M. The concentration of the NPs in the saline was 1.2 mg/mL. The critical coagulation concentration (CCC) of saline was determined by following the NPs aggregation by DLS on a Malvern Zetasizer NanoSeries (Malvern, Worcester, U.K.). The particle size was immediately measured for 15 min at 2 min intervals (three measurements of four runs at 25 °C) and after 1 and 24 hours.



**Figure 5.S7** Critical concentration of NaCl solution needed for the aggregation of NPs suspension, as determined by DLS. Inset: Aggregation kinetics of PLA NPs in presence of increasing NaCl concentrations as measured by DLS.

### 5.7.7 NPs colloidal stability in a surfactant medium

The colloidal stability of the NP was evaluated when diluted in Oleth-20 aqueous solution. NPs concentration was 0.1 mg/mL and Oleth-20 concentration was 5 mg/mL. The NPs size was determined by DLS on a Malvern Zetasizer NanoSeries (Malvern, Worcester, U.K.) before and after dilution in surfactant solution. Measurements were done in triplicate.



**Figure 5.S8** NPs size before and after contact with Oleth-20 surfactant.

## 5.8 Conclusion générale du chapitre V

### Points Clés

Deux points essentiels d'interactions peau/NPs ont été mis en évidence, permettant d'éclaircir certains aspects de la pénétration cutanée liée aux NPs, en fonction de leur composition hydrophile :

#### **La composition de la peau a une influence essentielle sur la structure des NPs, en solution colloïdale et au contact de la peau**

- La peau, si abimée, libère des quantités non négligeables d'espèces ioniques (>100 mOsm/L) capables de faire agréger les NPs dépendamment de leur surface.
- Les NPs négativement chargées, de PLA seul ou faiblement PEGylées (<3,1 %<sub>p/p</sub> de PEG), sont déstabilisées au contact de la peau et forment des macro-agrégats, contrairement aux NPs neutres plus fortement PEGylées (>8,6 %<sub>p/p</sub> de PEG).
- La sédimentation/adhésion des agrégats de PLA sur la peau peut favoriser l'absorption cutanée, au contraire des agrégats de NPs faiblement PEGylées dont la sédimentation/adhésion sur la peau est défavorisée (2,5 fois plus d'absorption cutanée sur peau lésée à partir des NPs de PLA en comparaison aux NPs peu PEGylées de PLA-*b*-PEG1K)

#### **La dynamique de la structure des NPs et le caractère amphiphile joue un rôle sur la peau et notamment les lipides**

- Les particules les plus riches en composition hydrophile, donc plus dynamiques, peuvent interagir avec les lipides de la peau, favorisant une meilleure mouillabilité de la surface de la peau et une possible désorganisation de la structure lipidique de la peau, au contraire des particules peu ou non PEGylées. Ces effets peuvent être responsables de la meilleure absorption cutanée sur peau intacte à partir des NPs très PEGylées en comparaison à celles peu PEGylées (jusqu'à 1,5 fois plus d'absorption sur peau intacte à partir des NPs très PEGylées en comparaison aux NPs peu PEGylées)

➔ **L'agrégation et sédimentation** des NPs sur la peau, tout comme des **interactions avec les lipides**, ont été définies comme différents facteurs pouvant améliorer la pénétration cutanée d'une molécule lipophile par les NPs.

➡ L'influence de l'**état pathologique de la peau** à traiter est à prendre en compte lors du développement de formulations nanoparticulaires topiques ou transdermiques.

## Références bibliographiques Chapitre V

- (1) Prausnitz, M. R.; Langer, R. Transdermal drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (11), 1261-1268
- (2) Elias, P. M. Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 44s-49s
- (3) Bolzinger, M. A.; Briançon, S.; Chevalier, Y. Nanoparticles through the skin: managing conflicting results of inorganic and organic particles in cosmetics and pharmaceuticals. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2011**, *3* (5), 463-478
- (4) Papakostas, D.; Rancan, F.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res* **2011**, *303* (8), 533-50
- (5) Knorr, F.; Lademann, J.; Patzelt, A.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Follicular transport route – Research progress and future perspectives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2009**, *71* (2), 173-180
- (6) Baroli, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: fiction or reality? *J. Pharm. Sci.* **2010**, *99* (1), 21-50
- (7) Elias, P. M.; Steinhoff, M. “Outside-to-Inside” (and Now Back to “Outside”) Pathogenic Mechanisms in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **2008**, *128* (5), 1067-1070
- (8) Griffiths, C. E.; Barker, J. N. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *The Lancet* **2007**, *370* (9583), 263-271
- (9) Marukian, N. V.; Choate, K. A. Recent advances in understanding ichthyosis pathogenesis. *F1000Res* **2016**, *5*, F1000 Faculty Rev-1497
- (10) Harpin, V. A.; Rutter, N. Barrier properties of the newborn infant's skin. *J. Pediatr.* **1983**, *102* (3), 419-425
- (11) Döge, N.; Hönzke, S.; Schumacher, F.; Balzus, B.; Colombo, M.; Hadam, S.; Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Schäfer-Korting, M.; Schindler, A.; Rühl, E.; Skov, P. S.; Church, M. K.; Hedtrich, S.; Kleuser, B.; Bodmeier, R.; Vogt, A. Ethyl cellulose nanocarriers and nanocrystals differentially deliver dexamethasone into intact, tape-stripped or sodium lauryl sulfate-exposed ex vivo human skin - assessment by intradermal microdialysis and extraction from the different skin layers. *J. Controlled Release* **2016**, *242*, 25-34
- (12) Abdel-Mottaleb, M. M.; Moulari, B.; Beduneau, A.; Pellequer, Y.; Lamprecht, A. Surface-charge-dependent nanoparticles accumulation in inflamed skin. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (11), 4231-9
- (13) Jensen, L. B.; Petersson, K.; Nielsen, H. M. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (1), 68-75
- (14) Tsai, J.-C.; Sheu, H.-M.; Hung, P.-L.; Cheng, C.-L. Effect of barrier disruption by acetone treatment on the permeability of compounds with various lipophilicities: Implications for the permeability of compromised skin. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90* (9), 1242-1254
- (15) Alnasif, N.; Zoschke, C.; Fleige, E.; Brodewolf, R.; Boreham, A.; Rühl, E.; Eckl, K.-M.; Merk, H.-F.; Hennies, H. C.; Alexiev, U.; Haag, R.; Kuchler, S.; Schäfer-Korting, M. Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core–multishell nanotransporters. *J. Controlled Release* **2014**, *185*, 45-50
- (16) Rancan, F.; Giulbudagian, M.; Jurisch, J.; Blume-Peytavi, U.; Calderón, M.; Vogt, A. Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, *116*, 4-11
- (17) Štecová, J.; Mehnert, W.; Blaschke, T.; Kleuser, B.; Sivaramakrishnan, R.; Zouboulis, C. C.; Seltmann, H.; Korting, H. C.; Kramer, K. D.; Schäfer-Korting, M. Cyproterone Acetate Loading to Lipid Nanoparticles for Topical Acne Treatment: Particle Characterisation and Skin Uptake. *Pharm. Res.* **2007**, *24* (5), 991-1000
- (18) Boakye, C. H. A.; Patel, K.; Singh, M. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. *Int. J. Pharm.* **2015**, *489* (1), 106-116

- (19) Vogt, A.; Combadiere, B.; Hadam, S.; Stieler, K. M.; Lademann, J.; Schaefer, H.; Aufran, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U. 40[thinsp]nm, but not 750 or 1,500[thinsp]nm, Nanoparticles Enter Epidermal CD1a+ Cells after Transcutaneous Application on Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126* (6), 1316-1322
- (20) Shim, J.; Seok Kang, H.; Park, W. S.; Han, S. H.; Kim, J.; Chang, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *97* (3), 477-84
- (21) Honeywell-Nguyen, P. L.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* **2004**, *123* (5), 902-910
- (22) Cevc, G.; Chopra, A. Deformable (Transfersome®) vesicles for improved drug delivery into and through the skin. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Springer: 2016; pp 39-59.
- (23) Fernandes, R.; Smyth, N. R.; Muskens, O. L.; Nitti, S.; Heuer-Jungemann, A.; Ardern-Jones, M. R.; Kanaras, A. G. Interactions of skin with gold nanoparticles of different surface charge, shape, and functionality. *Small* **2015**, *11* (6), 713-721
- (24) Tak, Y. K.; Pal, S.; Naoghare, P. K.; Rangasamy, S.; Song, J. M. Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Sci. Rep.* **2015**, *5*,
- (25) Laredj-Bouezg, F.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Rovère, M.-R.; Smatti, B.; Chevalier, Y. Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). *Int. J. Pharm.* **2015**, *496* (2), 1034-1046
- (26) Kohli, A. K.; Alpar, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. *Int. J. Pharm.* **2004**, *275* (1-2), 13-7
- (27) Wu, X.; Landfester, K.; Musyanovych, A.; Guy, R. H. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2010**, *23* (3), 117-123
- (28) Rancan, F.; Todorova, A.; Hadam, S.; Papakostas, D.; Luciani, E.; Graf, C.; Gernert, U.; Rühl, E.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Stability of polylactic acid particles and release of fluorochromes upon topical application on human skin explants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80* (1), 76-84
- (29) Mahmoud, N. N.; Al-Qaoud, K. M.; Al-Bakri, A. G.; Alkilany, A. M.; Khalil, E. A. Colloidal stability of gold nanorod solution upon exposure to excised human skin: Effect of surface chemistry and protein adsorption. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *75*, 223-231
- (30) Mahmoud, N. N.; Alkilany, A. M.; Dietrich, D.; Karst, U.; Al-Bakri, A. G.; Khalil, E. A. Preferential accumulation of gold nanorods into human skin hair follicles: Effect of nanoparticle surface chemistry. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *503* (Supplement C), 95-102
- (31) Hsiao, P. F.; Peng, S.; Tang, T.-C.; Lin, S.-Y.; Tsai, H.-C. Enhancing the in vivo transdermal delivery of gold nanoparticles using poly(ethylene glycol) and its oleylamine conjugate. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 1867-1878
- (32) Bachhav, Y.; Mondon, K.; Kalia, Y.; Gurny, R.; Möller, M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. *J. Controlled Release* **2011**, *153* (2), 126-132
- (33) Lapteva, M.; Mondon, K.; Moller, M.; Gurny, R.; Kalia, Y. N. Polymeric micelle nanocarriers for the cutaneous delivery of tacrolimus: a targeted approach for the treatment of psoriasis. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (9), 2989-3001
- (34) Kilfoyle, B. E.; Sheihet, L.; Zhang, Z.; Laohoo, M.; Kohn, J.; Michniak-Kohn, B. B. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. *J. Controlled Release* **2012**, *163* (1), 18-24
- (35) Ramezanli, T.; Kilfoyle, B. E.; Zhang, Z.; Michniak-Kohn, B. B. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516* (1), 196-203
- (36) Lalloz, A.; Bolzinger, M.-A.; Faivre, J.; Latreille, P.-L.; Garcia Ac, A.; Rakotovo, C.; Rabanel, J.-M.; Hildgen, P.; Banquy, X.; Briçon, S. Effect of surface chemistry of polymeric nanoparticles on cutaneous penetration of cholecalciferol. *Int. J. Pharm.* **2018**, *553* (1), 120-131

- (37) Han, J.; Zhu, Z.; Qian, H.; Wohl, A. R.; Beaman, C. J.; Hoye, T. R.; Macosko, C. W. A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation. *J. Pharm. Sci.* **2012**, *101* (10), 4018-4023
- (38) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG–PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10374-10385
- (39) OECD. *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies*, OECD Publishing.
- (40) Tsai, J.-C.; Shen, L.-C.; Sheu, H.-M.; Lu, C.-C. Tape stripping and sodium dodecyl sulfate treatment increase the molecular weight cutoff of polyethylene glycol penetration across murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* **2003**, *295* (4), 169-174
- (41) Dey, S.; Rothe, H.; Page, L.; O'connor, R.; Farahmand, S.; Toner, F.; Marsh, R.; Wehmeyer, K.; Zhou, S. An in vitro Skin Penetration Model for Compromised Skin: Estimating Penetration of Polyethylene Glycol [14C]-PEG-7 Phosphate. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2014**, *28* (1), 12-21
- (42) Almouazen, E.; Bourgeois, S.; Jordheim, L. P.; Fessi, H.; Briançon, S. Nano-encapsulation of vitamin D3 active metabolites for application in chemotherapy: formulation study and in vitro evaluation. *Pharm. Res.* **2013**, *30* (4), 1137-1146
- (43) Labouta, H. I.; Schneider, M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (1), 39-54
- (44) Rancan, F.; Gao, Q.; Graf, C.; Troppens, S.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Kembuan, C.; Blume-Peytavi, U.; Rühl, E.; Lademann, J. r. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS nano* **2012**, *6* (8), 6829-6842
- (45) Patzelt, A.; Richter, H.; Knorr, F.; Schäfer, U.; Lehr, C.-M.; Dähne, L.; Sterry, W.; Lademann, J. Selective follicular targeting by modification of the particle sizes. *J. Controlled Release* **2011**, *150* (1), 45-48
- (46) Alvarez-Roman, R.; Naik, A.; Kalia, Y. N.; Guy, R. H.; Fessi, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *99* (1), 53-62
- (47) Shen, H.; Hong, S.; Prud'homme, R.; Liu, Y. Self-assembling process of flash nanoprecipitation in a multi-inlet vortex mixer to produce drug-loaded polymeric nanoparticles. *J. Nanopart. Res.* **2011**, *13* (9), 4109-4120
- (48) Johnson, B. K.; Prud'homme, R. K. Flash NanoPrecipitation of Organic Actives and Block Copolymers using a Confined Impinging Jets Mixer. *Aust. J. Chem.* **2003**, *56* (10), 1021-1024
- (49) Gref, R.; Miralles, G.; Dellacherie, E. Polyoxyethylene-coated nanospheres: effect of coating on zeta potential and phagocytosis. *Polym. Int.* **1999**, *48* (4), 251-256
- (50) Wooster, T. J.; Golding, M.; Sanguansri, P. Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability. *Langmuir* **2008**, *24* (22), 12758-12765
- (51) Lifshitz, I. M.; Slyozov, V. V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J. Phys. Chem. Solids* **1961**, *19* (1-2), 35-50
- (52) Wagner, C. Theorie der alterung von niederschlägen durch umlösen (Ostwald-reifung). *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1961**, *65* (7-8), 581-591
- (53) Simon, G. A.; Maibach, H. I. The Pig as an Experimental Animal Model of Percutaneous Permeation in Man: Qualitative and Quantitative Observations – An Overview. *Skin Pharmacol. Physiol.* **2000**, *13* (5), 229-234
- (54) Döge, N.; Avetisyan, A.; Hadam, S.; Pfannes, E. K. B.; Rancan, F.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Assessment of skin barrier function and biochemical changes of ex vivo human skin in response to physical and chemical barrier disruption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, *116*, 138-148
- (55) Alsaqr, A.; Rasouly, M.; Musteata, F. M. Investigating Transdermal Delivery of Vitamin D3. *AAPS PharmSciTech* **2015**, 1-10

- (56) Balzus, B.; Sahle, F. F.; Hönzke, S.; Gerecke, C.; Schumacher, F.; Hedtrich, S.; Kleuser, B.; Bodmeier, R. Formulation and ex vivo evaluation of polymeric nanoparticles for controlled delivery of corticosteroids to the skin and the corneal epithelium. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *115*, 122-130
- (57) Contri, R. V.; Fiel, L. A.; Alnasif, N.; Pohlmann, A. R.; Guterres, S. S.; Schäfer-Korting, M. Skin penetration and dermal tolerability of acrylic nanocapsules: Influence of the surface charge and a chitosan gel used as vehicle. *Int. J. Pharm.* **2016**, *507* (1), 12-20
- (58) Rancan, F.; Giubudagian, M.; Jurisch, J.; Blume-Peytavi, U.; Calderón, M.; Vogt, A. Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 4-11
- (59) Boisgard, A. S.; Lamrayah, M.; Dzikowski, M.; Salmon, D.; Kirilov, P.; Primard, C.; Pirot, F.; Fromy, B.; Verrier, B. 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**, *116*, 51-60
- (60) Deng, P.; Teng, F.; Zhou, F.; Song, Z.; Meng, N.; Liu, N.; Feng, R. Y-shaped methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone)-based micelles for skin delivery of ketoconazole: in vitro study and in vivo evaluation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *78*, 296-304
- (61) Conte, C.; Costabile, G.; d'Angelo, I.; Pannico, M.; Musto, P.; Grassia, G.; Ialenti, A.; Tirino, P.; Miro, A.; Ungaro, F.; Quaglia, F. Skin transport of PEGylated poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles assisted by (2-hydroxypropyl)-beta-cyclodextrin. *J. Colloid Interface Sci.* **2015**, *454* (0), 112-120
- (62) Yue, Z.; You, Z.; Yang, Q.; Lv, P.; Yue, H.; Wang, B.; Ni, D.; Su, Z.; Wei, W.; Ma, G. Molecular structure matters: PEG-b-PLA nanoparticles with hydrophilicity and deformability demonstrate their advantages for high-performance delivery of anti-cancer drugs. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (26), 3239-3247
- (63) Rancan, F.; Papakostas, D.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Delair, T.; Primard, C.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Investigation of Poly(lactic acid) (PLA) Nanoparticles as Drug Delivery Systems for Local Dermatotherapy. *Pharm. Res.* **2009**, *26* (8), 2027-2036
- (64) Soenen, S. J.; Parak, W. J.; Rejman, J.; Manshian, B. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles: Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (5), 2109-2135
- (65) Moore, T. L.; Rodriguez-Lorenzo, L.; Hirsch, V.; Balog, S.; Urban, D.; Jud, C.; Rothen-Rutishauser, B.; Lattuada, M.; Petri-Fink, A. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (17), 6287-6305
- (66) Paweloszek, R.; Briancón, S.; Chevalier, Y.; Gilon-Delepine, N.; Pelletier, J.; Bolzinger, M.-A. Skin Absorption of Anions: Part One. Methodology for In Vitro Cutaneous Absorption Measurements. *Pharm. Res.* **2016**, *33* (7), 1564-1575
- (67) Covi-Schwarz, J.; Klang, V.; Valenta, C. ATR-FTIR Spectroscopy and the Skin Barrier: Evaluation of Penetration-Enhancement Effects. In *Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin: Methodology and General Considerations*; Dragicevic, N.; I. Maibach, H., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2017; pp 247-254.
- (68) Hasanovic, A.; Winkler, R.; Resch, G. P.; Valenta, C. Modification of the conformational skin structure by treatment with liposomal formulations and its correlation to the penetration depth of aciclovir. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79* (1), 76-81
- (69) El Maghraby, G. M.; Williams, A. C.; Barry, B. W. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J. Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58* (4), 415-429
- (70) Kvach, M. V.; Ustinov, A. V.; Stepanova, I. A.; Malakhov, A. D.; Skorobogatyi, M. V.; Shmanai, V. V.; Korshun, V. A. A convenient synthesis of cyanine dyes: reagents for the labeling of biomolecules. *European Journal of Organic Chemistry* **2008**, *2008* (12), 2107-2117

# **-Chapitre VI-**

## **Discussion Générale**

Afin d'améliorer la biodisponibilité des molécules actives pharmaceutiques dans la peau et ainsi développer des formes pharmaceutiques topiques ou transdermiques innovantes à base de systèmes nanoparticulaires, il est indispensable de comprendre comment contrôler les interactions peau-NPs. En ce sens, l'objectif de ce projet de thèse était de déterminer, par des études systématiques structure – activité, quelle était l'influence de la composante hydrophile des NPs polymériques pour l'administration cutanée d'une molécule lipophile modèle, à taille égale de NPs.

Cette discussion générale est divisée en 5 questions spécifiques permettant de répondre à l'objectif principal de ce projet :

- ✓ Quel est le rôle de la composition hydrophile (type, architecture et quantité) sur les propriétés des nanoparticules ?
- ✓ Comment contrôler facilement la taille et la surface des NPs ?
- ✓ Quelles sont les interactions spécifiques entre la peau et les NPs polymériques pouvant influencer la pénétration cutanée du cholécalciférol, selon la composition hydrophile et l'état de la peau ?
- ✓ Quelle est l'efficacité d'absorption cutanée des NPs polymériques testées pour l'absorption du cholécalciférol dans la peau en comparaison à d'autres systèmes de la littérature ?
- ✓ Est-ce qu'une composition polymérique hydrophile apporte un intérêt supplémentaire pour l'administration cutanée en comparaison à des particules hydrophobes plus simples ?

## **6.1 Quel est le rôle de la composition hydrophile (type, architecture et quantité) sur les propriétés des nanoparticules ?**

Dans le chapitre II, une librairie de copolymères amphiphiles à base de polyester PLA (bloc lipophile) a été synthétisée. Dans cette librairie, les caractéristiques suivantes de la composante hydrophile des polymères ont été variées : 1) le type de bloc hydrophile : PEG ou PMPC, 2) la quantité de bloc hydrophile : entre 0 et 25 %<sub>p/p</sub> de PEG et 3) l'architecture du polymère : linéaire ou branché.

À partir cette librairie de polymère, différentes formulations de NPs ont été fabriquées et l'influence des différentes caractéristiques de la composition hydrophile des polymères sur différentes propriétés résultantes des NPs a été systématiquement étudiée.

Les propriétés ayant été étudiées sont les suivantes :

- La structure et les propriétés de surface des NPs (Chapitres III, IV et V)
- L'encapsulation d'une molécule hydrophobe, le cholécalciférol (Chapitres IV et V)
- La dégradation du cholécalciférol (Chapitre IV)
- La libération du cholécalciférol (Chapitre IV)

### **6.1.1 Structure et propriétés de surface des NPs en fonction de la composition hydrophile**

#### **6.1.1.1 Taille**

Une propriété essentielle des NPs influencée par la composition hydrophile des polymères utilisés pour leur fabrication est le diamètre hydrodynamique. Indépendamment de l'architecture de polymère et/ou de l'encapsulation de cholécalciférol, il a été remarqué que la taille des NPs diminuait lorsque le contenu en bloc hydrophile dans le polymère augmentait, jusqu'à atteindre une taille limite (Chapitre III, IV). Ce comportement, très souvent décrit dans la littérature,<sup>1-3</sup> s'explique par l'effet stabilisant du PEG par répulsion stérique, venant inhiber la croissance des NPs durant leur formation<sup>4</sup>.

Le type de polymère hydrophile semble également avoir une influence sur la taille finale des NPs. En effet, dans le chapitre IV, il a été remarqué que le bloc hydrophile de PMPC favorisait la formation de plus grosses particules que le bloc hydrophile PEG, et ce bien que la proportion massique hydrophile en PMPC (37,9 %<sub>p/p</sub>) soit plus importante que celle de PEG (8,9 %<sub>p/p</sub>). À

ce jour, la raison de ce comportement différent n'est pas démontrée, mais le rôle du solvant de solubilisation (acétone vs acétone/méthanol) utilisé pour la nanoprecipitation est une piste à envisager. Une étude plus complète sur la fabrication de NPs à base de polymères possédant différents pourcentages massiques de PMPC permettrait également de clarifier l'influence du bloc hydrophile PMPC sur la formation des NPs fabriquées.

Néanmoins, dans cette étude, l'architecture du polymère n'a pas montré de rôle sur la taille des NPs (Chapitre III). En effet, pour un même contenu massique en PEG, des tailles identiques ont été obtenues pour les NPs fabriquées à partir de polymères linéaires ou branchés. Ces résultats paraissent contraires à ce qui a déjà été reporté dans la littérature, puisque par exemple, Rabanel *et al.* ont remarqué les polymères diblocs linéaires formaient de plus petites tailles de NPs que les polymères branchés<sup>5-6</sup>, probablement en raison de contraintes stériques liées à l'arrangement du PEG en surface des NPs. Au vu de ces résultats et étant donné que la plupart des polymères branchés synthétisés dans cette étude ne possèdent en moyenne qu'un seul bloc PEG/chaine, il est légitime de se demander si le PEG des polymères branchés forme réellement une « branche pendante » ou s'il se retrouve en bout de chaine, formant ainsi une architecture diblocs linéaire.

#### 6.1.1.2 Propriétés de surface

Une attention particulière a été portée dans ce projet à la définition des propriétés de surface des NPs en vue de l'évaluation de ce paramètre sur différents aspects de l'administration de molécules actives dans la peau. En effet, les propriétés de surface et notamment les densités de polymère hydrophile en surface sont souvent très peu caractérisées dans la littérature, et sont généralement analysées par la seule mesure du potentiel Zêta. Il est en effet généralement supposé que le bloc hydrophile est complètement isolé à la surface des NPs. De telles hypothèses conduisent à une surestimation de la densité de bloc hydrophile en surface, à une possible détermination incorrecte de la conformation à la surface et donc rend difficile la comparaison de la performance de différents systèmes nanoparticulaires<sup>7</sup>.

Comme attendu, plus le contenu en bloc hydrophile dans les polymères était important, plus une diminution du potentiel Zêta (en valeur absolue) a été observée (Chapitre III, IV et V), jusqu'à atteindre une valeur proche de la neutralité. Comme pour la taille, aucun effet de l'architecture n'a été observé (Chapitre III). Cette diminution du potentiel Zêta est un premier indicateur que

le bloc hydrophile recouvre la surface des NPs, le PLA se trouvant principalement au cœur. Néanmoins, pour plus de précision quant à la surface des NPs, cette mesure a été combinée à la détermination de la composition hydrophile en surface par une technique RMN. Cette technique a l'avantage de pouvoir quantifier différenciellement la quantité totale de bloc hydrophile dans les NPs et celle présente uniquement à la surface. Cette méthode de quantification a ainsi permis de déterminer que la densité et le pourcentage de polymère hydrophile en surface de NPs polymériques préparées par nanopréciipitation dépendent notamment de la quantité de bloc hydrophile et de la proportion molaire de polymère amphiphile. Néanmoins, quelle que soit la composition hydrophile testée ici, toutes les surfaces arborent une conformation en « brosse » (Chapitre III).

Les fortes variations dans le pourcentage de bloc hydrophile en surface selon ces conditions soulignent l'importance de déterminer ce paramètre lors de la caractérisation des NPs fabriquées à partir de polymères amphiphiles. La mesure par RMN de la composition de surface pour les NPs fabriquées à partir des polymères d'architecture branchée reste cependant à évaluer afin de déterminer si les contraintes stériques liées à l'architecture branchée favorisent ou non l'arrangement des blocs hydrophiles à la surface ou à l'intérieur des NPs, en comparaison aux polymères linéaires. Toutefois, il a déjà été montré que même avec des polymères branchés, une majorité des branches hydrophiles se trouvait en surface<sup>5</sup>.

#### 6.1.1.3 Morphologie et dynamisme

Selon la composition hydrophile des NPs, différentes structures ont été observées (Chapitre IV et V). Concernant les NPs PEGylées (Chapitre V), deux types de morphologies de particules ont été observés par Cryo-MET selon la composition en PEG, confirmant les résultats déjà obtenus au laboratoire<sup>5-6</sup>. Entre 0 et 8.6%<sub>p/p</sub> de PEG, les particules formées sont de nature « solide ». Une transition vers des particules plus « molles » a été observée pour des contenus en PEG supérieurs à 24%<sub>p/p</sub>. En effet, l'observation Cryo-MET a mis en évidence la présence de particules aplaties et de contours moins définis que les NPs « solides », avec notamment la présence d'un arrière-plan de chaînes polymériques. Bien que deux types de structures aient été définis, il est toutefois important de préciser que la technique Cryo-MET utilisée ici peut ne pas refléter l'aspect de la particule à l'état hydraté, car, avant d'être refroidies par azote liquide, les

particules sont séchées sur le support de carbone, pouvant ainsi provoquer des déformations et artefacts importants. Une technique de Cryo-MET par vitrification de l'échantillon en milieu liquide permettrait d'obtenir plus d'informations sur la structure des NPs dans leur milieu de dispersion <sup>8</sup>.

Ces structures « molles » peuvent être dénommées comme des « agrégats pseudo-micellaires », par analogie à la composition amphiphile des micelles de tensioactifs. Ces « agrégats pseudo-micellaires » n'ont généralement pas la même dynamique que les micelles de tensioactifs puisque les échanges d'unimères se font souvent sur des échelles de temps bien plus longues <sup>9</sup>. Creutz *et al.* ont notamment rapporté des constantes d'échanges de l'ordre de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  pour les polymères contre  $10^6$ - $10^8 \text{ s}^{-1}$  pour les tensioactifs ordinaires<sup>10</sup>.

Néanmoins, il semble tout de même que des différences de dynamisme existent selon la composition hydrophile. En effet, les tests de stabilité colloïdale réalisés (Chapitre V) ont étonnamment montré que ces particules « molles » très PEGylées étaient moins stables que les particules peu ou pas PEGylées, et ce malgré les contraintes stériques apportées par la quantité plus importante de PEG en surface. De plus, la présence d'une fraction importante de polymères libres en solution a été observée dans les nanosuspensions de particules très PEGylées (Chapitre V), et caractérisée notamment par un contenu hydrophile beaucoup plus important que celui des nanoagrégats (63 et 25%<sub>p/p</sub>, respectivement). Par ailleurs, la possibilité d'une dissociation des agrégats polymériques très PEGylés a été mise en évidence par des tests mélange avec des tensioactifs (Chapitre V, Supplementary data). Ces observations ont ainsi mené à émettre l'hypothèse que la mobilité des chaînes était plus importante pour les particules très PEGylées que celle des particules peu ou pas PEGylées. Ces résultats corroborent ainsi ceux obtenus par Creutz *et al.*, qui ont montré que la vitesse des échanges entre copolymères de poly((diméthylamino)alkyl méthacrylate-b-sodium méthacrylate) augmentait lorsque le contenu hydrophobe des copolymères diminuait, avec notamment des échanges pour les polymères les plus hydrophiles 20 fois plus rapides que ceux des polymères les plus hydrophobes <sup>11</sup>.

Les études RMN dans D<sub>2</sub>O semblent néanmoins contredire cette hypothèse puisqu'aucun signal lié au bloc hydrophobe de PLA n'a été observé, quel que soit le contenu en PEG des NPs (Chapitre III et V), indiquant ainsi que celui-ci est à l'état solide, et possède donc une mobilité

restreinte. Il est toutefois à noter que les polymères libres en solution n'ont pas apporté de signal, car ceux-ci ont vraisemblablement été éliminés lors du processus d'ultrafiltration utilisé pour concentrer les NPs en vue de la RMN. D'autres expérimentations et évidences seraient donc préférables pour conclure quant à la différence de dynamisme selon la composition hydrophile. Un moyen simple serait d'évaluer la cinétique des échanges des chaînes polymères par mélange de deux populations de NPs variant uniquement par la présence d'une petite quantité de fluorophore. Des modifications de la fluorescence permettraient de mettre en évidence une hybridation entre les deux populations, et donc un échange de chaînes <sup>10</sup>.

En plus de la quantité de bloc hydrophile, il est également vraisemblable que le type de composition hydrophile (PEG ou PMPC) influence la morphologie des NPs. En effet, il a été remarqué que les polymères de PLA-*b*-PMPC semblent former des particules « solides » (Chapitre IV), bien que la composition hydrophile soit supérieure à celle des polymères de PLA-*b*-PEG formant des « agrégats pseudo-micellaires » à respectivement 37.9 et 25 %<sub>p/p</sub> de PEG/PLA). Des expérimentations plus poussées, étudiant notamment des polymères ayant différentes proportions de PMPC seraient nécessaires pour éclaircir et conclure sur le rôle de cette caractéristique.

### **6.1.2 Encapsulation de molécules actives dans les NPs en fonction de la composition hydrophile**

Dans les chapitres IV et V, l'influence de la composition polymérique hydrophile (type et quantité) sur l'encapsulation du cholécalférol, molécule modèle très lipophile, a été étudiée. Aucune différence concernant le taux d'encapsulation et le rendement de fabrication (en principe actif) n'a été observée entre les différentes formulations indiquant que, dans ce cas, la composition polymérique n'a pas influencé l'encapsulation du cholécalférol. Par ailleurs, quel que soit le polymère, le rendement de fabrication était très élevé. Un tel comportement est probablement lié au fait que le cholécalférol seul, du fait de sa très faible solubilité aqueuse, forme des agrégats stables en suspension aqueuse pouvant rapidement être recouverts par les chaînes polymériques. En effet, par exemple Ramezanli *et al.* ont réussi à obtenir un taux d'encapsulation de cholécalférol jusqu'à 30 %<sub>p/p</sub> dans des Tyrosphères® <sup>12</sup> (polymère PEG-Tyrosine-PEG) indiquant que la formation des NPs stables chargées en cette molécule ne dépend vraisemblablement pas de la capacité de solubilisation du cholécalférol par le polymère.

Si la composition polymérique n'a pas d'incidence sur l'encapsulation du cholécalférol, il a néanmoins déjà été montré qu'elle influençait l'encapsulation de molécules plus hydrophiles. Rabanel *et al.* ont par exemple remarqué que le caractère amphiphile du polymère contrôlait l'encapsulation du curcumin ( $\log P=3,6$ ), molécule 10 fois plus soluble que le cholécalférol. En effet, les NPs ayant le plus de PEG dans leur composition permettaient d'obtenir les taux et efficacités d'encapsulation les plus importants. Au contraire les NPs de PLA seul, n'étaient pas stables en suspension ; la précipitation du curcumin non encapsulé favorisant probablement la précipitation des chaînes polymériques de PLA <sup>6</sup>. La conclusion inverse a toutefois été également reportée dans l'étude de Deng *et al.*, où il a été montré que l'encapsulation du kétoconazole ( $\log P=3,8$ ) dans des micelles polymériques diminuait avec le caractère amphiphile

13

### **6.1.3 Stabilité de molécules labiles dans les NPs en fonction du type de composition hydrophile**

Il est souvent affirmé que l'encapsulation dans des NPs, polymériques ou non polymériques, permet d'augmenter la stabilité de molécules sensibles à la dégradation, en les protégeant physiquement du milieu dégradant. Néanmoins, très peu d'études comparent systématiquement l'effet de la composition des NPs sur la dégradation des molécules sensibles. Pourtant, il est certain que le type de matériau utilisé dans la composition des NPs et le type de structure des NPs jouent un rôle non négligeable dans le processus de protection. Dans le chapitre IV, l'influence de la composition hydrophile sur la dégradation du cholécalférol à température corporelle et à l'abri de la lumière a ainsi été étudiée, afin de déterminer si cette caractéristique influençait la dégradation de cette vitamine sensible.

Comme attendu, il a été remarqué que l'encapsulation du cholécalférol dans un cœur polymérique ralentissait sa dégradation par rapport à sa forme de NPs sans polymère. De plus, un léger effet bénéfique d'une couche de polymère hydrophile à la surface des NPs polymérique sur la dégradation a été remarqué ; le polymère hydrophile venant former une barrière physique supplémentaire protégeant le cholécalférol présent dans le cœur lipophile de PLA. Néanmoins, il a été constaté que l'encapsulation dans un cœur polymérique de PLA favorisait plus la dégradation du cholécalférol par rapport à une solubilisation dans des micelles très dynamiques à base de tensioactifs oleth-20. Un tel comportement a mis en évidence que la

matrice polymérique de PLA pouvait favoriser la dégradation du principe actif *in situ*. En effet, un microenvironnement acide peut avoir été généré dans la matrice polymérique de PLA en raison de la formation de produits de dégradation de polymères acides (oligomères et monomères). La présence d'un microenvironnement acide a en effet été démontrée expérimentalement par l'équipe du Pr Robert Langer dans des microsphères de PLGA, avec notamment des pH pouvant être très bas (pH minimal de 1,4) au centre des microsphères <sup>14</sup>. Le cholécalférol étant sensible à l'acidité du milieu, sa protection physique par rapport à l'humidité, obtenue grâce à l'encapsulation dans la matrice lipophile de PLA, est ainsi contrebalancée par une dégradation favorisée dans le microclimat acide de la matrice de PLA. Une telle dégradation, inhérente à la présence d'un microenvironnement acide, a par ailleurs été déjà reportée pour des protéines de BSA encapsulées dans des implants à base de PLGA <sup>15</sup>.

Un moyen pour éviter cette dégradation acide peut être d'augmenter le pH dans le cœur polymérique par l'utilisation d'agents basiques <sup>15</sup>. La formation de nanocapsules est également intéressante pour contrer à la fois les effets de l'humidité et de l'acidité. En effet, lorsque solubilisé dans un cœur lipidique liquide, le cholécalférol est très peu soumis aux facteurs dégradants, favorisant ainsi sa stabilité. Almouazen *et al.* ont par exemple montré que moins de 10 % de cholécalférol se dégradait après 24 h à 37°C en milieu cellulaire lorsque formulé dans des nanocapsules de PLA avec un cœur lipidique liquide de triglycérides capryliques <sup>16</sup>. Cette stabilité accrue du cholécalférol dans des nanocapsules par rapport aux nanosphères a été confirmée durant cette thèse avec un test de stabilité sur des nanocapsules avec un cœur liquide de triglycérides capryliques, formées à partir des polymères synthétisés dans ce projet. Une absence de dégradation du cholécalférol a été remarquée après 24h en milieu aqueux pour les nanocapsules alors que 40% du cholécalférol étaient dégradés dans les nanosphères de PLA (données non présentées). Un tel effet bénéfique contre la dégradation des molécules actives sensibles dans les nanocapsules en comparaison avec les nanosphères avait également déjà été remarqué par Fontana *et al.*, dans une étude de photodégradation du propionate de clobétasol <sup>17</sup>.

Au vu de ces résultats, le choix de la composition des NPs est donc crucial pour augmenter la protection des molécules actives instables et doit donc être particulièrement réfléchi pour permettre une plus grande stabilité et donc une meilleure efficacité. Dans ce projet de thèse

(Chapitre IV et V), du BHT a été co-encapsulé dans les matrices polymériques, comme antioxydant pour contrer efficacement la dégradation du cholécalciférol, pendant les études de libération et pénétration cutanée. Néanmoins, pour une utilisation en clinique de ces NPs, une autre stratégie de stabilisation devrait être employée, en raison des controverses liées à l'utilisation du BHT <sup>18</sup>.

#### **6.1.4 Libération de molécules actives à partir des NPs en fonction du type de composition hydrophile**

Les tests de libération du cholécalciférol, étudiés dans le chapitre IV, ont mis en évidence que la libération de ce principe actif très hydrophobe ne dépendait pas de la composition polymérique des NPs testées. Ces résultats sont pourtant contraires aux études de la littérature ayant montré que la présence d'une couche de PEG à la surface de NPs de polyester formait une barrière à la diffusion des molécules encapsulées <sup>6,19</sup>. Néanmoins, les molécules testées dans ces études <sup>6,19</sup> présentaient une hydrophobie moins importante que le cholécalciférol. Leur diffusion et solubilisation dans les milieux de libération était donc facilitée par rapport au cholécalciférol. Dans ce projet de thèse, la libération du cholécalciférol semblait plutôt contrôlée par sa vitesse de solubilisation dans le milieu de libération que par sa diffusion à travers la matrice polymérique ce qui ne permet pas de conclure réellement quant au rôle de la composition hydrophile sur la cinétique de libération. De plus, cette étude de libération reste peu comparable aux conditions des tests de pénétration cutanée, car une très forte agitation a été utilisée pour mélanger les deux phases, ce qui n'est pas le cas lors des tests de pénétration cutanée. Ainsi, si dans le test de libération réalisé, le cholécalciférol a été libéré en 24 heures, sur la peau, la libération en conditions de pénétration cutanée est vraisemblablement beaucoup plus lente.

## 6.2 Comment contrôler facilement la taille et la surface des nanoparticules ?

La taille des NPs est un complexe équilibre entre la composition des polymères et le procédé de fabrication. Générer des NPs de mêmes tailles quelle que soit la composition hydrophile des polymères était un point critique pour évaluer plus spécifiquement le rôle de la composition hydrophile sur les propriétés de délivrance des NPs dans la peau. Une attention particulière a ainsi été apportée pour définir les conditions de fabrication permettant d'obtenir des tailles de NPs identiques. Pour cela, il a été choisi de fabriquer les NPs par des méthodes dites en « flux » (nanoprécipitation Flash et microfluidique) permettant de contrôler finement la taille par simple variation du débit (Chapitre III). Après comparaison, la méthode de nanoprécipitation Flash a été retenue dans ce projet pour son appareillage très simple et peu coûteux, idéal pour un développement de formulation au laboratoire pour des tests préliminaires. Néanmoins, l'automatisation du procédé de microfluidique testé reste la meilleure solution pour éviter les variations de propriétés entre les lots liées à la manipulation humaine, et pour une industrialisation des NPs.

Pour la formation de NPs de taille identique à partir de copolymères amphiphiles, d'autres techniques sont également utilisables. La plus simple est de faire varier la concentration de polymère dans la phase organique <sup>20</sup>. L'utilisation de mélanges de polymères est également possible. Par exemple, Du *et al.* ont mis au point une librairie de particules à base de PCL/PCL-PEG de tailles identiques et possédant théoriquement des quantités de PEG en surface différentes. Pour cela, ils ont à la fois fait varier la taille du bloc PCL dans les copolymères PCL-PEG et la quantité d'homopolymères PCL <sup>21</sup>. Il a toutefois été postulé que le PEG était complètement disposé à la surface, ce qui n'est pas garanti, comme notamment remarqué pour les co-précipitations dans le chapitre III.

S'il a été possible de contrôler la taille des NPs grâce au procédé, l'utilisation de copolymères amphiphiles de compositions hydrophiles variables influence tout de même la morphologie/dynamisme des NPs en plus des propriétés de surface. Afin de tester uniquement l'effet de la surface hydrophile des NPs (et pas la morphologie/dynamisme), d'autres méthodes de fabrication de NPs auraient été envisageables, reposant notamment sur la modification de

surface d'un cœur polymérique hydrophobe préformé. Les deux principales techniques reposent sur l'adsorption de polymères amphiphiles à la surface par interactions hydrophobes<sup>22</sup> ou électrostatiques<sup>23</sup> ou le greffage de blocs hydrophiles fonctionnels sur des groupements réactifs à la surface<sup>24-25</sup>. Les principaux avantages de ces techniques portent sur le fait i) que le bloc hydrophile ne peut se retrouver qu'à la surface, ii) que différents lots de particules de surface différentes peuvent être fabriquées à partir du même lot de particules hydrophobes préformées (taille et encapsulation identiques entre les lots) et iii) que la morphologie et le dynamisme des NPs reste constant. Néanmoins, ces techniques souffrent de fortes variations entre les lots de fabrication et souvent d'une couverture hydrophile peu dense en raison des contraintes stériques empêchant l'adsorption ou le greffage. Par ailleurs, des étapes de purifications extensives sont nécessaires pour éliminer les polymères non adsorbés ou greffés restants en solution, ce qui peut être délétère à la stabilité de l'adsorption des polymères<sup>7</sup>.

### **6.3 Quelles sont les interactions spécifiques entre la peau et les nanoparticules polymériques pouvant influencer la pénétration cutanée du cholécalciférol, selon leur composition hydrophile et l'état de la peau ?**

L'objectif principal de ce projet était de déterminer, par des études systématiques structure-activité, quelle était l'influence de la composition hydrophile des NPs polymériques pour l'administration cutanée d'une molécule modèle lipophile, à taille égale. Il avait en effet été postulé en Hypothèse de Recherche que les interactions des NPs polymériques avec la surface cutanée, leur devenir et donc la pénétration cutanée de la molécule modèle pouvaient être affectés à la fois par la composition hydrophile de surface et par la condition pathologique de la peau.

Les blocs hydrophiles testés étaient :

- Le PEG, bloc hydrophile polymérique le plus couramment utilisé dans le domaine des nanotechnologies pour la voie médicale.
- Le PMPC, bloc hydrophile polymérique ayant démontré son intérêt en alternative au PEG et pouvant modifier la structure du SC <sup>26</sup>

#### **6.3.1 L'effet du PEG et PMPC en surface des NPs sur la pénétration cutanée dans la littérature**

Avant de discuter des mécanismes de pénétration cutanée mis en évidence dans ce projet, il est important de revenir sur les hypothèses ayant déjà été avancées dans la littérature sur l'effet du PEG ou du PMPC sur la pénétration cutanée.

Bien que de nombreuses études ont testé la pénétration cutanée de NPs PEGylées, polymériques ou lipidiques, très peu ont systématiquement comparé ses bénéfices pour la délivrance de substances actives, par rapport à des particules non PEGylées et ce pour des tailles de particules identiques <sup>27-28</sup>. Il a par exemple été montré que l'incorporation de PEG dans des liposomes augmentait l'élasticité des membranes vésiculaires, favorisant ainsi la perméation cutanée sur peau intacte de rat de la zidovudine encapsulée <sup>27</sup>. L'influence de la quantité de PEG dans des liposomes (0, 0,5, 1 et 5% molaire) a par ailleurs été évaluée par Knudsen *et al.*, qui ont montré que la PEGylation ne compromettait pas la pénétration cutanée du calcipotriol encapsulé sur

peau intacte. Un pourcentage de 1% molaire permettant néanmoins une meilleure pénétration du principe actif. Afin d'expliquer ces résultats, les auteurs ont émis l'hypothèse que le PEG se liait aux molécules d'eau de la peau, favorisant l'hydratation du *SC* et ainsi la pénétration cutanée, mais qu'une couche hydrophile trop importante (5% de PEG) pouvait ralentir la libération depuis les liposomes <sup>28</sup>. Ces hypothèses n'ont toutefois pas été vérifiées expérimentalement. Dans d'autres études, différentes hypothèses ont également été émises quant au rôle du PEG sur la pénétration cutanée, notamment une plus petite taille de particules <sup>29</sup>, un influx facilité dans les follicules pileux <sup>30-31</sup> et un effet de déshydratation du *SC* <sup>32</sup>. Il a également été postulé que le PEG recouvrant des NPs d'or favorisait leur pénétration dans les couches adipeuses de la peau en raison d'une modification de l'organisation du *SC* <sup>33</sup>.

Concernant l'influence du type de bloc polymérique hydrophile, à notre connaissance, une seule étude a comparé l'effet du PEG et du PMPC sur la pénétration cutanée. Dans cette étude traitant de polymersomes (vésicules aqueuses polymériques), il a été remarqué que ceux arborant une surface de PMPC pouvaient se déformer plus facilement que ceux avec une surface de PEG dans des pores aqueux. En effet, le PMPC, plus hydrophile que le PEG, permettait un meilleur contact avec la surface des pores hydrophiles, laissant plus d'espace pour une déformation dans les pores. Au contraire, les polymersomes de PEG, plus hydrophobe que le PMPC, bénéficiaient d'un plus faible espace de déformation en raison de moins bonnes interactions avec la surface hydrophile des pores. La plus importante capacité de pénétration des polymersomes de PMPC leur a permis à la fois de traverser plus efficacement les nanopores d'une membrane de polycarbonate et de faire pénétrer plus facilement dans la peau une molécule hydrophile modèle encapsulée par rapport aux polymersomes de PEG <sup>34</sup>. Cette étude a donc mis en évidence l'importance du type de polymère en surface sur les interactions avec la peau.

### **6.3.2 Mécanismes proposés dans ce projet**

Afin de définir plus précisément le rôle de la composition polymérique hydrophile des NPs polymériques sur la pénétration cutanée, le type de composition hydrophile et la quantité de bloc hydrophile des NPs ont été systématiquement variés, tout en veillant à garder des tailles égales. Leur influence sur l'absorption cutanée a été étudiée à la fois dans le chapitre IV et le chapitre V.

Dans le chapitre IV, les formulations nanoparticulaires de PLA seul, PLA-*b*-PEG2K et PLA-*b*-PMPC, ainsi que des formulations contrôles de NPs de cholécalférol sans polymère et des micelles de tensioactifs ont été comparées. Il a été ainsi remarqué que :

- Sur peau intacte, la pénétration était significativement supérieure pour les NPs polymériques que pour les micelles de tensioactifs.
- Sur peau intacte, la pénétration ne dépendait pas de la composition polymérique testée
- Sur peau lésée (retrait de la plupart du *SC*), au contraire, une couche hydrophile neutre en surface diminuait la pénétration cutanée par rapport aux NPs lipophiles arborant une surface plus négative (NPs de PLA et de cholécalférol sans polymère).

Dans le chapitre V, l'influence de la quantité de PEG dans les NPs sur la pénétration cutanée a été évaluée et un intérêt spécifique a été porté aux interactions entre les NPs et la peau. Il a ainsi notamment été remarqué que :

- Sur peau intacte et lésée, les NPs les plus PEGylées permettent une meilleure pénétration du cholécalférol, par rapport à celles peu riches en PEG.
- Sur peau lésée, les NPs de PLA favorisaient la plus forte absorption du cholécalférol.
- Les NPs les plus PEGylées, de structure plus dynamique, interagissent plus facilement avec les lipides cutanés, favorisant probablement la mouillabilité de la peau avec une possible extraction lipidique. Ce mécanisme peut être responsable de la meilleure pénétration cutanée du cholécalférol sur peau intacte
- Les propriétés des NPs peuvent changer une fois déposées sur la peau. En effet, les NPs négativement chargées et peu ou non PEGylées (PLA et PLA-*b*-PEG1K) s'agrègent en suspension sur la peau lésée en réponse à la libération importante d'espèces salines.
- Les agrégats de PLA adhèrent fortement à la peau contrairement à ceux de PLA-*b*-PEG1K. Cette adhérence des agrégats peut ainsi être responsable d'une plus forte concentration locale de cholécalférol à la surface de la peau et donc une absorption plus importante.

En fonction de la composition hydrophile et de l'état pathologique de la peau, différentes interactions avec la peau sont donc possibles et peuvent être impliquées dans les différences de pénétration cutanée observées (**Tableau 6.1**) :

Sur peau intacte :

- 1) Dynamisme des NPs/mouillabilité/extraction de lipides

Sur peau lésée :

- 2) Déstabilisation des NPs négativement chargées par agrégation saline.
- 3) Adhésion/accumulation des agrégats
- 4) Dynamisme des NPs/Hydrophilie de surface favorisant une possible pénétration dans couches hydrophiles de la peau

**Tableau 6.1** Récapitulatif du comportement des nanoformulations et influence sur la pénétration cutanée

	VD3	PLA	PLA- <i>b</i> - PEG1K	PLA- <i>b</i> - PEG2K	PLA- <i>b</i> - PMPC	PLA- <i>b</i> - PEG5K	PLA- <i>b</i> - PEG10K	Micelles d'oleth20
% massique hydrophile	-	0	3,1	8,6	37,9	24,9	24,5	HLB 15,3
Charge de surface (ZP)	-21	-33	-23	-13	-14	-6	-3	
Hydrophilie de surface	-	-	+	++	++	+++	+++	
Structure	Solide	Solide	Solide	Solide	Solide	« Molle »	« Molle »	Micelles
Dynamisme	ND	-	-	-	ND	+	+	+++
Mouillabilité de surface lipidique	ND	-	-	-	ND	++	++	++++**
Agrégation saline en suspension	++++*	+++	+++	-	-	-	-	ND
Adhésion/sédimentation des agrégats sur la peau lésée	ND	+++	-					
Pénétration cutanée (intacte)	+	+	+	+	+	++	++	-
Pénétration cutanée (lésée)	+++	++++	+	++	++	+++	+++	ND

ND = non déterminé(e)

\*CCC NPs VD3 sans polymère = 15 mM

\*\*hypothétique

### 6.3.3 Précisions à apporter concernant les mécanismes d'interactions cutanés

Quelques points restent à éclaircir concernant les mécanismes d'interactions cutanés définis dans ce projet de thèse.

#### 6.3.3.1 Agrégation/Adhésion-accumulation

Dans le chapitre V, il a été montré que les NPs de PLA, de PLA-*b*-PEG 1K s'agrégeaient **dans la suspension aqueuse** déposée sur la peau au contact probable d'espèces salines libérées depuis la **peau lésée**. Ces tests ont été effectués au contact d'une solution filtrée ayant été au contact de la peau lésée. En conditions réelles de pénétration cutanée, les espèces filtrées pourraient également participer à la déstabilisation des NPs. La nature des entités issues de la peau et libérées dans la nanosuspension reste donc à définir. Par ailleurs, au **contact direct de la peau**, il est attendu que la vitesse et le taux d'agrégation soient plus importants que dans la suspension colloïdale, compte tenu de la concentration des espèces.

De plus, il n'est pas inenvisageable que les NPs polymériques puissent également se déstabiliser **en surface de la peau intacte** et former un film polymérique, comme reporté par Rancan *et al*<sup>35</sup>. Au contact de la peau intacte, d'autres mécanismes de déstabilisation pourraient donc intervenir en raison du contact lipidique avec les NPs. Le devenir des différentes NPs au contact direct de la peau est donc à éclaircir.

Bien que les NPs de PLA et de PLA-*b*-PEG1K s'agrègent en suspension, seuls les macro-agrégats de PLA s'accumulent à la surface de la peau au vu des résultats de la quantité de principe actif et de particules à la surface après 24 h de pénétration. L'explication à ce phénomène n'est pas encore clairement définie. Plusieurs hypothèses peuvent être émises : i) les NPs de PLA ont plus d'affinités pour la surface de la peau et « collent » à la peau alors que les NPs PEGylées n'adhèrent pas en raison de leur surface hydratée, ii) les agrégats de PLA présents en suspension sédimentent plus rapidement sur les peaux que les agrégats PEGylés, plus stables en suspension, iii) les espèces ayant été filtrées participent à une déstabilisation supplémentaire des NPs de PLA, mais pas, ou moins, à celle des NPs de PLA-*b*-PEG1K. Afin de valider ces hypothèses, il serait envisageable de forcer la sédimentation des NPs polymériques sur la peau par centrifugation d'un mélange peau/NPs et de déterminer la quantité

ayant adhéré (hypothèse i) ou d'évaluer la vitesse de sédimentation des différents agrégats polymériques par un test de centrifugation (hypothèse ii).

Cette déstabilisation/sédimentation des NPs de PLA, activée par le « signal » salin de la peau lésée, semble particulièrement intéressante pour augmenter la sélectivité des formulations en permettant une agrégation au contact de la peau lésée, maximisant ainsi l'absorption du cholécalciférol uniquement sur peau lésée à traiter. Il est toutefois important de s'interroger quant à la validité de ce mécanisme en conditions réelles *in vivo*. En effet, lors des tests de pénétration cutanée en cellule de Franz réalisés dans ce projet, les formulations de NPs testées étaient des dispersions liquides. En conditions *in vivo*, l'incorporation dans une formulation semi-solide serait nécessaire pour éviter l'effet de ruissellement sur la peau. La viscosité des telles formulations pourrait à la fois i) diminuer la diffusion des espèces salines dans la formulation et ainsi limiter l'agrégation des NPs et ii) empêcher la sédimentation des agrégats si formés. De plus, même sur peau intacte certaines conditions pourraient également favoriser la déstabilisation des NPs, comme par exemple la sueur constituée principalement de sels et étant libérée sur la peau. La concentration en sodium dans la sueur est notamment entre 10-20 mM, mais peut atteindre jusqu'à 100 mM lors de forte transpiration <sup>36</sup>, ce qui est une concentration largement supérieure à la CCC des NPs peu PEGylées (inférieure à 40 mM) (Chapitre V). Par ailleurs, les études *in vitro* de pénétration cutanée de ce projet ont été réalisées en conditions occlusives, limitant ainsi l'évaporation de l'eau présente dans les nanosuspensions (une petite fraction d'eau se condense toutefois à l'intérieur des bouchons des cellules de Franz). En conditions réelles d'applications *in vivo*, si les nanosuspensions ne sont pas appliquées en milieu occlusif, l'eau présente peut s'évaporer. Cette évaporation peut mener à une augmentation de la concentration en particules dans les formulations et donc à un autre mécanisme de déstabilisation des particules, aussi bien sur peau intacte et lésée. Müller *et al.* ont par exemple remarqué que l'évaporation de l'eau d'une formulation de SLN menait à la formation d'un film lipidique continu <sup>37</sup>. Il est toutefois attendu que la déstabilisation des NPs par augmentation de la concentration liée à l'évaporation dépende également de la composition hydrophile polymérique des NPs. En effet, il a été remarqué que plus les NPs étaient PEGylées, plus elles pouvaient être concentrées sans déstabilisation (données non présentées).

### 6.3.3.2 Dynamisme des NPs et mouillabilité de la peau/extraction de lipides

Par le biais de mesures d'angle de contact sur des surfaces de mica recouvertes de céramides, il a été montré dans le chapitre V que les NPs les plus PEGylées et donc plus dynamiques, interagissaient avec les lipides cutanés. Néanmoins, la seule mesure de l'angle de contact, ne permet pas de définir quel est le mode d'interaction avec les lipides cutanés, *i.e.* est-ce que les micelles favorisent uniquement le mouillage de la peau et se déposent à la surface des lipides, ou est-ce qu'une déstabilisation des bicouches lipidiques voire une extraction de lipides est possible ? Par ailleurs, ces tests n'ont été effectués que sur des surfaces modèles ne comportant qu'un seul type lipidique. Des tests sur peau seraient donc nécessaires pour confirmer les résultats.

Une méthode pour caractériser l'effet d'excipients sur la structure cutanée est la spectroscopie infrarouge (IR). L'IR est en effet utilisée pour caractériser les transitions de phases des conformations des lipides cutanés<sup>38</sup>. Ces transitions de phases sont détectées en étudiant les bandes des CH<sub>2</sub> correspondantes aux chaînes aliphatiques des lipides. Les bandes spécifiques analysées sont celles des vibrations des CH<sub>2</sub> d'étirement ( $\nu \sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ ) et de cisaillement ( $\nu \sim 1462\text{-}1473 \text{ cm}^{-1}$ ). Un déplacement de la bande d'élongation vers de plus faibles valeurs ainsi qu'une diminution de la largeur de la bande de cisaillement à mi-hauteur (dénommée FW-50) indique s'il y a eu une transition de phase des lipides d'un état organisé orthorhombique à une organisation lamellaire hexagonale ou à un état liquide désorganisé<sup>38</sup>. Un changement d'état implique une désorganisation des lipides et donc de la barrière cutanée qui pourrait expliquer l'augmentation de la pénétration cutanée du cholécalciférol. Une telle étude par IR a été réalisée dans ce projet afin de déterminer si les NPs les plus PEGylées (PLA-*b*-PEG5K) désorganisaient la bicouche lipidique. En analysant la dérivée seconde des spectres IR réalisés sur la surface de la peau de porc, aucun effet déstabilisant n'a pu être observé sur l'organisation des lipides cutanée du SC après traitement par ces NPs (**Tableau 6.2**). Cette absence d'effet déstabilisant détecté sur les lipides cutanés est probablement liée à la trop faible concentration des NPs testées. À titre de contrôle, une solution aqueuse du tensioactif sodium lauryl sulfate (SLS), reconnu pour son caractère détergent de la peau<sup>39</sup> a également été testée. À une concentration identique à la concentration de particules utilisée pour le traitement de la peau (0,1%<sub>p/p</sub>), aucun effet sur les lipides cutanés n'a également été détecté. Une concentration supérieure (3%<sub>p/p</sub>) a

été nécessaire pour détecter un effet significatif sur la peau avec un passage des lipides d'un état orthorhombique ( $\nu \sim 2849,7 \text{ cm}^{-1}$ ) à l'état hexagonal ( $\nu \sim 2850,7 \text{ cm}^{-1}$ ).

**Tableau 6.2** Valeurs des bandes d'étirement des groupements  $\text{CH}_2$  des lipides de la surface de la peau après différents traitements

Traitement de la peau	Bande d'élongation $\text{CH}_2$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Organisation des lipides
Sans traitement	2849,79	Orthorhombique
Eau	2849,53	Orthorhombique
NPs PLA- <i>b</i> -PEG5K 0,1% <sub>p/p</sub>	2849,64	Orthorhombique
SLS 0,1% <sub>p/p</sub>	2849,7	Orthorhombique
SLS 3% <sub>p/p</sub>	2850,7	Hexagonal

La trop faible concentration des particules ne permet donc pas de conclure sur l'effet déstabilisant des particules les plus PEGylées. Afin d'obtenir une information quant au caractère déstabilisant de lipides des NPs très PEGylées, il serait nécessaire de recommencer cette expérimentation à des concentrations en particules beaucoup plus importantes. Il serait également envisageable de déterminer si les particules sont capables de solubiliser les lipides en faisant le dosage des lipides cutanés par HPLC après traitement <sup>39</sup>. Une forte concentration de NPs serait toutefois également requise pour observer des différences significatives compte tenu des variabilités de composition cutanée entre différentes zones/donneurs. Des tests de « lipid mixing » sont également envisageables afin de déterminer si des échanges sont possibles entre les NPs polymériques et les lipides cutanés. Ces tests, originalement définis pour regarder la fusion entre les liposomes et les bicouches lipidiques, sont basés sur un mélange entre les particules testées et des liposomes fabriqués à partir de lipides du *SC* <sup>40</sup>. La fusion entre les deux types de particules est suivie dans ce cas par fluorescence ou par libération d'une molécule encapsulée <sup>40</sup>.

D'autre part, des études plus complètes seraient nécessaires pour évaluer plus spécifiquement l'intérêt du bloc hydrophile PMPC sur les interactions cutanées avec les lipides et la pénétration. Il avait en effet été postulé dans le chapitre IV que, le PMPC, reconnu pour modifier la structure du *SC*, pouvait influencer la pénétration cutanée. Pourtant aucune différence significative d'absorption cutanée n'a été observée sur peau intacte par rapport aux formulations de PLA et de PLA-*b*-PEG sur peau intacte. Avant de conclure sur la comparaison entre PEG et PMPC, il

serait donc opportun de comparer la pénétration cutanée i) à partir de concentrations polymériques plus élevées et ii) à différents pourcentages massiques de PMPC. Des tests d'interactions avec les lipides devraient également être réalisés pour ce type de bloc hydrophile.

### 6.3.3.3 Comparaison particules polymériques très PEGylées et micelles de tensioactifs

Par ailleurs, dans le chapitre V, il a été conclu que ces interactions avec les lipides cutanés liées au dynamisme des particules très PEGylées pouvaient avantager la pénétration cutanée sur peau intacte par rapport aux particules « solides » non dynamiques. Cette hypothèse semble néanmoins venir en contradiction avec les résultats obtenus dans le chapitre IV, puisqu'il a été montré que les micelles de tensioactifs permettaient une nettement moins bonne pénétration cutanée du cholécalciférol que les NPs polymériques, comme déjà remarqué pour le rétinol dans une autre étude du laboratoire <sup>41</sup>. Pourtant, les micelles de tensioactifs sont reconnues pour être beaucoup plus dynamiques que les micelles polymériques et également pour leur capacité d'extraction/solubilisation de lipides cutanés <sup>39</sup>. Même si les tests d'interactions avec la surface lipidique n'ont pas été réalisés pour les micelles de tensioactifs, il est probable qu'une forte mouillabilité/extraction de lipides soit attendue. Il semble donc que d'autres mécanismes interviennent pour expliquer les différences de pénétration cutanée entre les NPs les plus PEGylées et les micelles de tensioactifs. Différentes hypothèses peuvent être proposées :

- Afin de permettre la solubilisation du cholécalciférol, les formulations de micelles de tensioactifs sont plus concentrées que les formulations polymériques, à quantité égale de cholécalciférol. Une plus forte concentration locale du cholécalciférol dans les NPs que dans les micelles de tensioactifs peut ainsi favoriser la partition du cholécalciférol dans la peau (**Équation 1.1** chapitre I), lorsque les micelles ou NPs sont au contact direct de la peau. Cela dépend néanmoins également de la saturation de la molécule dans le vecteur (**Équation 1.5** chapitre 1).
- Les micelles de tensioactifs adhèrent beaucoup moins à la peau que les NPs polymériques (beaucoup plus stables en solutions, pas d'agrégats pouvant sédimenter)
- Les NPs polymériques s'accumulent plus dans les follicules pileux que les micelles de tensioactifs

- Les micelles se dissolvent plus rapidement dans la peau que les NPs polymériques : l'effet réservoir dans la peau est largement diminué et une plus rapide dégradation du cholécalciférol dans la peau intervient.
- Le lavage de la peau effectué avec une solution de tensioactif après le test de pénétration cutanée resolubilise/resuspend plus facilement les micelles de tensioactif en surface (ou dans les follicules) que les NPs polymériques, diminuant ainsi les valeurs de quantité de cholécalciférol absorbé.

Afin de compléter la définition des mécanismes liés aux interactions avec les lipides, il serait ainsi intéressant de déterminer si les NPs très PEGylées agissent uniquement comme promoteurs de pénétration en favorisant le mouillage/déstabilisant les lipides ou si l'amélioration de la pénétration cutanée est également liée à la forme particulière et à l'encapsulation dans le cœur polymérique. Un moyen pour déterminer cela serait de traiter la peau avec un comélange NPs très PEGylées blanches/molécule active solubilisée et comparer ces résultats à ceux obtenus à partir de NPs très PEGylées avec molécule active encapsulée. Grâce à une expérimentation similaire, Deng *et al.* ont par exemple remarqué qu'un mélange physique entre des micelles polymériques PCL-PEG blanches et du kétoconazole pur permettait une meilleure pénétration cutanée du kétoconazole par rapport à la crème commerciale. Celle-ci était tout de même largement inférieure à celle des micelles polymériques encapsulant le cholécalciférol <sup>42</sup>.

### 6.3.4 Mécanismes complémentaires à définir

#### 6.3.4.1 Devenir des nanoparticules dans la peau

Afin de préciser les mécanismes de pénétration cutanée, il serait opportun de déterminer si les NPs elles-mêmes pénètrent ou non les couches viables de la peau. En effet, si sur peau intacte, une pénétration est très peu probable en raison des dimensions de systèmes particuliers testés (100 nm) et de l'effet barrière du SC, sur peau lésée une pénétration est possible, notamment pour les particules suffisamment PEGylées stables en milieu biologique. En raison de leur agrégation, il peut être supposé que les NPs chargées de PLA et de PLA-*b*-PEG1K ne pourront pas pénétrer les couches viables, même sur peau lésée. Leur pénétration dans les follicules pileux reste toutefois envisageable malgré l'agrégation.

Une telle supposition de pénétration dépendant des contenus hydrophiles est en accord avec les conclusions récemment tirées par Zhang *et al.*<sup>43</sup>. Dans leur étude, les auteurs ont systématiquement comparé l'influence de la composition hydrophile en poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP) de NPs polymériques sur leur pénétration cutanée, et ce à la fois sur peau intacte et sur peau lésée. Il a été montré que la variation de la quantité de bloc hydrophile PVP dans des NPs de poly(acrylonitrile-co-PVP) (entre 0 et 24%<sub>o/p/p</sub>) a modulé la pénétration cutanée des NPs et ce uniquement sur peau lésée. Sur peau lésée, une plus forte pénétration dans l'épiderme et le derme des NPs fluorescentes a été mise en évidence pour les NPs les plus hydrophiles; les NPs hydrophobes de poly(acrylonitrile) seul pénétrant la peau le moins efficacement<sup>43</sup>. Cette comparaison avec les résultats et les hypothèses de ce projet reste toutefois à prendre avec précautions, pour deux raisons. La première est que, dans leur étude, les NPs n'étaient pas de tailles identiques; les particules hydrophobes étant largement plus grosses que celles ayant une surface hydrophile. La seconde est que les auteurs avancent, grâce à des études de microscopie de fluorescence sur des coupes de peau, que ce sont les NPs qui pénètrent la peau. Pourtant le fluorophore Rouge de Nil est seulement encapsulé dans les NPs, et non pas lié de manière covalente au polymère. Il est donc difficile d'affirmer que le fluorophore ne se libère pas du polymère dans la peau, et donc que la fluorescence observée n'est pas celle du fluorophore libéré depuis les NPs. Si c'est le cas, les particules nues de poly(acrylonitrile) ne permettent pas une accumulation préférentielle de la molécule fluorescente dans la peau lésée, au contraire de ce qu'il a été observé dans ce projet pour les particules de PLA nues. Pourtant ces NPs de poly(acrylonitrile) ne sont également pas stables en milieu salin<sup>44</sup>.

Un moyen pour évaluer la pénétration de NPs « organiques » polymériques est la microscopie de fluorescence, confocale ou sur coupe de peau. Cette méthode nécessite de marquer par fluorescence les NPs. Une simple encapsulation de fluorophore n'est pas recommandée en raison d'une possible libération de celui-ci même s'il est très hydrophobe. Une liaison covalente entre le polymère et le fluorophore est donc nécessaire. Une concentration suffisante en particules est également nécessaire afin de réussir à visualiser le probablement faible pourcentage de particules pénétrant la peau.

Par ailleurs, dans le chapitre V, il a été également émis comme hypothèse que les particules polymériques très PEGylées dynamiques pouvaient se dissocier dans la peau, et possiblement pénétrer la peau sous forme libre. Un tel comportement a par ailleurs déjà été postulé dans d'autres publications <sup>45-46</sup>, mais n'a jamais été vérifié par des données expérimentales. Un moyen pour confirmer ce phénomène serait de faire une expérience en transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), en visualisant la fluorescence sur la peau de NPs fabriquées à partir de polymères différemment marqués (un type donneur en FRET, et un type accepteur). Une diminution du transfert d'énergie au cours du temps de pénétration cutanée permettrait de mettre en évidence une dissociation des particules.

#### 6.3.4.2 Interactions cellulaires

Sur peau lésée, les NPs peuvent être au contact direct de l'épiderme viable. Il est donc important d'évaluer si les NPs interagissent avec les cellules épidermiques.

Comme pour la pénétration, il peut être présumé que l'internalisation cellulaire des NPs chargées de PLA, PLA-*b*-PEG1K soit limitée en raison de leur tendance à l'agrégation en milieu biologique. En ce sens, Rancan *et al.* ont par exemple montré que l'internalisation *in vitro* dans des cellules cutanées primaires des NPs de silice diminuait avec l'augmentation de la taille des agrégats <sup>47</sup>. Néanmoins, la tendance des agrégats à la sédimentation, selon leur composition, peut également au contraire augmenter le taux d'internalisation. En effet, il a été montré que l'internalisation de NPs de phosphate de calcium PEGylées dépendait de leur sédimentation à la surface des cellules. Les particules de taille élevée sédimentaient plus facilement que les plus petites particules, augmentant ainsi la concentration en particules à la surface et donc la quantité finale de particules internalisées <sup>48</sup>. Par ailleurs, bien que l'étude d'internalisation la plus simple à réaliser soit à partir de culture cellulaire *in vitro*, il est probable que ces résultats ne reflètent pas totalement les mécanismes d'internalisation qui pourraient être obtenus depuis le tissu *ex vivo* ou *in vivo*.

Concernant la toxicité cellulaire des NPs, il est attendu qu'elle soit minimale. La biocompatibilité des composants polymériques (PLA, PEG, PMPC) des NPs est en effet largement reconnue <sup>49-51</sup>. Rabanel *et al.* ont par exemple mis en évidence par des tests de cytotoxicité (LDH et Resazurine) que des NPs de PLA-PEG ne présentaient aucune toxicité sur

des cellules neuronales, et ce, indépendamment du contenu en PEG <sup>6</sup>. Il serait néanmoins nécessaire de vérifier l'absence de toxicité cellulaire et d'irritation cutanée *in vivo* pour les nanosystèmes de ce projet, notamment pour les NPs de PLA en forte concentration à la surface de la peau. Il a déjà toutefois été remarqué que ces NPs de PLA n'induisaient pas d'irritation cutanée <sup>52</sup>.

#### **6.4 Quelle est l'efficacité d'absorption cutanée des nanoparticules polymériques testées pour l'absorption du cholécalciférol dans la peau en comparaison à d'autres systèmes de la littérature ?**

Dans ce projet, la pénétration cutanée du cholécalciférol (aussi appelé vitamine D<sub>3</sub>) a été évaluée à partir des différentes compositions de NPs ; cette molécule ayant été choisie comme un simple modèle de molécule hydrophobe (LogP = 7,5, solubilité dans l'eau = 0,03 µg/mL).

Cette molécule est toutefois d'intérêt pharmaceutique. En effet, le cholécalciférol est une hormone synthétisée dans la peau sous l'action des rayons UV du soleil à partir du 7-dehydroxycholestérol et apportée par l'alimentation. Le cholécalciférol est une forme biologiquement inactive de la vitamine D, mais son métabolite actif, le calcitriol, (obtenu par métabolisation hépatique puis rénale), joue un rôle principal dans la minéralisation des os et dans la croissance du squelette en raison de sa fonction régulatrice de l'absorption et du métabolisme calcique. Un trop faible apport journalier en vitamine D<sub>3</sub> entraîne une fragilité de l'os, responsable de fractures ou de rachitisme. La vitamine D intervient également dans la régulation de la prolifération/différentiation cellulaire, permettant un effet anticancéreux, et dans la réponse immunitaire<sup>53</sup>. Les métabolites actifs de la vitamine D ou leurs analogues (ex. calcipotriol), sont donc également utilisés dans le traitement du psoriasis, en raison de l'effet anti-prolifératif et pro-différenciatif des kératinocytes et de la modulation de l'immunité innée et adaptative<sup>54</sup>.

La vitamine D<sub>3</sub> est actuellement disponible sous forme orale pour pallier les carences en vitamine D. Une forme transdermique serait également avantageuse, notamment pour les personnes souffrant de malabsorption orale des lipides. En ce sens, de rares études ont récemment évalué son absorption dans la peau à partir de formulations cutanées traditionnelles (crèmes, gels, ou pommades) et de NPs polymériques. Les quantités pénétrées obtenues ont été comparées dans le **tableau 6.3**.

Les résultats de pénétration cutanée de ce projet de thèse sont comparables aux formulations traditionnelles très concentrées en promoteurs d'absorption (i.e. moins de 1 µg de cholécalciférol retenu dans la peau). Les NPs de PLA-*b*-PEG testées dans ce projet sont donc aussi efficaces que des promoteurs d'absorption courants qui fluidifient la membrane lipidique.

Néanmoins, en comparaison aux NPs Tyrospheres®, les NPs de PEG-PLA testés permettent une nettement moins bonne rétention du cholécalciférol dans la peau (33 fois). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette observation : i) une plus petite taille des Tyrospheres® (35 % plus petite), ii) une quantité de cholécalciférol déposée sur la peau plus de 10 fois plus importante et iii) une concentration en particules 10 fois plus importante. En supposant que les Tyrospheres® (contenu ~ 30%<sub>o/p/p</sub> de PEG, calculé d'après la masse molaire indiquée) soient des NPs dynamiques et interagissant avec les lipides à l'instar des NPs de PLA-*b*-PEG les plus PEGylées, il est possible qu'une plus forte concentration de NPs, favorise l'effet promoteur de pénétration.

À l'exception de l'étude de Alsaqr *et al.*, utilisant un prétraitement de la peau avec de l'éthanol, aucune perméation du cholécalciférol dans le compartiment récepteur n'a été observée, en raison de son caractère très lipophile. Une telle absence de perméation empêche donc l'utilisation du cholécalciférol sous une forme transdermique. Une formulation transdermique de la vitamine D devrait donc plutôt être envisagée avec les métabolites ou analogues actifs de la vitamine D qui sont plus hydrophiles (ex. calcitriol log P = 5,5, solubilité dans l'eau = 6,6 µg/mL).

**Tableau 6.3** Comparaison de différentes formulations testées dans la littérature pour véhiculer le cholécalciférol à travers la peau

Type de formulation	Concentration cholécalciférol	Concentration d'adjuvants	Type de peau	Résultats	Réf.
Pommade avec différents promoteurs d'absorption	3 mg/g 11 mg/cm <sup>2</sup> déposé sur la peau	10% <sub>o/p/p</sub> de promoteurs	Peau de porc <i>in vitro</i>	0,18 µg/cm <sup>2</sup> pour pommade seule (0,002 % de la dose initiale) 0,36 µg/cm <sup>2</sup> pour pommade +dodécylamine (0,004 % de la dose initiale) 0,78 µg/cm <sup>2</sup> pour pommade +dodécylamine après prétraitement de la peau avec 50% éthanol (0,007% de la dose initiale). Du cholécalciférol est retrouvé dans le récepteur.	55
Crème ou gel avec promoteurs d'absorption	0,025 mg/g 6.7 µg/cm <sup>2</sup> déposé sur la peau	10% <sub>o/p/p</sub> de promoteurs	Peau humaine 1 mm <i>in vitro</i>	Aucune rétention du cholécalciférol dans la peau pour la forme crème. 0,12 µg/cm <sup>2</sup> dans les couches viables pour la forme gel (1,8 % de la dose initiale). Pas d'accumulation dans le SC. Pas de cholécalciférol retrouvé dans le récepteur.	56
Tyrosphere® (nanosphères de PEG-tyrosine-PEG) de 65-75 nm	80 ou 300 µg/mL 125 ou 470 µg/cm <sup>2</sup> déposé sur la peau	10 mg/mL de NPs	Peau humaine dermatomée 300-600 µm <i>in vitro</i>	~10 µg/cm <sup>2</sup> pour traitement avec 470 µg/cm <sup>2</sup> (2 % de la dose initiale) après 12h de traitements Pas de cholécalciférol retrouvé dans le récepteur.	12
NPs de PLA et PLA- <i>b</i> -PEG (différents contenus en PEG) de 100 nm	90 µg/mL 35 µg/cm <sup>2</sup> déposé sur la peau	1,2 mg/mL de NPs	Peau de porc entière 1,2 mm, intacte ou lésée par stripping <i>in vitro</i>	Jusqu'à 0,3 µg/cm <sup>2</sup> (0,8 % de la dose initiale) sur peau intacte (NPs les plus PEGylées) Jusqu'à 0,8 µg/cm <sup>2</sup> (2,2 % de la dose initiale) sur peau lésée (NPs de PLA sans PEG) Pas de cholécalciférol retrouvé dans le récepteur.	Chap IV <sup>57</sup> et V

\* Les résultats sont donnés pour un temps d'exposition sur la peau de 24 heures, sauf indication contraire

## **6.5 Est-ce qu'une composition polymérique hydrophile apporte un intérêt supplémentaire pour l'administration cutanée en comparaison à des particules hydrophobes plus simples ?**

Le développement d'une formulation cutanée à partir de NPs est conditionné à une connaissance approfondie des interactions possibles entre les NPs et la peau afin de maximiser l'efficacité. Différentes stratégies de formulation et d'administration doivent donc être développées en prenant en compte les conditions caractérisant la peau à traiter afin d'améliorer la sélectivité des formulations. Au vu de ces mécanismes d'interactions déterminés dans ce projet et des connaissances actuelles sur le comportement des NPs en milieu biologique, quelques lignes de conduite peuvent être déterminées concernant le choix de la composition polymérique selon l'application cutanée. Les avantages et inconvénients de chaque type de formulation ont été définis dans le **tableau 6.4**.

Si le but est de traiter par voie topique une pathologie cutanée caractérisée par une altération de la barrière cutanée, les NPs de PLA semblent être les plus appropriées en raison de leur agrégation et sédimentation sur la peau, pouvant favoriser l'absorption cutanée. De plus, cette agrégation des NPs réduit fortement leur possibilité de pénétration dans la peau, pouvant ainsi être un gage d'innocuité. Au contraire, si la pathologie nécessite des concentrations importantes de principes actifs pour son traitement, des NPs plus fortement PEGylées seraient nécessaires, car il est plus simple de concentrer ce type de NPs sans déstabilisation lors de la fabrication que celles de PLA. Il est toutefois important de prendre en compte que le type de formulation dans laquelle seront incorporées les NPs aura également son influence. En effet, i) dans une formulation visqueuse, les NPs de PLA pourraient s'agréger et sédimenter moins rapidement en réponse au sel et ii) dans une formulation trop riche en tensioactifs, les NPs très PEGylées pourraient totalement se dissocier, ce qui pourrait notablement réduire l'efficacité.

Si le but est de véhiculer un agent thérapeutique par voie transdermique sur peau saine, avec notamment l'utilisation complémentaire de procédés physiques (cités dans le chapitre I, partie *1.1.3.3 Application de forces physiques*), les recommandations sont différentes, puisque la pénétration du vecteur lui-même peut être souhaitée.

Par exemple, si l'objectif est de délivrer un vaccin dans la peau (ciblage des cellules immunitaires) à l'aide de microaiguilles ou de iontophorèse pour favoriser sa pénétration, son encapsulation dans des NPs de PLA ou de PLA faiblement PEGylé, semble avantageuse de prime abord en raison de leur caractère plus immunogène que les particules fortement PEGylées et de leur charge (iontophorèse). Toutefois, la diffusion des nanoparticules de PLA jusqu'à la cible sera probablement défavorisée en raison de l'agrégation des particules dans les couches viables de la peau riches en espèces salines. En ce sens, Coulman *et al.* ont par exemple reporté que des NPs positivement chargées de PS-amine bouchaient les pores formés par des microaiguilles, diminuant ainsi leur pénétration au cours du temps <sup>58</sup>. Pour une application vaccinale transdermique, des NPs avec une dense couche hydrophile seraient donc préférables en raison de leur stabilité en milieu biologique, favorisant leur possible pénétration, d'autant plus que de plus fortes concentrations et plus petites tailles de particules sont atteignables. Toutefois, une plus faible reconnaissance de ces NPs par le système immunitaire est possible <sup>59</sup>, ce qui pourrait diminuer leur caractère immunogène et donc l'efficacité vaccinale.

Si l'objectif est de délivrer un principe actif « classique » dans la circulation sanguine, alors les NPs avec une dense couche hydrophile pourraient également être préférables pour les raisons citées ci-dessus (plus petite taille possible, plus forte concentration). De plus, si la pénétration des NPs est souhaitée (induite par une méthode physique par exemple), leur stabilité biologique et la diminution de leur reconnaissance par le système immunitaire pourrait permettre d'augmenter leur temps de résidence dans la peau/circulation et donc permettre un effet thérapeutique prolongé.

**Tableau 6.4** Récapitulatif des avantages/inconvénients des NPs selon la composition polymérique et le type d'application cutanée

Particule	Application topique		Application transdermique	
	Avantages	Inconvénients	Avantages	Inconvénients
<b>PLA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agrégation induite par les espèces salines et sédimentation favorisant l'absorption</li> <li>▪ Agrégation donc pénétration des NPs limitée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Formulations faiblement concentrées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Immunogénicité (vaccination)</li> <li>▪ Charge négative (iontophorèse)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agrégation donc pénétration des NPs limitée</li> <li>▪ Formulations faiblement concentrées</li> <li>▪ Reconnaissance par le RES</li> </ul>
<b>PLA peu PEGylée</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agrégation donc pénétration des NPs limitée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Formulations faiblement concentrées</li> <li>▪ Agrégation sans sédimentation donc peu de contact et de pénétration de la substance active</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Immunogénicité (vaccination)</li> <li>▪ Charge négative (iontophorèse)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agrégation donc pénétration des NPs limitée</li> <li>▪ Formulations faiblement concentrées</li> <li>▪ Reconnaissance par le RES</li> </ul>
<b>PLA moyennement PEGylée /PLA-PMPC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Possibilité de formulations plus concentrées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Pas de sédimentation donc peu de contact et de pénétration de la substance active</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Possibilité de formulations plus concentrées</li> <li>▪ Stabilité en milieu biologique</li> <li>▪ Faible reconnaissance par le RES si pénétration des NPs</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caractère immunogène moins important (vaccination)</li> <li>▪ Pas de charge (iontophorèse)</li> </ul>
<b>PLA très PEGylée</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Possibilité de formulations plus concentrées</li> <li>▪ Mouillabilité favorisant le contact</li> <li>▪ Faibles tailles de NPs atteignables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dissociation si grande quantité d'excipients tensioactifs dans la formulation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Possibilité de formulations plus concentrées</li> <li>▪ Stabilité en milieu biologique</li> <li>▪ Faible reconnaissance par le RES si pénétration des NPs</li> <li>▪ Faibles tailles de NPs atteignables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Caractère immunogène moins important (vaccination)</li> <li>▪ Pas de charge (iontophorèse)</li> <li>▪ Dissociation si grande quantité d'excipients tensioactifs dans la formulation</li> </ul>

**-Chapitre VII-**  
**Conclusion Générale**

L'hypothèse de recherche testée dans ce projet était que la composition hydrophile des polymères influence la structure des NPs et leurs propriétés de surface et, par conséquent, conditionne les interactions peau-particules et la pénétration d'une substance active encapsulée selon la condition de la peau. À travers les différents objectifs de recherche de ce projet, cette hypothèse a été expérimentalement validée en montrant que :

- La taille, les propriétés de surface et la morphologie des NPs, ainsi que la stabilité colloïdale et le rendement de fabrication sont des propriétés dépendantes de la composition hydrophile des copolymères utilisés pour leur fabrication. De plus, bien que l'encapsulation du cholécalciférol, une molécule très hydrophobe, ne soit pas affectée par la composition polymérique, sa stabilité chimique dépend en revanche du type de NPs.
- La taille des NPs peut être facilement et finement contrôlée par le procédé de fabrication utilisé, permettant ainsi de la moduler selon l'application souhaitée
- Sur peau intacte, la composition hydrophile des NPs polymériques influence peu la pénétration cutanée du cholécalciférol (à taille égale de NPs). En comparaison aux NPs peu PEGylées, les NPs très PEGylées ont toutefois un plus fort effet promoteur d'absorption du cholécalciférol.
- Sur peau lésée, la composition hydrophile a une plus nette influence la pénétration cutanée du cholécalciférol en raison de différentes interactions peau-particules. Les plus importants taux d'absorption du cholécalciférol ont été observés après traitement par les particules lipophiles de PLA. En comparaison aux NPs faiblement PEGylées, les NPs très PEGylées ont également un plus fort effet promoteur d'absorption de la substance active. Il est toutefois important de préciser que des conclusions différentes pourraient être obtenues avec une substance active plus hydrophile.
- La composition hydrophile influence les interactions entre les NPs et les composantes cutanées. Il a été montré que la dynamique de la structure des NPs et son caractère amphiphile jouait un rôle sur les interactions avec les lipides cutanés et/ou la mouillabilité de la surface de la peau. Par ailleurs, il a été mis en évidence que la composition de la peau a une influence essentielle sur le devenir de la structure des NPs, une fois déposées sur la peau, dépendamment de leur composition hydrophile. Ces

différentes interactions peau/particules sont à prendre en compte, car elles peuvent contrôler les mécanismes de pénétration cutanée.

Comme présentées en discussion, différentes études complémentaires pourraient être abordées en perspectives de ce projet. Un approfondissement d'autres aspects des interactions peau-particules, notamment sur peau lésée, serait notamment intéressant, afin de pouvoir répondre aux questions suivantes. Est-ce que les NPs, dépendamment de leur composition, pénètrent les couches viables de la peau lésée ? En cas de pénétration dans ces couches viables, est-ce que les NPs peuvent être internalisées dans les cellules épidermales ? Est-ce que l'incorporation des NPs dans une formulation semi-solide influence leur comportement sur la peau et particulièrement leur stabilité ? Sur peau pathologique *in vivo*, est-ce que d'autres composants de la peau, comme l'inflammation, modifient les interactions peau-particules ? Est-ce que les formulations de NPs testées sont irritantes et est-ce que l'irritation dépend de la composition polymérique ? D'autre part, des études plus complètes seraient nécessaires pour évaluer plus spécifiquement l'intérêt du bloc hydrophile PMPC sur les interactions cutanées.

En conclusion, le développement d'une nanoformulation, la plus efficace possible, repose sur la maîtrise du procédé utilisé pour la fabriquer et sur la connaissance des facteurs contrôlant les interactions peau-particules, liés à la fois aux propriétés des NPs et à celles des structures biologiques à atteindre. Il est notamment important de retenir que la structure des NPs polymériques peut être fortement modifiée au contact de la peau, dépendamment de l'état pathologique de celle-ci.

Néanmoins, il est également important de souligner que l'utilisation de nanosystèmes n'est pas nécessairement la solution « idéale » pour résoudre tous les défis liés à la délivrance de molécules pharmaceutiques dans la peau, comme récemment mentionnée par MS Roberts<sup>60</sup>. En effet, l'avenir clinique de ces NPs reste relatif à la démonstration d'avantages spécifiques et significatifs (facilité d'application, pénétration cutanée, sélectivité, toxicité) apportés en comparaison à des formulations plus traditionnelles pouvant déjà être disponibles commercialement. Par ailleurs, des facteurs commerciaux doivent également être pris en compte pour le développement clinique de ces nanoformulations, tels que le coût et la facilité de fabrication. Il est de plus important de relever que l'actuelle perception des

consommateurs/patients envers les nanotechnologies risque d'être un frein à la commercialisation et/ou au succès commercial de ces formulations.

**Références bibliographiques Chapitres VI et VII**

- (1) Riley, T.; Heald, C. R.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; King, S. M.; Heenan, R. K.; Purkiss, S. C.; Barlow, R. J.; Gellert, P. R.; Washington, C. Core-Shell Structure of PLA-PEG Nanoparticles Used for Drug Delivery. *Langmuir* **2003**, *19* (20), 8428-8435
- (2) Riley, T.; Stolnik, S.; Heald, C. R.; Xiong, C. D.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S.; Purkiss, S. C.; Barlow, R. J.; Gellert, P. R. Physicochemical Evaluation of Nanoparticles Assembled from Poly(lactic acid)-Poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) Block Copolymers as Drug Delivery Vehicles. *Langmuir* **2001**, *17* (11), 3168-3174
- (3) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (19), 10374-10385
- (4) Saad, W. S.; Prud'homme, R. K. Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation. *Nano Today* **2016**, *11* (2), 212-227
- (5) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Tehrani, S. F.; Lalloz, A.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of the Polymer Architecture on the Structural and Biophysical Properties of PEG-PLA Nanoparticles. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**,
- (6) Rabanel, J.-M.; Faivre, J.; Paka, G. D.; Ramassamy, C.; Hildgen, P.; Banquy, X. Effect of polymer architecture on Curcumin encapsulation and release from PEGylated polymer nanoparticles: toward a drug delivery nano-platform to the CNS. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**,
- (7) Rabanel, J.-M.; Hildgen, P.; Banquy, X. Assessment of PEG on polymeric particles surface, a key step in drug carrier translation. *Journal of Controlled Release* **2014**, *185*, 71-87
- (8) Cui, H.; Hodgdon, T. K.; Kaler, E. W.; Abezgauz, L.; Danino, D.; Lubovsky, M.; Talmon, Y.; Pochan, D. J. Elucidating the assembled structure of amphiphiles in solution via cryogenic transmission electron microscopy. *Soft Matter* **2007**, *3* (8), 945-955
- (9) Nicolai, T.; Colombani, O.; Chassenieux, C. Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers. *Soft Matter* **2010**, *6* (14), 3111-3118
- (10) Creutz, S.; van Stam, J.; Antoun, S.; De Schryver, F. C.; Jérôme, R. Exchange of Polymer Molecules between Block Copolymer Micelles Studied by Emission Spectroscopy. A Method for the Quantification of Unimer Exchange Rates. *Macromolecules* **1997**, *30* (14), 4078-4083
- (11) Creutz, S.; van Stam, J.; De Schryver, F. C.; Jérôme, R. Dynamics of Poly((dimethylamino)alkyl methacrylate-block-sodium methacrylate) Micelles. Influence of Hydrophobicity and Molecular Architecture on the Exchange Rate of Copolymer Molecules. *Macromolecules* **1998**, *31* (3), 681-689
- (12) Ramezanli, T.; Kilfoyle, B. E.; Zhang, Z.; Michniak-Kohn, B. B. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516* (1), 196-203
- (13) Deng, P.; Teng, F.; Zhou, F.; Song, Z.; Meng, N.; Liu, N.; Feng, R. Y-shaped methoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone)-based micelles for skin delivery of ketoconazole: in vitro study and in vivo evaluation. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2017**, *78*, 296-304
- (14) Fu, K.; Pack, D. W.; Klibanov, A. M.; Langer, R. Visual Evidence of Acidic Environment Within Degrading Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) Microspheres. *Pharmaceutical Research* **2000**, *17* (1), 100-106
- (15) Zhu, G.; Mallery, S. R.; Schwendeman, S. P. Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly(lactide-co-glycolide). *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 52
- (16) Almouazen, E.; Bourgeois, S.; Jordheim, L.; Fessi, H.; Briançon, S. Nano-encapsulation of Vitamin D3 Active Metabolites for Application in Chemotherapy: Formulation Study and in Vitro Evaluation. *Pharm. Res.* **2013**, *30* (4), 1137-1146
- (17) Fontana, M. C.; Coradini, K.; Guterres, S. S.; Pohlmann, A. R.; Beck, R. C. R. Nanoencapsulation as a Way to Control the Release and to Increase the Photostability of Clobetasol Propionate: Influence of the Nanostructured System. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2009**, *5* (3), 254-263

- (18) Nieva-Echevarría, B.; Manzanos, M. J.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D. 2,6-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene and Its Metabolites in Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2015**, *14* (1), 67-80
- (19) Peracchia, M. T.; Gref, R.; Minamitake, Y.; Domb, A.; Lotan, N.; Langer, R. PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics I. *J. Controlled Release* **1997**, *46* (3), 223-231
- (20) Tehrani, S.F.; Bernard-Patrynski, F.; Puscas, I.; Leclair, G.; Hildgen.; Roullin, V.G., Length of surface PEG modulate nanocarrier transcytosis across brain barrier vascular endothelial cells. *Nanomedicine* **2018**.
- (21) Du, X.-J.; Wang, J.-L.; Liu, W.-W.; Yang, J.-X.; Sun, C.-Y.; Sun, R.; Li, H.-J.; Shen, S.; Luo, Y.-L.; Ye, X.-D.; Zhu, Y.-H.; Yang, X.-Z.; Wang, J. Regulating the surface poly(ethylene glycol) density of polymeric nanoparticles and evaluating its role in drug delivery in vivo. *Biomaterials* **2015**, *69*, 1-11
- (22) Redhead, H. M.; Davis, S. S.; Illum, L. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70* (3), 353-363
- (23) VandeVondele, S.; Vörös, J.; Hubbell, J. A. RGD-grafted poly-l-lysine-graft-(polyethylene glycol) copolymers block non-specific protein adsorption while promoting cell adhesion. *Biotechnology and Bioengineering* **2003**, *82* (7), 784-790
- (24) Breed, D. R.; Thibault, R.; Xie, F.; Wang, Q.; Hawker, C. J.; Pine, D. J. Functionalization of Polymer Microspheres Using Click Chemistry. *Langmuir* **2009**, *25* (8), 4370-4376
- (25) Meng, F.; Engbers, G. H. M.; Feijen, J. Polyethylene glycol-grafted polystyrene particles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *70A* (1), 49-58
- (26) Chrit, L.; Bastien, P.; Biatry, B.; Simonnet, J. T.; Potter, A.; Minondo, A. M.; Flament, F.; Bazin, R.; Sockalingum, G. D.; Leroy, F.; Manfait, M.; Hadjur, C. In vitro and in vivo confocal Raman study of human skin hydration: Assessment of a new moisturizing agent, pMPC. *Biopolymers* **2007**, *85* (4), 359-369
- (27) Jain, S.; Tiwary, A.; Jain, N. PEGylated elastic liposomal formulation for lymphatic targeting of zidovudine. *Current drug delivery* **2008**, *5* (4), 275-281
- (28) Knudsen, N. Ø.; Rønholt, S.; Salte, R. D.; Jørgensen, L.; Thormann, T.; Basse, L. H.; Hansen, J.; Frøkjær, S.; Foged, C. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *81* (3), 532-539
- (29) Kosakowska, K. A.; Casey, B. K.; Kurtz, S. L.; Lawson, L. B.; Grayson, S. M. Evaluation of Amphiphilic Star/Linear-Dendritic Polymer Reverse Micelles for Transdermal Drug Delivery: Directing Carrier Properties by Tailoring Core versus Peripheral Branching. *Biomacromolecules* **2018**,
- (30) Shim, J.; Seok Kang, H.; Park, W. S.; Han, S. H.; Kim, J.; Chang, I. S. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymer nanoparticles. *J. Controlled Release* **2004**, *97* (3), 477-84
- (31) Vega, E.; Egea, M. A.; Garduño-Ramírez, M. L.; García, M. L.; Sánchez, E.; Espina, M.; Calpena, A. C. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: Role of hydroxy- $\beta$ -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. *Colloids Surf., B* **2013**, *110* (0), 339-346
- (32) Djordjevic, J.; Michniak, B.; Uhrich, K. E. Amphiphilic star-like macromolecules as novel carriers for topical delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *AAPS pharmSci* **2003**, *5* (4), E26
- (33) Hsiao, P. F.; Peng, S.; Tang, T.-C.; Lin, S.-Y.; Tsai, H.-C. Enhancing the in vivo transdermal delivery of gold nanoparticles using poly(ethylene glycol) and its oleylamine conjugate. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 1867-1878
- (34) Pegoraro, C.; Cecchin, D.; Madsen, J.; Warren, N.; Armes, S. P.; MacNeil, S.; Lewis, A.; Battaglia, G. Translocation of flexible polymersomes across pores at the nanoscale. *Biomaterials science* **2014**, *2* (5), 680-692
- (35) Rancan, F.; Todorova, A.; Hadam, S.; Papakostas, D.; Luciani, E.; Graf, C.; Gernert, U.; Rühl, E.; Verrier, B.; Sterry, W.; Blume-Peytavi, U.; Vogt, A. Stability of polylactic acid particles and release of

- fluorochromes upon topical application on human skin explants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *80* (1), 76-84
- (36) Sato, K.; Kang, W. H.; Saga, K.; Sato, K. T. Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *Journal of the American Academy of Dermatology* **1989**, *20* (4), 537-563
- (37) Müller, R. H.; Radtke, M.; Wissing, S. A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, Supplement (0), S131-S155
- (38) Boncheva, M.; Damien, F.; Normand, V. Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2008**, *1778* (5), 1344-1355
- (39) Lemery, E.; Briancon, S.; Chevalier, Y.; Oddos, T.; Gohier, A.; Boyron, O.; Bolzinger, M. A. Surfactants have multi-fold effects on skin barrier function. *European journal of dermatology : EJD* **2015**, *25* (5), 424-35
- (40) Kirjavainen, M.; Urtti, A.; Jääskeläinen, I.; Suhonen, T. M.; Paronen, P.; Valjakka-Koskela, R.; Kiesvaara, J.; Mönkkönen, J. Interaction of liposomes with human skin in vitro—the influence of lipid composition and structure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1996**, *1304* (3), 179-189
- (41) Laredj-Bouezg, F.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Rovère, M.-R.; Smatti, B.; Chevalier, Y. Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). *Int. J. Pharm.* **2015**, *496* (2), 1034-1046
- (42) Deng, P.; Teng, F.; Zhou, F.; Song, Z.; Meng, N.; Liu, N.; Feng, R. Y-shaped methoxy poly (ethylene glycol)-block-poly (epsilon-caprolactone)-based micelles for skin delivery of ketoconazole: in vitro study and in vivo evaluation. *Materials Science and Engineering: C*,
- (43) Zhang, N.; Said, A.; Wischke, C.; Kral, V.; Brodewolf, R.; Volz, P.; Boreham, A.; Gerecke, C.; Li, W.; Neffe, A. T.; Kleuser, B.; Alexiev, U.; Lendlein, A.; Schäfer-Korting, M. Poly[acrylonitrile-co-(N-vinyl pyrrolidone)] nanoparticles – Composition-dependent skin penetration enhancement of a dye probe and biocompatibility. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2017**, *116*, 66-75
- (44) Boguslavsky, L.; Baruch, S.; Margel, S. Synthesis and characterization of polyacrylonitrile nanoparticles by dispersion/emulsion polymerization process. *Journal of Colloid and Interface Science* **2005**, *289* (1), 71-85
- (45) Vogt, A.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Ma, N.; Alexiev, U.; Lendlein, A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? *Journal of Controlled Release* **2016**, *242*, 3-15
- (46) Lapteva, M.; Möller, M.; Kalia, Y. N. Polymeric Micelles in Dermal and Transdermal Delivery. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers*; Dragicevic, N.; Maibach, H. I., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2016; pp 223-240.
- (47) Rancan, F.; Gao, Q.; Graf, C.; Troppens, S.; Hadam, S.; Hackbarth, S.; Kembuan, C.; Blume-Peytavi, U.; Rühl, E.; Lademann, J. r. Skin penetration and cellular uptake of amorphous silica nanoparticles with variable size, surface functionalization, and colloidal stability. *ACS nano* **2012**, *6* (8), 6829-6842
- (48) Huang, X.; Andina, D.; Ge, J.; Labarre, A.; Leroux, J.-C.; Castagner, B. Characterization of Calcium Phosphate Nanoparticles Based on a PEGylated Chelator for Gene Delivery. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9* (12), 10435-10445
- (49) Anderson, J. M.; Shive, M. S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Advanced drug delivery reviews* **1997**, *28* (1), 5-24
- (50) Alcantar, N. A.; Aydil, E. S.; Israelachvili, J. N. Polyethylene glycol-coated biocompatible surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* **2000**, *51* (3), 343-351

- (51) Kojima, M.; Ishihara, K.; Watanabe, A.; Nakabayashi, N. Interaction between phospholipids and biocompatible polymers containing a phosphorylcholine moiety. *Biomaterials* **1991**, *12* (2), 121-124
- (52) Boisgard, A. S.; Lamrayah, M.; Dzikowski, M.; Salmon, D.; Kirilov, P.; Primard, C.; Pirot, F.; Fromy, B.; Verrier, B. 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**, *116*, 51-60
- (53) Holick, M. F. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine* **2007**, *357* (3), 266-281
- (54) Holick, M. F.; Smith, E.; Pincus, S. Skin as the site of vitamin D synthesis and target tissue for 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: use of calcitriol (1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>) for treatment of psoriasis. *Archives of dermatology* **1987**, *123* (12), 1677-1683a
- (55) Alsaqr, A.; Rasouly, M.; Musteata, F. M. Investigating Transdermal Delivery of Vitamin D<sub>3</sub>. *AAPS PharmSciTech* **2015**, 1-10
- (56) Costa, G. M. D. A.; de Oliveira Pinto, C. A. S.; Leite-Silva, V. R.; Baby, A. R.; Velasco, M. V. R. Is Vitamin D<sub>3</sub> Transdermal Formulation Feasible? An Ex Vivo Skin Retention and Permeation. *AAPS PharmSciTech* **2018**, 1-8
- (57) Lalloz, A.; Bolzinger, M.-A.; Faivre, J.; Latreille, P.-L.; Garcia Ac, A.; Rakotovo, C.; Rabanel, J.-M.; Hildgen, P.; Banquy, X.; Briançon, S. Effect of surface chemistry of polymeric nanoparticles on cutaneous penetration of cholecalciferol. *Int. J. Pharm.* **2018**, *553* (1), 120-131
- (58) Coulman, S. A.; Anstey, A.; Gateley, C.; Morrissey, A.; McLoughlin, P.; Allender, C.; Birchall, J. C. Microneedle mediated delivery of nanoparticles into human skin. *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *366* (1-2), 190-200
- (59) Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R. H. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids Surf., B* **2000**, *18* (3-4), 301-313
- (60) Roberts, M.; Mohammed, Y.; Pastore, M.; Namjoshi, S.; Yousef, S.; Alinaghi, A.; Haridass, I.; Abd, E.; Leite-Silva, V.; Benson, H. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release* **2017**, *247*, 86-10

