

Université de Montréal

**Développement de nouveaux systèmes de délivrance de
substances actives administrées par la voie transcutanée**

par

Cloé Esposito

Faculté de pharmacie
Université de Montréal

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
option technologie pharmaceutique

Octobre, 2021

© Cloé Esposito, 2021

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Développement de nouveaux systèmes de délivrance de substances actives administrées par la
voie transcutanée

Présentée par :

Cloé Esposito

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

François-Xavier Lacasse, président-rapporteur

Sylvie Marleau, directrice de recherche

Plamen Kirilov, co-directeur

Marc Lavertu, membre du jury

Guillaume Bastiat, examinateur externe

Résumé

Le développement de nouveaux systèmes pour l'administration de médicaments par la voie transcutanée ne cesse de susciter un intérêt croissant pour élaborer de nouvelles stratégies visant à traverser la barrière du *stratum corneum* et transporter efficacement les agents thérapeutiques à travers la peau. Bien que l'administration par voie orale soit la plus favorable chez les patients, une faible biodisponibilité est souvent rencontrée pour certains médicaments et notamment pour les produits biopharmaceutiques. Ainsi, la peau représente un site accessible et pratique pour l'absorption de médicaments, mais détient un potentiel encore sous-estimé comme voie alternative à l'administration par voie orale. La conception de systèmes d'administration parentérale prolongée de médicaments capables de contrôler la libération du médicament au long terme et réduire la fréquence d'administration des médicaments pourrait présenter une option de traitement attrayante. Parmi les systèmes d'implants se formant *in situ*, les implants d'organogel offrent de nombreux avantages pour libérer au long terme une grande variété de molécules médicamenteuses et notamment des substances actives lipophiles piégées dans les huiles gélifiées. Cependant si l'objectif visé est une administration minimalement invasive et rapide de substances actives, les timbres de microaiguilles dissolvant dans la peau seraient d'un grand intérêt en raison de leur auto-administration, leur sécurité d'emploi et leur capacité à administrer des médicaments à base de peptides. Malgré les effets bénéfiques de ces deux nouveaux systèmes d'administration, les rôles exacts de la composition des organogels et des paramètres géométriques des microaiguilles hydrosolubles sur la libération de médicaments restent peu explorés.

Le premier objectif principal de cette thèse était de déterminer l'effet de la composition des organogels se formant *in situ* par rapport au pourcentage massique en organogélifiant de bas poids moléculaire (acide 12-hydroxystéarique, 12-HSA) et de l'ajout de tensioactif (polysorbate 80) dans le système sur le taux de libération de substances actives hydrophile (acyclovir) et lipophile (clotrimazole). De plus, l'influence des paramètres de composition de ces organogels sur l'induction d'effets toxiques au niveau des fibroblastes de prépuce humain a également été étudiée. Pour ce faire, des systèmes d'organogel formant un dépôt sous-cutané à base de 12-HSA ont été développés en utilisant une faible quantité de solvant organique miscible à l'eau (N-méthyl-2-pyrrolidone) en tant qu'agent inhibant partiellement la gélation, favorisant ainsi l'injection des formulations. Au contact du milieu aqueux, les molécules de 12-HSA ont précipité en immobilisant simultanément

l'huile et la substance active en son sein. Une augmentation du pourcentage massique en 12-HSA a conduit à une augmentation de la résistance du gel à la déformation grâce à la formation d'une structure de réseau en trois dimensions complexe. Cependant, l'ajout de polysorbate 80 dans le système a conduit à une structure plus fluide (de faible résistance) diminuant la capacité d'injectabilité des formulations et augmentant l'érosion du gel en surface. Ce dernier phénomène étant amplifié avec un plus faible pourcentage massique en 12-HSA. Les organogels de 12-HSA ont montré diminuer significativement les taux de libération au long terme de l'acyclovir comparé aux formulations de clotrimazole *in vitro* et *ex vivo* à travers la peau de porc excisé. La toxicité cellulaire était dépendante du pourcentage massique en 12-HSA et du type de culture cellulaire utilisée. En effet, les effets cytotoxiques étaient plus élevés en augmentant la quantité de 12-HSA dans l'implant pour une sensibilité plus élevée dans la culture cellulaire tridimensionnelle que dans celle bidimensionnelle. Ces résultats semblent néanmoins influencés par le type d'huile utilisé et son potentiel cytotoxique.

Le deuxième objectif principal de cette thèse était de déterminer l'effet de la hauteur des microaiguilles en forme de pyramide et solubles dans l'eau sur le taux de libération d'un peptide modèle, le *growth hormone-releasing peptide-6* (GHRP-6). À cet effet, les microaiguilles ont été préparées par micro-moulage à l'aide de deux polymères biocompatibles hydrosolubles approuvés par la *Food and Drug Agency* (FDA), l'alcool polyvinylique (PVA) et polyvinylpyrrolidone (PVP). Les timbres de microaiguilles ainsi développés permettaient de pénétrer efficacement dans la peau de porc tout en libérant la molécule encapsulée à l'interface entre l'épiderme et le derme supérieur. La quantification du GHRP-6 dans différentes matrices (peau, microaiguilles, plasma) a pu être réalisée grâce à une méthode analytique robuste et sensible utilisant la chromatographie liquide ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Les études de libération du GHRP-6 *ex vivo* sur la peau de porc ont montré que le taux de libération du GHRP-6 était plus élevé au long terme pour une hauteur en aiguille plus grande (800 μm contre 500 μm) tout en permettant d'augmenter l'encapsulation du GHRP-6 dans le système.

En conclusion, ces résultats suggèrent que les organogels de 12-HSA pourraient constituer une approche prometteuse pour l'administration prolongée de substance active et notamment celles hydrophiles. Toutefois, les formulations développées devront être efficaces *in vivo* tout en minimisant les effets toxiques par l'utilisation d'huiles plus biocompatibles. Pour une libération

rapide de substances actives, les timbres de microaiguilles représentent une avenue très prometteuse notamment pour les médicaments innovants de nature peptidique. Leur efficacité pour la libération de GHRP-6 et de leurs dérivés azapeptides devra être confirmée lors d'études *in vivo* (pharmacocinétique, pharmacodynamique, biodistribution), ce qui pourrait constituer une avancée dans l'administration de thérapie à base de peptides pour la gestion de l'inflammation chronique.

Mots-clés : organogels, LMOGs, acide 12-hydroxystéarique, absorption cutanée, timbre de microaiguilles, GHRP-6, cytotoxicité, implants se formant *in situ*

Abstract

The development of novel transcutaneous drug delivery systems has gained increasing interest, with the focus on overcoming the *stratum corneum* barrier and efficiently transport therapeutic agents through the skin. Although oral administration is the most favorable route for patients, low bioavailability is often reported for certain drugs and especially for biopharmaceuticals. Accordingly, the skin represents an accessible and convenient site for drug absorption, but has yet to fully achieve its potential as an alternative to oral delivery. The design of parenteral sustained drug delivery systems capable of controlling long-term delivery of drugs and reducing the frequency of drug administration could present an attractive treatment option. Among *in situ* forming implants, *in situ* forming organogels offer many advantages such as controlled-release of a wide variety of drug molecules over a longer period of time, including lipophilic active substances trapped within gelled oil solutions. However, if the objective is the rapid administration of active substances, minimally invasive, dissolving microneedle patches would be of great interest due to their self-administration, their safety and their ability to deliver peptide-based drugs. Despite the beneficial effects of these two new delivery systems, the exact roles of the composition of organogels and geometrical parameters of microneedles on drug delivery are largely understudied.

The first main objective of this thesis was to determine the effect of the composition of *in situ* forming organogels with respect to the organogelator concentration (12-hydroxystearic acid, 12-HSA) and the addition of a nonionic surfactant (polysorbate 80) to the system on the release rate of a hydrophilic (acyclovir) and a lipophilic (clotrimazole) active substances. In addition, the toxic effects of these organogels of different compositions on human foreskin fibroblasts were also studied. To do so, 12-HSA-based organogel systems forming a depot in the subcutaneous tissue have been developed using a small amount of water-miscible organic solvent (N-methyl-2-pyrrolidone) as an agent that can partially inhibit gelation, thus enhancing injectability of the formulations. Upon contact with aqueous medium, 12-HSA molecules precipitated simultaneously immobilizing the oil and the active substance therein. An increase in the concentration of 12-HSA led to an increase in the resistance of the gel to deformation thanks to the formation of a complex three-dimensional network structure. However, the addition of polysorbate 80 to the system resulted in fluid-matrix organogel (weak gel) decreasing the syringability of the formulations while

increasing the erosion of the gel on the surface. The latter phenomenon is also intensified with a lower concentration of 12-HSA. 12-HSA organogels have been shown to significantly decrease acyclovir release rates for a longer time period *in vitro* and *ex vivo* through excised pig skin compared to clotrimazole formulations. Cellular cytotoxicity was dependent on the concentration of 12-HSA and the type of cell culture used. Indeed, the cytotoxic effects were higher by increasing the concentration of 12-HSA in the implant for a higher sensitivity in the three-dimensional cell culture than in the two-dimensional one. However, these results seem to be influenced by the type of oil used and its cytotoxic potential.

The second main objective of this thesis was to determine the effect of dissolving pyramidal microneedles height on the release rate of a model peptide, the growth hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6). For this purpose, the microneedles were prepared by micromolding process using two water-soluble biocompatible polymers approved by the Food and Drug Agency (FDA), poly(vinyl alcohol) (PVA) and polyvinylpyrrolidone (PVP). The microneedle patches allowed the microneedles to efficiently penetrate pig skin while releasing the encapsulated molecule at the interface between the epidermis and upper dermis. The quantification of GHRP-6 in different matrices (skin, microneedles, plasma) was achieved using a robust and sensitive analytical method using ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Ex vivo* GHRP-6 release studies on pig skin showed that the release rate of GHRP-6 was higher over time for high-height microneedle (800 μm vs. 500 μm) while increasing the amount of GHRP-6 loaded in microneedles.

In conclusion, these results suggest that 12-HSA organogels could constitute a promising approach as a sustained-release dosage form of active substances and in particular hydrophilic ones. However, the formulations developed must be effective *in vivo* while minimizing toxic effects through the use of more biocompatible oils. For a rapid release of drugs, microneedle patches represent a very promising avenue, in particular for emerging peptide drugs. Their efficacy for the release of GHRP-6 and azapeptide derivatives of GHRP-6 needs to be confirmed using *in vivo* studies (pharmacokinetic, pharmacodynamic, biodistribution), which may represent a breakthrough in the transdermal delivery of therapeutic peptides for the management of chronic inflammation.

Keywords : organogels, LMOGs, 12-hydroxystearic acid, skin absorption, microneedle patch, GHRP-6, cytotoxicity, *In situ* forming implants

Table des matières

RÉSUMÉ	I
ABSTRACT	IV
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES ABREVIATIONS	XIII
REMERCIEMENTS	XVII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1. LA PEAU ET L'ABSORPTION CUTANÉE DE SUBSTANCES ACTIVES PAR VOIE TRANSDERMIQUE.....	2
1.1.1. La physiologie de la peau : structure et fonctions	3
1.1.1.1. <i>La structure de la peau</i>	3
1.1.1.1.1. L'épiderme.....	4
1.1.1.1.2. Le derme	10
1.1.1.1.3. L'hypoderme	12
1.1.1.1.4. Les annexes cutanées	13
1.1.1.1.5. La vascularisation et l'innervation cutanée.....	16
1.1.1.2. <i>Les fonctions cutanées</i>	20
1.1.1.2.1. La peau, une barrière protectrice	20
1.1.1.2.2. La fonction de thermorégulation	23
1.1.1.2.3. La fonction métabolique.....	24
1.1.2. L'absorption cutanée de substances actives par voie transdermique.....	25
1.1.2.1. <i>Les voies de passage transcutané</i>	25
1.1.2.2. <i>Le mécanisme d'absorption percutanée</i>	29
1.1.2.2.1. Le coefficient de partage	30
1.1.2.2.2. La taille / le poids moléculaire et la forme.....	31
1.1.2.2.3. L'ionisation de la substance active	32
1.1.2.3. <i>Les méthodologies pour améliorer la pénétration et l'absorption de substances actives</i>	33
1.1.2.3.1. La première génération de systèmes transdermiques	35
1.1.2.3.2. La deuxième génération de systèmes transdermiques.....	36
1.1.2.3.2.1. L'interaction médicament-véhicule	36
1.1.2.3.2.2. Les vecteurs d'administration	37
1.1.2.3.2.3. La modification de la barrière cutanée	40
1.1.2.3.3. La troisième génération de systèmes transdermiques	42
1.1.2.4. <i>Les facteurs d'exposition à la substance active modifiant l'absorption percutanée</i>	46
1.2. LES TECHNOLOGIES PHARMACEUTIQUES APPLICABLES PAR VOIE TRANSCUTANÉE.....	50
1.2.1. Les principaux systèmes d'administration de médicaments par voies transdermique et parentérale	50
1.2.1.1. <i>Les systèmes d'implant se formant in situ pour la libération prolongée de médicaments</i>	50
1.2.1.1.1. Les avantages des systèmes d'implant se formant <i>in situ</i>	51
1.2.1.1.2. La classification des systèmes d'implants se formant <i>in situ</i> basée sur le mécanisme de formation du dépôt.....	51
1.2.1.1.2.1. Les systèmes polymères réticulés <i>in situ</i>	52
1.2.1.1.2.2. Les organogels se solidifiant <i>in situ</i>	54
1.2.1.1.2.3. Les systèmes de séparation de phases <i>in situ</i>	54
1.2.1.1.3. La composition des implants in situ formés par inversion de phase	60
1.2.1.1.3.1. Les polymères	60
1.2.1.1.3.2. Les solvants	63

1.2.1.1.4.	Le mécanisme de diffusion des substances actives à partir des implants sous-cutanés.....	65
1.2.1.1.5.	L'effet des propriétés physico-chimiques des substances actives sur leur libération dans la peau	70
1.2.1.2.	<i>L'administration transdermique de médicaments par microaiguilles.....</i>	72
1.2.1.2.1.	Les matériaux pour la fabrication de microaiguilles	72
1.2.1.2.2.	Les types de microaiguilles pour l'administration transdermique de substances actives	73
1.2.1.2.3.	Les modèles d'études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> pour les tests de performance.....	80
1.2.1.2.4.	Les paramètres influençant le mécanisme d'absorption des microaiguilles se dissolvant dans la peau	84
1.2.1.2.5.	Les différentes applications pour l'administration transdermique de peptides.....	87
1.2.2.	Les défis des systèmes d'administration par voies transdermique et parentérale.....	91
1.2.2.1.	<i>Les avantages et inconvénients des systèmes administrables par voies transdermique et parentérale : le cas des microaiguilles et des implants se formant in situ.....</i>	91
1.2.2.2.	<i>Applications, études cliniques et commercialisation.....</i>	94
CHAPITRE 2 : HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DE RECHERCHE ET MÉTHODOLOGIE		98
2.1.	Hypothèse de recherche	101
2.2.	Objectifs de recherche et méthodologies.....	102
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS		107
3.1	Première étude: Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications.....	108
3.2	Deuxième étude : Preparation and characterization of 12-HSA-based organogels as injectable implants for the controlled delivery of hydrophilic and lipophilic therapeutic agents	173
3.3	Troisième étude : A quantitative UHPLC-MS/MS method for the growth hormone-releasing peptide-6 determination in complex biological matrices and transdermal formulations	225
Annexe 1: Développement d'un nouveau système d'administration du GHRP-6 par microaiguilles.....		270
CHAPITRE 4 - DISCUSSION ET CONCLUSION.....		278
4.1.	MISE EN CONTEXTE.....	279
4.2.	LES IMPLANTS D'ORGANOGELE INJECTABLES A BASE DE 12-HSA POUR L'ADMINISTRATION DE SUBSTANCES ACTIVES HYDROPHILES ET LIPOPHILES	280
4.2.1	L'addition de molécules d'organogélifiant diminue la Tgel et augmente la stabilité thermique des gels	280
4.2.2	La résistance à la déformation des gels est augmentée par addition de molécules d'organogélifiant tandis que la présence de Tween 80 perturbe l'organisation du réseau gélifié.....	282
4.2.3	L'ajout de Tween 80 diminue la capacité d'injectabilité et augmente la dégradation des organogels	285
4.2.4	Les organogels de 12-HSA Tween 80 favorisent une administration prolongée de l'acyclovir comparativement aux organogels de 12-HSA immobilisant le clotrimazole	288
4.2.5	Les implants d'organogel présentent une cytotoxicité cellulaire plus élevée en augmentant la quantité de 12-HSA au sein du système	293
4.3.	LES MICROAIGUILLES POLYMERIQUES SOLUBLES DANS L'EAU POUR L'ADMINISTRATION DE GHRP-6	298
4.3.1	L'augmentation de la hauteur des microaiguilles accroît l'efficacité d'encapsulation du GHRP-6 dans la pointe des aiguilles.....	300
4.3.2	Un faible ratio d'aspect (i.e, 2-3) et un rapport massique de PVP:PVA de 1:1 sont des conditions favorables à l'insertion efficace des microaiguilles pyramidales dans la peau.....	302
4.3.3	Les timbres de microaiguilles de 800 µm augmentent la libération du GHRP-6 après 24 h post-application comparativement aux aiguilles plus courtes de 500 µm	305

4.4.	SYSTEMES D'ADMINISTRATION DE MEDICAMENTS INVASIFS ET MINIMALEMENT INVASIFS : ENTRE EFFICACITE ET INNOCUITE.....	307
4.5.	PERSPECTIVES.....	309
4.5.1.	Efficacité thérapeutique des formulations	309
4.5.2.	Inflammation / toxicité des formulations.....	311
4.6.	CONCLUSION GENERALE.....	312
	Annexe 2 : Informations complémentaires du chapitre 4 - Discussion	336
	Annexe 3: Quatrième étude : Preparation, characterization and evaluation of organogel-based lipstick formulations : application in cosmetics.....	343
	Annexe 4 : Liste des publications	381

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1.1 Les différents types de systèmes transdermiques commercialisés. Liste adaptée de (Pastore <i>et al.</i> , 2015; Paudel <i>et al.</i> , 2010; Prausnitz and Langer, 2008; Ramadon <i>et al.</i> , 2021).....	48
Tableau 1.2 Exemple de systèmes transdermiques formés de timbre de microaiguilles étudiés pour la délivrance de peptides	89
Tableau 1.3 Avantages et inconvénients des systèmes d’administration par microaiguilles et des implants se formant <i>in situ</i>	92
Tableau 1.4 Implants <i>in situ</i> formés par inversion de phase et timbre de microaiguilles commercialisés ou en développement clinique (de phase II ou supérieure pour les microaiguilles)	96

Annexe 2

Tableau S1 Comparaison de différentes formulations pour la libération d’acyclovir et de clotrimazole par les voies transdermique et parentérale	337
Tableau S2 Considérations à prendre en compte pour favoriser une libération prolongée de l’implant <i>in situ</i> à base de 12-HSA, en se basant sur les études de Esposito <i>et al.</i> , 2020 et Windorf, 2017	339
Tableau S3 Comparaison de différentes formulations pour la libération transdermique de peptides thérapeutiques par microaiguilles.....	340
Tableau S4 Avantages et inconvénients des systèmes de microaiguilles se dissolvant dans la peau et des implants d’organogel <i>in situ</i> en fonction de l’ effet désiré local ou systémique	342

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1.1 Schéma des différentes couches de la peau.	4
Figure 1.2 Structure et composition de l'épiderme.	6
Figure 1.3 Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique.	9
Figure 1.4 Structures et compositions approximatives des glandes cutanées chez le patient sain sans pathologie associée et en condition normale (sans effort physique).	16
Figure 1.5 Représentation schématique de l'organisation du système microvasculaire cutané....	18
Figure 1.6 Représentation schématique du processus d'absorption cutanée.....	28
Figure 1.7 Stratégie de 2e et 3e générations pour améliorer l'administration transdermique de médicament..	44
Figure 1.8 Classification des systèmes injectables formant des dépôts « <i>in situ</i> » en fonction des mécanismes impliqués dans leur formation..	59
Figure 1.9 Mécanismes de formation et de fonctionnement des implants se formant <i>in situ</i> par échange / diffusion de solvant.	66
Figure 1.10 Administration de substances actives par divers types de microaiguilles..	79
Figure 1.11 Méthodes et types de modèles utilisés pour les études <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> pour la voie cutanée.....	84

Annexe 1

Figure S1. Illustration schématique du processus de fabrication des timbres de microaiguilles de PVP / PVA par micro-moulage. Cette fabrication inclut deux étapes de préparation : la première étant la conception de la couche de microaiguilles encapsulant le médicament modèle (GHRP-6) ou une sonde fluorescente (Cy5) et la deuxième étant la conception du support.	273
Figure S2. Caractérisation des timbres de microaiguilles de PVP / PVA. (A) Images de microscopie à champ clair de microaiguilles de différentes tailles. Barre d'échelle, 200 μm , (B) Représentation schématique d'un timbre de microaiguilles et de ses paramètres géométriques, (C) Tableau des caractéristiques physiques des timbres de microaiguilles préparés à partir de PVP / PVA en utilisant deux types de moules MPatch TM (500 et 800 μm) (n=10) et taux d'encapsulation de GHRP-6 correspondants (n=3).	274

Figure S3. Caractérisation des performances mécaniques des timbres de MNs PVP-PVA. Schéma du montage expérimental des microaiguilles lors de l'application d'une force à différent déplacement de la pointe des aiguilles touchant la plateforme au support du timbre (gauche) et graphique du comportement mécanique des microaiguilles de 800 μm sous ce test de compression (n=6) (droite).275

Figure S4. Images représentatives en fluorescence du timbre de microaiguilles (A) avant insertion, (B) après insertion, (C) de la délivrance de la sonde fluorescente Cy5 dans la peau, (D) après insertion au niveau des pointes de microaiguilles (barre d'échelle, 500 μm), et (E) en fond clair de la peau de porc après insertion du timbre de microaiguilles (barre d'échelle, 1000 μm). (F) Quantification de l'efficacité de pénétration (n=10), de délivrance du Cy5 (n=10) et (G) images représentatives de coupes histologiques en fond clair de la peau de porc avant insertion de microaiguilles (image gauche, barre d'échelle, 1000 μm) et en fluorescence après insertion de microaiguilles (image droite, barre d'échelle, 500 μm).276

Liste des abréviations

12-HSA	Acide 12-HydroxyStéarique
¹ H	Proton
A	Aire
<i>ADHD</i>	<i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide Ribonucléique Messenger
Azone [®]	1-dodecylazacycloheptan-2-one
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
<i>CHADD</i>	<i>Controlled-Heat Aided Drug Delivery</i>
Cl	Clairance
C _{ss}	Concentrations plasmatiques à l'état d'équilibre
C _{ss} épiderme	Épiderme concentrations épidermiques à l'état d'équilibre
Cy5	Cyanine5
DMSO	DiMéthylSulfOxide
EGDMA	<i>Ethylene Glycol diMethAcrylate</i>
F	Biodisponibilité
FDA	<i>Food and Drug Agency</i>
GAG	GlycosAminoGlycanes
GHRP-6	<i>Growth Hormone-Releasing Peptide-6</i>
GHRPs	<i>Growth Hormone-Releasing Peptides</i>
GLN	<i>Gelled Lipid Nanoparticles</i>
HEMA	<i>2-HydroxyEthyl MethAcrylate</i>
Hz	Hertz
HPBCD	<i>(2-Hydroxy)Propyl-β-CycloDextrin</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ID	IntraDermique
IM	IntraMusculaire
IP	IntraPéritonéale
IV	IntraVeineuse

Ke	Coefficient de partage épiderme / véhicule
LCST	<i>Lower Critical Solution Temperature</i>
LMOGs	<i>Low Molecular Weight Organogelators</i>
LPP	<i>Long Periodicity Phase</i>
MEMS	<i>MicroElectroMechanical Systems</i>
m/m	fraction massique
MNs	<i>Microneedles</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MTDS	<i>Metered Dose Therapeutic System</i>
MTS	(3-(4,5-diMethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium)
MTT	3-(4,5-diMethylThiazol-2-yl)-2,5-diphenylTetrazolium bromide
NHA	Number of <i>H-bond Acceptors</i>
NHD	Number of <i>H-bond Donors</i>
NLC	<i>Nanostructured Lipid Carriers</i>
NMP	N-Méthyl-2-Pyrrolidone
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCL	Poly(ϵ -CaproLactone)
PDLLA	<i>Poly(D,L-Lactic Acid)</i>
PDMS	PolyDiMSiloxane
PEC	<i>PolyElectrolyte Complexes</i>
PEG	PolyÉthylène Glycol
PGA	<i>Poly(Glycolic Acid)</i>
PIE	Perte Insensible en Eau
PK	Pharmacocinétique
PLA	<i>Poly(Lactic Acid)</i>
PLGA	<i>Poly(Lactic-co-Glycolic Acid)</i>
PLLA	<i>Poly(L-Lactic Acid)</i>
PMA	<i>Poly(Methyl Acrylate)</i>
PVA	<i>Poly(Vinyl Alcohol)</i>

PVP	PolyVinylPyrrolidone
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène
SAIB	<i>Sucrose Acetate IsoButyrate</i>
SC	Sous-Cutanée
SLN	<i>Solid Lipid Nanoparticles</i>
SPP	<i>Short Periodicity Phase</i>
sMTS	<i>Solid Microstructured Transdermal System</i>
<i>TDS</i>	<i>Transdermal Delivery System</i>
Tgel	<i>Gelation Temperature</i>
<i>THS</i>	Traitement Hormonal Substitutif
Tmelt	<i>Melting Temperature</i>
<i>TRN</i>	Thérapie de Remplacement de la Nicotine
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra-Performance Liquid chromatography Tandem Mass Spectrometry</i>
UV	UltraViolets
β -GP	β -GlycéroPhosphate

*Je dédie cette thèse à mes parents qui m'ont
toujours encouragée à poursuivre mes rêves,
À toi mon amour, ma famille, que j'aime tant,
À toi mon papi, qui veille sur nous de là-haut,*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, la Dre Sylvie Marleau, qui m'a permis de poursuivre et de finaliser mon doctorat dans les meilleures conditions qui soient. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, pour votre soutien constant, votre bienveillance, votre expertise et vos enseignements. Je vous remercie également de m'avoir donné l'occasion de travailler sur d'autres projets qui m'ont permis d'accroître mes connaissances dans un nouveau domaine passionnant.

Je souhaiterai adresser mes remerciements à mon co-directeur de thèse, le Dr Plamen Kirilov, qui a été continuellement disponible tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour vos encouragements, votre écoute et la confiance que vous m'avez témoignée dans les différents projets sur lesquels nous avons travaillé. Vos idées et votre expertise des organogels ont été vivement appréciées pour orienter ce travail de doctorat.

Je souhaiterai exprimer toute ma gratitude envers les Drs Huy Ong, Davide Brambilla, Xavier Banquy, Araceli Garcia et Sung Vo Duy pour leur expertise scientifique et leurs conseils judicieux qui étaient indispensables à la concrétisation du projet de recherche sur les microaiguilles. J'ai grandement apprécié nos échanges qui étaient très instructifs.

Je tiens à remercier aussi le Dr François-Xavier Lacasse pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner au DESS et au BSBP. Ces expériences ont été très enrichissantes pour compléter ma formation de doctorat. Je remercie aussi particulièrement le Dr Denis deBlois de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec une équipe formidable pour l'organisation du 7e Congrès Mondial des Sciences Pharmaceutiques de la FIP (PSWC2020).

Je remercie également chaleureusement la Pre Michèle Brochu (vice-rectrice adjointe aux études supérieures et postdoctorales de l'UdeM), le Pr Daniel Lévesque (vice-doyen aux études supérieures et à la recherche), et la Pre Lyne Lalonde (Doyenne de la Faculté de pharmacie) pour leur soutien dans la poursuite de mon cheminement aux cycles supérieurs. Je tiens également à remercier la Faculté de pharmacie pour la bourse de recrutement au doctorat et leur bourse

philanthropique, l'Institut TransMedTech pour leur soutien financier pour le volet analytique de ma thèse, et les Études supérieures et postdoctorales pour leur bourse de fin d'études doctorales.

J'adresse mes remerciements à Stéphanie Collins (présidente du Conseil des étudiants des cycles supérieurs en pharmacie), une amie exceptionnelle, qui m'a soutenu continuellement et qui m'a permis de m'engager dans des projets de grande envergure au sein de l'association, axés sur la communication, la collaboration et le leadership. Mouna Rabeb Derbali, Mohamed Benhammadi, Margaux Brunière, Soudeh F. Tehrani, et Camille Vidou, un grand merci d'avoir été mon plus grand soutien depuis notre arrivée à Montréal. Je vous remercie à toutes et à tous pour votre écoute, vos conseils et d'être de si bons amis.

Un grand merci également à Fatéma Dodat, Élise Laszlo et Geneviève Frégeau qui ont marqué mes années de doctorat. Vous m'avez fait passer des moments inoubliables et vous m'avez donné la force nécessaire pour affronter les moments difficiles.

Je remercie également les étudiants et les employés du 2^e, 3^e et 4^e étage présents et passés qui ont apporté une belle énergie au sein de la Faculté : Martin J., Ina P., Mihaela F., Isabelle S-J., Victor P., Augustine L.F., Jimmy F., Pierre-Luc L., Alexander C., Guillaume B., Alexandre M., Warren V., Imad K., Sara S., Maxime M., Anaëlle M., Wided A., Josée D., Julie-Ève O., Dilan M., David H., Liliane M., Florence V-V., Arielle T., Simone I., Imane B., Jakub Q. et Katherine C-B. Merci infiniment à Margault S., Ghina M., Véronique T. et Catherine M., pour votre gentillesse et votre professionnalisme, c'était un réel plaisir de travailler avec vous. Merci à tous pour votre aide, votre bienveillance, et je vous souhaite le meilleur pour la suite de vos parcours.

Je garderai aussi un souvenir très positif des membres de l'association, mais aussi de notre travail et de nos collaborations avec diverses instances. Je tiens à vous remercier de votre précieuse aide pour organiser la journée de recherche étudiante conjointe (JRE) entre l'Université de Montréal et l'Université de Toronto. A big thank you to Giovanna Medeiros Schver for making this great event possible, you are the best!

Je tiens à remercier tout particulièrement ma chère Stella pour ta gentillesse, ta générosité d'âme et nos belles discussions. Mille fois merci pour ton soutien et ta bienveillance.

Un immense merci à ma merveilleuse famille et ma belle-famille pour votre immense amour et votre soutien indéfectible malgré la distance. Vous m'avez donné la force d'affronter tous les moments difficiles et vous m'avez toujours encouragée pendant mon doctorat. Papa, maman, je suis extrêmement fière d'être votre fille, de tous vos sacrifices pour nous élever dans les meilleures conditions possibles et d'avoir toujours dit de croire en mes rêves. Vous êtes de beaux modèles de vie pour Christophe, Vanessa, Anaïs, Nicolas, Anthony et moi-même. Un grand merci à mes frères, mes sœurs, et mes grands-parents d'avoir toujours été présents. Je vous aime infiniment. Je remercie aussi mes oncles, tantes, cousins et cousines, pour cette famille si soudée qui est la nôtre. Thierry, une mention spéciale à toi, pour avoir toujours activement égayé nos journées avec tes blagues sur notre groupe familial. À mes princesses Alessia et Eva, je suis tellement fière d'être votre marraine / tatie, vous êtes mes rayons de soleil et je souhaite que tous vos rêves se réalisent. Michel et Margot, je suis tellement reconnaissante de vous avoir dans ma vie. Merci pour votre amour, votre bienveillance et vos encouragements. J'admire votre force, votre énergie et votre générosité. Merci infiniment d'être de si belles personnes, très chères à mon cœur.

Du plus profond de mon cœur, je remercie le grand amour de ma vie, Morgann. Je suis tellement chanceuse de partager ta vie au quotidien. Merci pour ta patience, tes encouragements, d'avoir traversé toutes les épreuves de ce doctorat et de la vie avec moi. Tu embellis ma vie depuis 10 ans maintenant, et tu as permis de me construire avec force et détermination. Merci de m'avoir donné le courage de poursuivre mes rêves et pour tout l'amour que tu m'as montré ces dernières années. La réalisation de cette thèse, c'est ta victoire aussi, Dr Aubert. Une nouvelle page de notre histoire s'écrit maintenant...

Chapitre 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1. La peau et l'absorption cutanée de substances actives par voie transdermique

Au cours des dernières années, les systèmes d'administration de médicaments par voie topique et transdermique ont reçu un intérêt particulier dans la pratique clinique en offrant un site d'administration accessible et pratique. L'administration de substances actives par la voie topique présente, d'une part, un avantage notamment pour le ciblage de médicaments sur leurs sites d'action dans le cas de maladies et d'affections cutanées réduisant ainsi les effets secondaires systémiques. D'autre part, l'administration transdermique peut être une voie de choix pour une libération systémique de médicaments franchissant la barrière cutanée pour être absorbés et produire des effets systémiques qu'ils soient indésirables (allergiques, toxiques) ou intentionnels (pharmacologiques).

Le développement de nouveaux systèmes d'administration par voie parentérale et transdermique peut offrir divers avantages en termes de biodisponibilité par rapport à la voie orale couramment utilisée pour : (i) contourner le métabolisme de premier passage hépatique et la barrière muqueuse intestinale, (ii) éviter l'environnement gastro-intestinal indésirable (enzymes, pH) et (iii) offrir une administration de médicaments prolongée et contrôlée pour les substances actives à faible demi-vie plasmatique (Alkilani *et al.*, 2015; Ramadon *et al.*, 2021). De plus, l'avancée des technologies pour la libération de substances actives déjà existantes au travers de la peau vise non seulement à améliorer les performances du médicament en termes d'efficacité et de sécurité, mais aussi l'observance, et l'adhésion thérapeutique en accord avec les objectifs thérapeutiques globaux (bénéfices, risques et effets secondaires) (Wen *et al.*, 2015). En tant qu'alternative à la voie orale, les voies injectables (intraveineuse (IV), intradermique (ID) sous-cutanée (SC) et intramusculaire (IM)) ainsi que la voie transdermique ont permis l'administration de peptides, protéines et macromolécules jusqu'alors limités par leurs caractéristiques physicochimiques par voie orale (McCrudden *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2014). Toutefois, la nature invasive des injections n'est pas sans contrepartie provoquant douleur, moindre observance par les patients et la nécessité d'une administration par un personnel de santé qualifié (Schlegel and Leray, 2018; Schoellhammer *et al.*, 2014). Dernièrement, l'avènement des systèmes transdermiques a contribué largement à l'essor de la voie cutanée grâce à des systèmes auto-administrables et sans

douleur, augmentant considérablement l'impact sur la médecine conventionnelle (Ramadon *et al.*, 2021).

Dans cette première partie, les mécanismes de pénétration et de diffusion de médicaments au travers des structures de la peau influençant l'absorption cutanée seront décrits pour mieux comprendre les défis entourant l'efficacité thérapeutique et la qualité des formulations parentérales et transdermiques.

1.1.1. La physiologie de la peau : structure et fonctions

1.1.1.1. La structure de la peau

La peau est l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain avec une surface de 1,7 m² (Heaf, 2007) chez l'adulte moyen, représentant environ 15 % de son poids total (Richardson, 2003). La peau recouvre la totalité du corps humain et reste en continuité avec les muqueuses des orifices naturels. Au niveau de sa structure, on retrouve 3 couches de tissus superposées : l'épiderme, la couche superficielle séparée du derme par la jonction dermo-épidermique et non vascularisée, le derme, couche intermédiaire richement vascularisée qui nourrit et soutient l'épiderme et l'hypoderme, couche profonde adipeuse et vascularisée. Le système tégumentaire est aussi composé d'un certain nombre d'annexes cutanées dérivées de l'épiderme, dont plusieurs sont localisées dans le derme. Ces annexes cutanées comprennent : l'appareil sudoripare eccrine, l'appareil pilo-sébacé et l'appareil unguéal. L'épaisseur de la peau varie selon les régions du corps, l'âge et de la contrainte mécanique appliquée sur celle-ci. Ainsi, la peau est plus épaisse sur la paume des mains et la plante des pieds, tandis que certaines régions, telles que les paupières et la partie du conduit auditif profond sont pourvues d'une peau très mince (Sappey, 1894).

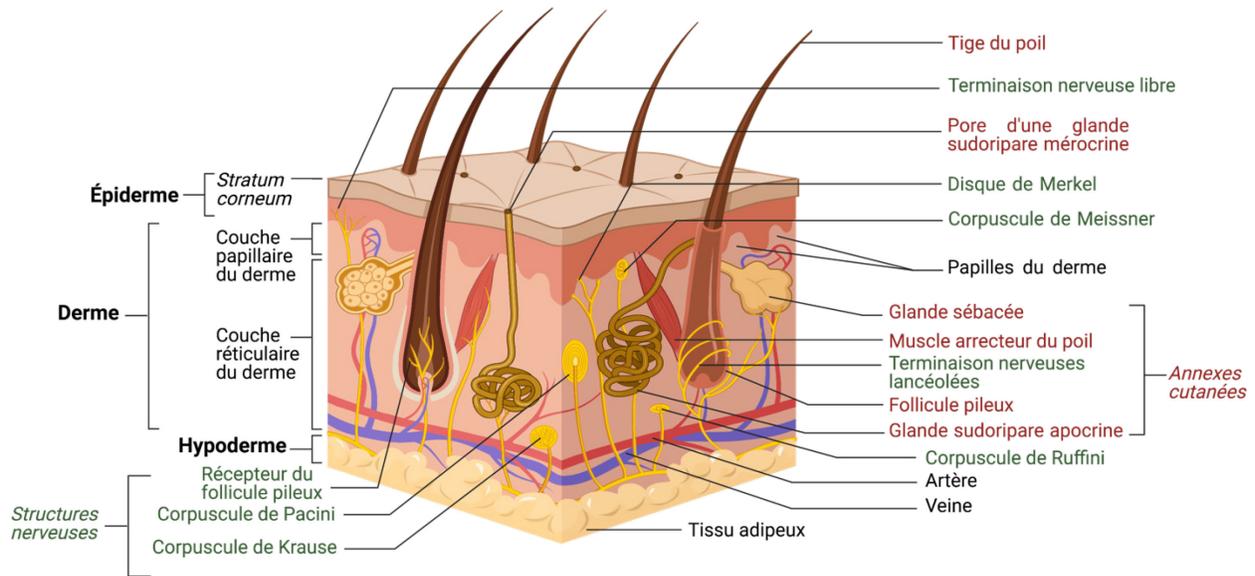


Figure 1.1 Schéma des différentes couches de la peau. Vue de la structure tridimensionnelle de la peau et des tissus sous-cutanés. Figure inspirée de (Marieb *et al.*, 2014). Cette figure a été créée avec BioRender.com

1.1.1.1.1. L'épiderme

Selon la classification des épithéliums, l'épiderme est un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé, et constitue la couche la plus externe de la peau. C'est une couche en renouvellement constant, dont l'épaisseur varie en fonction des régions du corps de 50 μm (épiderme de la peau fine) au niveau des paupières à 1,5 mm (épiderme de la peau épaisse) au niveau de la paume des mains et la plante des pieds (Kudsi and Pomahac, 2018). L'épiderme est composé de deux parties : l'épiderme viable, métaboliquement actif, constitué de cellules vivantes de la couche malpighienne et d'une partie non viable la couche cornée comprenant les cornéocytes, des squames (Wickett and Visscher, 2006). En outre, l'épiderme viable est classé selon quatre ou cinq couches selon le type de peau, fine ou épaisse, et compte quatre types de cellules, soit les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans (macrophages intraépidermiques) et les cellules de Merkel (épithélioïdocytes du tact) (Marieb *et al.*, 2014). De la profondeur vers la surface, ces couches superposées sont : - la couche basale (*stratum basale*), - la couche épineuse (*stratum spinosum*), - la couche granuleuse (*stratum granulosum*), - la couche claire (*stratum lucidum*) et - la couche cornée (*stratum corneum*) (Figure 1.1) (Marieb *et al.*, 2014; Wickett and Visscher, 2006).

La couche cornée

La couche cornée se constitue de vingt à trente couches de cellules anucléées, aplaties et sans organites, les cornéocytes. Ainsi, elle constitue la partie non viable de l'épiderme avec des kératinocytes, sous leur forme finale de différenciation cellulaire et enrichie en kératine. Ces cornéocytes sont imbriqués dans une matrice lipidique communément appelée le ciment lipidique intercornéocytaire assurant une première barrière de défense pour la peau contre l'abrasion et la pénétration de substances toxiques et pathogènes (Lee *et al.*, 2006). En effet, l'enveloppe cornéifiée est formée grâce à l'action de transglutaminases envers des précurseurs protéiques (Yoneda *et al.*, 1992). Parmi ces derniers, on retrouve la lorïcine et l'involucrine qui formeront une coque protéique liée à la filaggrine et aux filaments de kératine s'accumulant sur la membrane plasmique des kératinocytes (Steinert and Marekov, 1995). Dans un deuxième temps, les phospholipides membranaires vont peu à peu être remplacés par une monocouche lipidique s'organisant en phase lamellaire et composée principalement de cholestérol, céramides et d'acides gras sous forme libre en composition quasi équimolaire (Fartasch *et al.*, 1993). Cette structure bien échafaudée permet également l'ancrage de lipides intercornéocytaires tout en liant des composants transmembranaires des cornéodesmosomes assurant ainsi la cohésion entre les cornéocytes.

Ainsi, de par ces aspects et de par la présence de glycolipides, cette couche est hautement résistante et quasi imperméable. Bien qu'elle possède un taux d'hydratation très faible (de 13 à 20 %), des substances hygroscopiques appelées facteurs naturels d'hydratation sont présentes dans les cornéocytes. Ceux-ci sont formés par la maturation de la profilaggrine produite dans la couche granuleuse et servent à la capture et la rétention des molécules d'eau (Rawlings and Harding, 2004). Au niveau des assises superficielles du *stratum corneum*, les cornéodesmosomes sont protéolysés sous l'action d'enzymes protéolytiques lors du phénomène de desquamation (ou exfoliation), ce qui assure le renouvellement de la couche la plus superficielle de la peau. Le maintien de la balance entre les protéases et leurs inhibiteurs est donc essentiel pour maintenir l'épaisseur du *stratum corneum* et sa fonction barrière (Haftek, 2015). Ce renouvellement est en moyenne estimé à 14 jours contre 28 jours pour un renouvellement total de l'épiderme (Hoath and Leahy, 2003). Ce processus est appelé le « turn-over » épidermique (Figure 1.2).

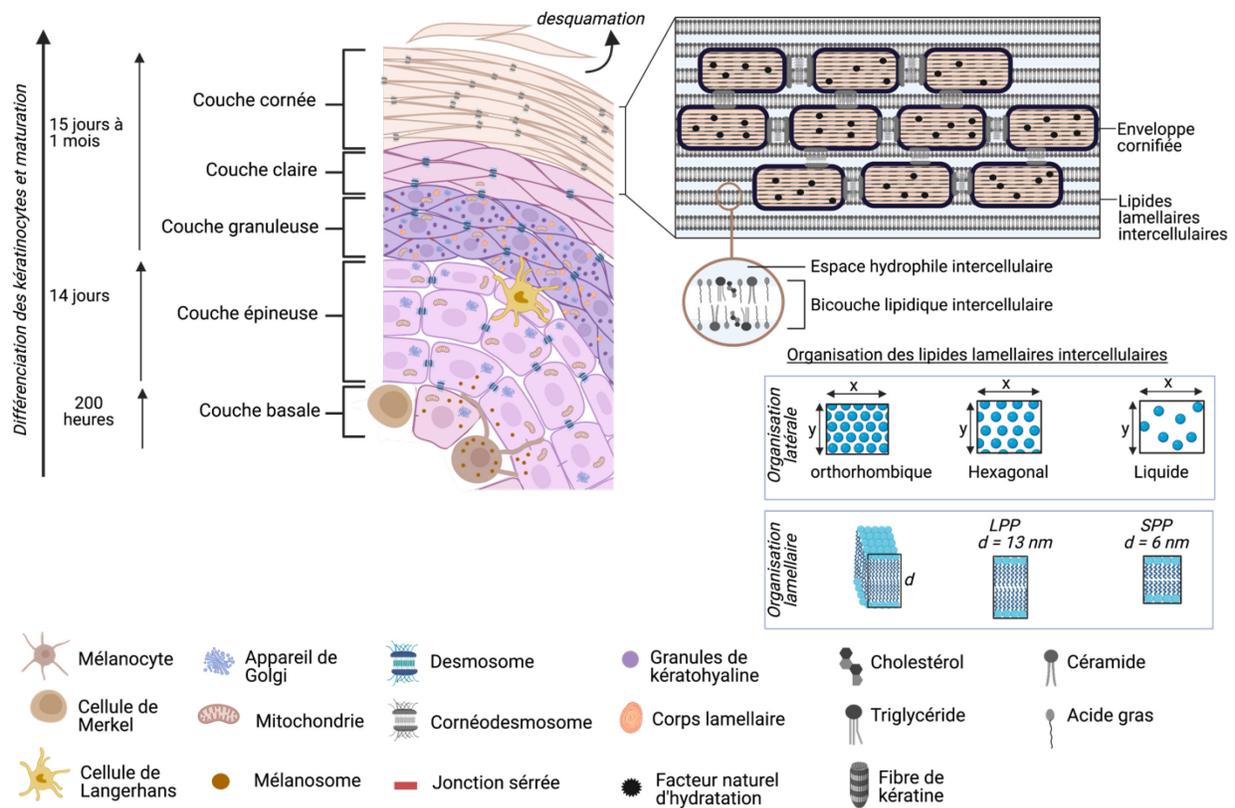


Figure 1.2 Structure et composition de l'épiderme. L'épiderme est composé de cinq couches dont quatre principales; la couche claire étant présente que dans le type de peau épaisse. Lors de la kératinisation de l'épiderme, les cellules majoritaires, les kératinocytes, subissent une série de changements morphologiques au cours de leur migration verticale jusqu'à la couche cornée. Cette dernière est représentée selon le modèle « briques et mortier » où les cornéocytes sont intégrés dans une matrice lipidique. Ces lipides forment des lamelles lipidiques intercellulaires à deux niveaux d'auto-assemblage. L'organisation lamellaire est classée selon la distance de répétition des lamelles lipidiques empilées en longue (*long periodicity phases*, LPP) ou en courte phase de périodicité (*short periodicity phases*, SPP). En surface de la couche cornée, les cornéocytes et les cellules anucléées, se détachent et desquament après la lyse du ciment intercellulaire et des cornéodesmosomes. Le renouvellement épidermique est ainsi assuré par les cellules souches de la couche basale de l'épiderme. Figure inspirée de (Janssens *et al.*, 2012). Cette figure a été créée avec BioRender.com.

La couche claire

Cette couche mince parfois « invisible » au microscope n'est présente qu'au niveau de la peau de type épaisse. Elle se compose de deux à trois rangées de kératinocytes morts (cornéocytes) et aplatis de même morphologie que celles constituant la partie inférieure de la couche cornée (Marieb *et al.*, 2014).

La couche granuleuse

Au-dessous de la couche claire se trouve la couche granuleuse présentant une à cinq couches de cellules. L'étape de kératinisation, pendant laquelle les kératinocytes se chargent en kératine, commence au niveau de cette dernière. L'aspect de ces kératinocytes évolue également. En effet, ils présentent une morphologie de forme aplatie, leur noyau débute son étape de désintégration et leur cytoplasme contient des granules (kératohyaline et lamellés (ou corps d'Odland)) (Holbrook, 1989). Par ailleurs, ces granules de kératohyaline ont une fonction dans la réticulation des filaments de kératine, afin de conférer à la couche granuleuse une certaine étanchéité et une protection contre les agents exogènes (Freeman, 2020). D'autres protéines se retrouvent aussi synthétisées par les kératinocytes, telles que l'involucrine présente dans le cytoplasme, ainsi que la loricine et la profilaggrine (précurseur de la filaggrine) qui sont pour leur part contenues dans les granules de kératohyaline (Freeman, 2020). Les corps lamellaires contenant des lipides, des inhibiteurs de protéases, des hydrolases, ainsi que des peptides antimicrobiens fusionnent alors avec la membrane plasmique pour sécréter leurs contenus dans les espaces intercellulaires. Ils vont, par la suite, former des rangées uniformes de feuilletts lipidiques à l'interface avec le *stratum corneum* (Raymond *et al.*, 2008). En plus des jonctions serrées, un glycolipide imperméabilisant est sécrété par les corps d'Odland limitant ainsi la perte insensible en eau (PIE) et favorisant ainsi la création d'une véritable barrière hydrique naturelle (Yousef, 2020).

La couche épineuse

La couche épineuse, située au-dessus de la couche basale, doit son nom du fait des projections cytoplasmiques sous forme d'épines des kératinocytes et est formée de huit à dix assises cellulaires. En effet, les kératinocytes attachés entre eux par des desmosomes associés à des tonofilaments changent de morphologie et commencent à s'aplatir (Yousef, 2020).

La couche basale

La couche basale, également appelée couche germinative, contient des cellules souches épidermiques présentant une grande activité mitotique (10 % de division cellulaire / jour) et est organisée sur une seule couche (Yousef, 2020). À chaque division cellulaire, une cellule fille va migrer vers les couches supérieures de l'épiderme, tandis que l'autre cellule fille restera dans la couche basale pour assurer la division cellulaire, le renouvellement permanent de kératinocytes et la réparation des tissus endommagés (Alberts, 2002). Durant leur migration, les kératinocytes se différencient perdant ainsi leur capacité de prolifération. De plus, ils commencent à produire des corps lamellaires au niveau de l'appareil de Golgi (Gartner and Hiatt, 2010). Les cellules de la couche basale sont fixées au derme sous-jacent *via* la jonction dermo-épidermique formée par une membrane basale sinusoïdale et à l'aide d'hémidesmosomes et de leurs intermédiaires (Figure 1.3). La jonction dermo-épidermique possède différents rôles déterminants pour assurer (i) la cohésion de la structure de l'épiderme, (ii) un support mécanique permettant la jonction entre l'épiderme et le derme, (iii) une fonction de protection *via* une barrière sélective régulant les échanges moléculaires et cellulaires entre ces deux couches et (iv) un rôle majeur lors de la réépidermisation cutanée (Briggaman and Wheeler, 1975).

Les mélanocytes sont aussi présents à hauteur de 5 à 10 % en moyenne et ont un rôle essentiel dans la synthèse de la mélanine. De par leurs prolongements, ils vont s'étendre vers les kératinocytes pour former un bouclier pigmentaire de protection contre les rayons ultraviolets (UV). Chaque unité épidermique de mélanisation est formée par le mélanocyte et les kératinocytes pour un ratio d'un mélanocyte pour 36 kératinocytes (Hoath and Leahy, 2003). Les cellules de Merkel sont, quant à elles, des mécanorécepteurs à adaptation lente (type I) localisés au niveau de la jonction dermo-épidermique. Ils peuvent grâce à leur structure formée par leur liaison à un corpuscule tactile non capsulé (terminaison de la neurofibre sensitive) et des microvillosités les associant aux kératinocytes, jouer le rôle de récepteur sensoriel du toucher (Abraham and Mathew, 2019) (voir section 1.1.1.1.5).

Dans la couche suprabasale, on retrouve les cellules de Langerhans dotées de fins prolongements cellulaires qui s'étendent entre les kératinocytes pour présenter les allergènes aux lymphocytes T auxiliaires (lymphocytes T CD4+) dans les cas de dermatite allergique de contact

ou d'hypersensibilité retardée de type IV (Kaplan *et al.*, 2012). Ce sont par ailleurs des cibles de choix avec leur profil immunosuppresseur dans l'orientation de la réponse inflammatoire lors de réactions inflammatoires chroniques ou pour une tolérance active dans le cas de greffe (Kaplan *et al.*, 2012; Mutyambizi *et al.*, 2009). Les kératinocytes jouent également un rôle important dans la dermatite allergique de contact en tant que cellules présentatrice d'allergènes (antigènes) et sécrétrices de cytokines permettant de recruter et de maintenir les cellules inflammatoires sur le site d'exposition à l'allergène (Banerjee *et al.*, 2004).

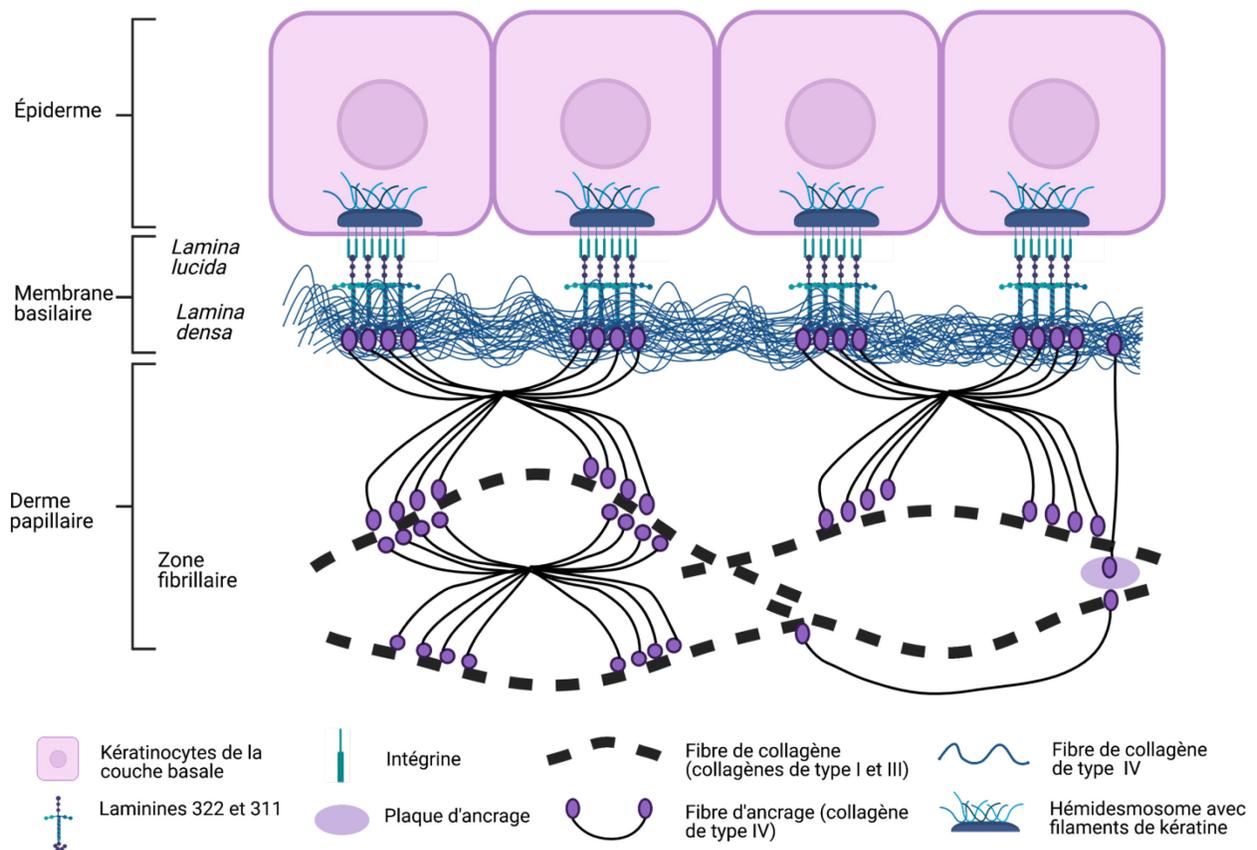


Figure 1.3 Représentation schématique de la jonction dermo-épidermique. Les kératinocytes de la couche basale sont fixées à la *lamina lucida* (épaisseur: 20-40 nm) de la membrane basilaire par interactions entre l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ se trouvant en surface des hémidesmosomes et les filaments d'ancrage, les laminines 322 et 311. La membrane basale est elle-même attachée aux faisceaux de collagène de types I et III sous-jacents du derme papillaire par ancrage des fibrilles de collagène de type VII qui se fixent à la *lamina densa* (épaisseur: 30-70 nm), constituant ainsi une zone d'ancrage. Cette membrane basale, de par sa structure même, assure plusieurs rôles fondamentaux :

en favorisant les échanges de nutriments et de fluides, au niveau de l'organisation spatiale des kératinocytes, et en apportant un soutien structurel à l'épiderme. Figure inspirée de (Roig-Rosello and Rousselle, 2020). Cette figure a été créée avec BioRender.com.

1.1.1.1.2. Le derme

Le derme, sous-jacent à l'épiderme, est un tissu conjonctif lâche au niveau de sa couche papillaire et plus dense au niveau de sa couche réticulaire. Il représente 80 % de l'épaisseur du derme. Ce tissu fibro-élastique est à la fois résistant et flexible avec une épaisseur variant en moyenne de 1 à 4 mm (Silver *et al.*, 2001). On y trouve principalement des cellules communément retrouvées dans les tissus conjonctifs : des fibroblastes, des fibrocytes (fibroblastes adultes au repos), des adipocytes, des macrophages, des lymphocytes, des plasmocytes, des histiocytes et des mastocytes, dispersés dans une matrice extracellulaire (Prost-squarcioni *et al.*, 2008).

Cette dernière est synthétisée par les fibroblastes et est composée de (Prost-squarcioni *et al.*, 2008) :

- Fibres de collagène (60-80 % du volume du derme) représentent 75 % du poids sec total de la peau. Elles constituent le principal élément résistant à la tension dans les tissus conjonctifs. On y retrouve principalement les types de collagène suivants : I (80-90 %), III (8-12 %) et V (< 5 %). Le collagène s'auto-assemble sous forme de fibres épaisses formant un réseau tridimensionnel. Son renouvellement homéostatique est notamment assuré par des métalloprotéases et collagénases et est dépendant de l'âge pour les différents types de collagènes I (abondant et forme très forte), II (forme le cartilage), IV (forme la couche basale) et V (forme la surface des cellules, cheveux, tissus du placenta) (Karsdal *et al.*, 2016).
- Fibres élastiques (2-4 % du volume du derme) qui confèrent à la peau une certaine élasticité et résilience grâce à l'élastine (polymère amorphe). Au niveau des phases amorphes, l'élastine s'accroche aux microfibrilles d'élaunine, dites immatures, et élastiques proprement dites, matures. Les microfibrilles d'oxytalane sont, quant à elles, seulement constituées de microfibrilles tubulaires.
- Une substance fondamentale amorphe qui est un matériau gélatineux hydraté et amorphe contenant de l'eau, des sels minéraux, des glycoprotéines (notamment la laminine et la

fibronectine) et des protéoglycanes (combinaison d'une protéine et de glycosaminoglycanes) (GAG). Les protéoglycanes ont de grandes capacités d'absorption de l'eau et forment un réservoir si bien que 90 % de la matrice extracellulaire est constituée d'eau. D'ailleurs, ces protéoglycanes confèrent la turgescence aux tissus pour augmenter leur résistance mécanique à la compression. Parmi les GAG retrouvés dans la matrice extracellulaire, on retrouve (i) l'acide hyaluronique, (ii) le sulfate de chondroïtine et le sulfate de dermatane, (iii) l'héparine et le sulfate d'héparane et (iv) le sulfate de kératane. Les protéines adhésives, telles que laminine et la fibronectine ont un rôle primordial dans l'interaction des cellules épithéliales et conjonctives *via* leur récepteur, des glycoprotéines transmembranaires de la famille des intégrines avec la matrice extracellulaire (Kendall and Feghali-Bostwick, 2014).

La couche papillaire du derme est un tissu conjonctif aréolaire, situé sous l'épiderme, représentant 1/5^{ème} de l'épaisseur du derme, le restant étant attribué au derme réticulaire. Il forme des projections mamillaires (papilles du derme) et contient des fibres de collagène et des fibres d'oxytalan orientées perpendiculairement à la jonction dermo-épidermique qui baignent dans la substance fondamentale. Dans cette organisation, les fibroblastes papillaires possèdent une activité métabolique supérieure à ceux du derme réticulaire, ce qui explique que ces derniers sont moins riches en substance fondamentale. Ces papilles du derme abritent également des bouquets de capillaires sanguins, où siègent des échanges métaboliques, hormonaux et nutritifs avec l'épiderme, ainsi qu'un réseau nerveux constitué de terminaisons nerveuses libres et de corpuscules tactiles capsulés (voir section 1.1.1.1.5). Le derme papillaire est également une zone de transit pour les cellules immunitaires contribuant ainsi à la fonction immunitaire (Prost-squarcioni *et al.*, 2008).

La couche réticulaire renferme des fibres de collagène sous forme d'épais faisceaux enchevêtrés et de fibres de collagène ayant une orientation en général parallèle à la surface de la peau. On y retrouve également des fibres d'élastines qui forment un plexus au niveau de la jonction dermo-épidermique, tandis que les fibres élastiques se retrouvent dans le derme réticulaire. Ce réseau dense, serré et irrégulier, comprend un plexus vasculaire dermique moyen, un réseau de vaisseaux sanguins, comme dans la couche papillaire et localisé à la jonction dermo-épidermique. Cette jonction est aussi marquée par la présence du système lymphatique formé de vaisseaux

lymphatiques provenant de la ramification du plexus du derme papillaire (Prost-squarcioni *et al.*, 2008) (voir section 1.1.1.1.5).

Certaines annexes cutanées sont retrouvées dans le derme incluant les glandes sudoripares mérocrines et apocrines, les follicules pileux et les glandes sébacées (excepté au niveau de la paume de mains et la plante des pieds) (Marieb *et al.*, 2014; Prost-squarcioni *et al.*, 2008; Yousef, 2020) (voir section 1.1.1.1.4).

1.1.1.1.3. L'hypoderme

L'hypoderme est un tissu conjonctif sous-cutané lâche, qui se trouve sous le derme et qui sépare le muscle de la peau d'où son nom, le fascia superficiel. Il est principalement constitué de tissu adipeux et de tissu conjonctif aréolaire en continuité avec le derme grâce aux fibres de collagène et d'élastine. Ces dernières forment un réseau de septa (cloisons) qui comprend aussi des nerfs, des fibroblastes, des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse (lymphocytes, macrophage et mastocytes) et de larges vaisseaux sanguins, ayant un rôle de structure de soutien de l'hypoderme (Findlay and Gurtner, 2017; Prost-squarcioni *et al.*, 2008). Le tissu adipeux est considéré aujourd'hui comme un véritable organe constitué de cellules adipeuses possédant des capacités de prolifération (hyperplasie), de « grossissement » (hypertrophie) et de différenciation. Il est organisé en lobes adipeux qui sont formés par des lobules adipeux regroupant les adipocytes et séparé par des septa (Boulet and Galitzky, 2020).

L'hypoderme participe à la thermorégulation du corps de par la présence de glandes sudoripares situées profondément dans le derme. Il protège aussi la peau des variations mécaniques, ceci est notamment attribué à sa gestion de la résistance, de la sensibilité mécanique *via* les corpuscules de Pacini et de l'absorption des chocs (Findlay and Gurtner, 2017). Outre ces deux fonctions, le tissu adipeux blanc possède de nombreuses fonctions métaboliques dont la régulation de l'homéostasie énergétique *via* les mécanismes de lipogenèse, de lipolyse et leurs contrôles endocriniens par des médiateurs exprimés par les adipocytes eux-mêmes (adipokines, chimiokines, cytokines pro- ou anti- inflammatoires, protéines vasculaires) (Coelho *et al.*, 2013).

De manière générale, la masse corporelle du tissu adipeux et sa répartition dépendent de plusieurs paramètres dont l'âge, le sexe, le déterminisme génétique et de facteurs liés au mode de vie (Viguerie *et al.*, 2012).

1.1.1.1.4. Les annexes cutanées

Les annexes cutanées ainsi que leurs cellules souches apparentées ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie, la régénération épidermique, mais elles participent également à la cicatrisation et la protection contre les blessures (J. Xie *et al.*, 2016). Ces annexes sont dérivées du tissu épidermique invaginé et se prolongent jusque dans le derme voire l'hypoderme pour certaines régions comme le cuir chevelu (Nguyen *et al.*, 2009).

Les follicules pilosébacés

Parmi ces annexes nous retrouvons les follicules pilo-sébacés qui sont constitués de poils et de leurs follicules en association avec une ou plusieurs glandes sébacées et un muscle redresseur (arrecteur) du poil. Au niveau de l'aîne et de la région axillaire, le follicule pileux peut être associé à une glande sudoripare apocrine. Il existe une variabilité interindividuelle selon les régions du corps concernant la répartition des follicules et des glandes sudoripares. On compte en moyenne entre 65 et 700 follicules / cm² contre 160 à 270 glandes sudoripares / cm² (Szabo, 1967). L'appareil pilo-sébacé est donc retrouvé majoritairement dans les régions non velues (excepté sur la paume des mains), les lèvres, les mamelons, certaines parties des organes génitaux et la plante des pieds. Bien que les poils soient constitués de cellules kératinisées et mortes, celles-ci sont fusionnées et constituées de kératine solide et durable. De plus, les cellules de cette « kératine dure » ne se desquament pas (Marieb *et al.*, 2014). Les poils se renouvellent grâce à un important réservoir de cellules souches de manière cyclique, asynchrone et stochastique. Le cycle pileux est ainsi constitué d'une alternance successive de phases de croissance (anagène), de régression (catagène) et de repos (télogène) pendant laquelle le follicule s'atrophie quelque peu, au niveau du bulbe (Stenn and Paus, 2001). Un des traits caractéristiques du poil est apporté par la présence de mélanine dans son cortex responsable de la pigmentation du poil qui est continuellement renouvelé grâce à un réservoir de mélanocytes progéniteurs au niveau de la partie supérieure de la gaine épithéliale externe de la racine du poil. Cette région se trouve en continuité avec l'épiderme et est principalement caractérisée par la présence de cellules immunitaires et sensibles environnantes,

telles que les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Bernard *et al.*, 2006; Stenn and Paus, 2001). Outre sa croissance et son renouvellement, le poil reçoit des nutriments, des signaux moléculaires et cellulaires indispensables à sa croissance *via* la papille du poil à la base du bulbe pileux, composée d'un tissu dermique et hautement vascularisé (Stenn and Paus, 2001).

Les glandes sébacées

Dans la partie supérieure des follicules pilo-sébacés, les glandes sébacées sont formées de sébocytes, des kératinocytes particuliers, qui produisent et sécrètent le sébum, un mélange complexe de lipides fournissant à la peau une certaine lubrification tout en améliorant l'imperméabilité de l'épiderme. Ces sécrétions holocrines, formées par l'accumulation de gouttelettes lipidiques cytoplasmiques, vont entraîner un déversement dans le canal folliculaire du follicule pileux ou directement vers un pore de la surface cutanée (plus rarement) de leur contenu. Cette étape est suivie par leur désintégration complète ultérieure (Picardo *et al.*, 2009). Les contractions du muscle arrecteur du poil vont alors pousser le sébum vers la surface de la peau (Marieb *et al.*, 2014). La composition du sébum humain est détaillée dans la Figure 1.4 (Lovászi *et al.*, 2017; Picardo *et al.*, 2009). Par ailleurs, les sécrétions sébacées sont influencées par les niveaux hormonaux, notamment les androgènes, variant avec l'âge et le sexe (Makrantonaki *et al.*, 2011). La production de sébum est également liée au nombre et à la taille des glandes et est augmentée chez la femme et l'homme à la puberté (Picardo *et al.*, 2009). Cette augmentation est par ailleurs la principale cause impliquée dans la physiopathologie de l'acné. Parmi les autres facteurs, on compte la séborrhée, la colonisation par *Propionibacterium acnes* ou encore la libération de médiateurs inflammatoires, modifiant ainsi quantitativement et qualitativement le sébum (Makrantonaki *et al.*, 2011). La densité de répartition des glandes sébacées est aussi dépendante de la région du corps. En effet, bien que celles-ci soient réparties sur une grande partie de la surface du corps, à l'exception des paumes des mains et de la plante des pieds, elles atteignent une concentration élevée au niveau du front et du cuir chevelu avec une densité de 400 à 900 glandes / cm² (Thody and Shuster, 1989). Parmi les fonctions attribuées au sébum, on retrouve ses activités (i) antibactériennes et antifongiques orchestrées par les acides gras libres du sébum maintenant le pH acide cutané compris entre 4,1 et 6,0, (ii) de thermorégulation, (iii) limitant la PIE et (iv) de maintien de l'hydratation de la peau (Lovászi *et al.*, 2017).

Les glandes sudoripares

Au niveau des zones moins velues, nous retrouvons en majorité les glandes sudoripares, glandes simples tubuleuses et en forme de spirales, classées en deux types principaux selon le type de sécrétion : mérocrines et apocrines. La glande mérocrine est en grande partie responsable de la sécrétion de sueur avec 2 à 4 millions de glandes réparties sur toute la surface corporelle contrairement aux glandes apocrines limitées à des régions spécifiques de la peau comme les régions axillaires et ano-génito-périnéale (Baker, 2019). À partir de l'âge de 2-3 ans, le nombre total de glandes mérocrines est atteint. Elles sont fonctionnelles tôt et leur taux de sécrétion régionale et corporel total intra- et inter-individu est principalement dû aux différences de taux de sécrétion sudorale par glande mérocrine et non pas dû à la densité de glandes actives (Sato and Dobson, 1970). La fonction principale de cette glande est la thermorégulation en jouant un rôle dans la prévention du réchauffement excessif du corps grâce à la sécrétion de la sueur par les cellules sécrétrices à la surface du corps *via* le pore de leur canal excréteur (Baker, 2019). Les glandes sudoripares sont régulées directement par le système nerveux central sympathique et le système nerveux autonome, si bien que la plupart du temps cette sécrétion est indépendante de notre volonté (Marieb *et al.*, 2014). La sueur est un filtrat hypotonique du sang qui est modifié le long du canal excréteur par des phénomènes d'absorption du sodium et la pénétration d'autres substances (Baker, 2019). Sa composition générale est détaillée dans la Figure 1.4, bien que certains facteurs, tels que le taux de transpiration, les prédispositions génétiques à certaines pathologies et la médication modifient sa composition (Baker, 2019). Elle contient, par ailleurs, des facteurs hydratants naturels (lactate, urée, sodium, potassium) pour maintenir l'hydratation cutanée et des peptides antimicrobiens, dont la dermcidine, la cathélicidine et la lactoferrine, dans le cadre de la défense immunitaire de l'hôte (Baker, 2019). Outre les composants de base de la sueur, les glandes apocrines sécrètent, quant à elle, une sueur visqueuse ayant une apparence laiteuse ou jaunâtre due à sa teneur en lipides, protéines et stéroïdes (Baker, 2019; Marieb *et al.*, 2014). Ces glandes deviennent fonctionnelles seulement à la puberté et leur canal excréteur débouche dans l'infundibulum de l'unité pilo-sébacée en réponse à des stimuli émotionnels. Une fois en surface, les sécrétions sont inodores, mais peuvent devenir odorantes suite à leur dégradation en acides gras à chaîne courte sous l'action de bactéries diphtéroïdes aérobies (Mogilnicka *et al.*, 2020). Dans une plus large mesure, la sueur secrétée en combinaison avec l'eau atmosphérique ou provenant des couches profondes du derme (PIE) et les lipides du sébum issus

des glandes sébacées forme le film hydrolipidique de surface. Cette couche protectrice de surface est une émulsion naturelle de type H / L (hydrophile / lipophile) qui prévient la déshydratation cutanée et résiste aux dommages causés par les corps étrangers (Martini, 2011).

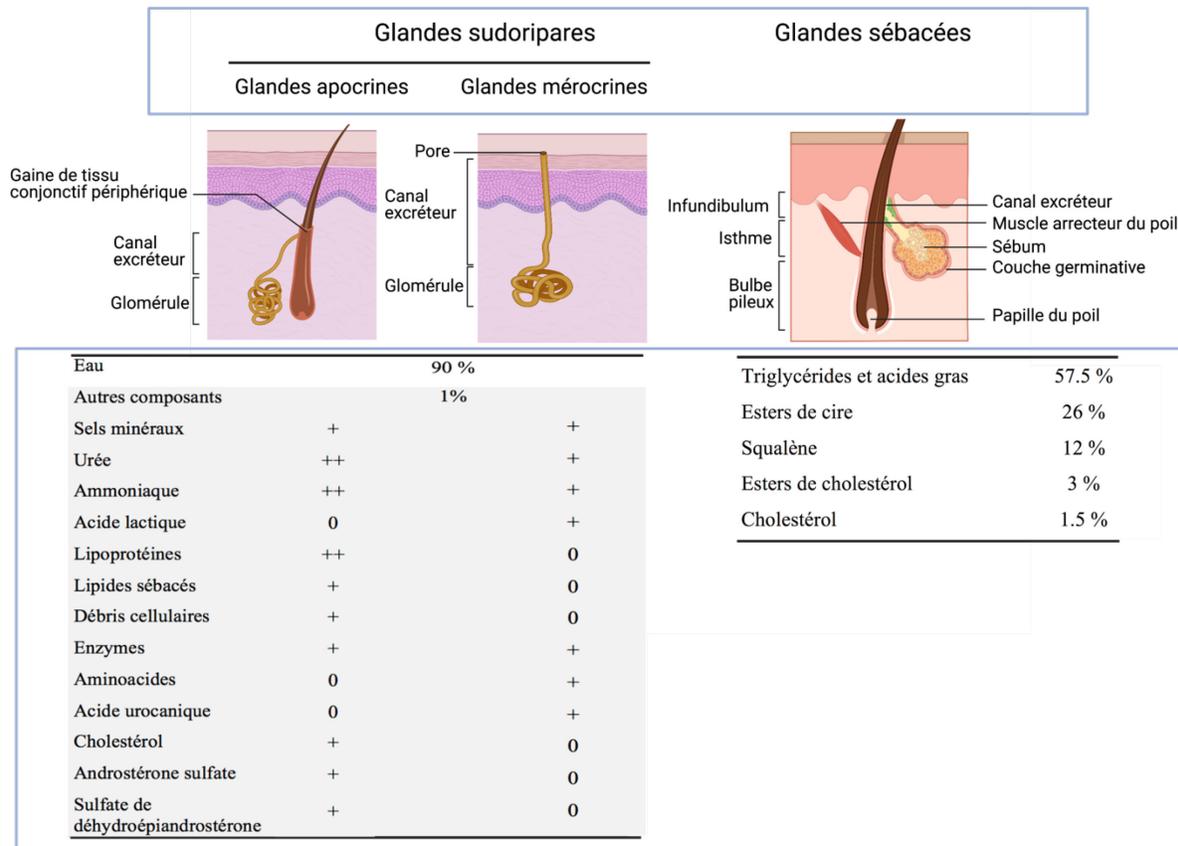


Figure 1.4 Structures et compositions approximatives des glandes cutanées chez le patient sain sans pathologie associée et en condition normale (sans effort physique). Étude comparative de la composition des glandes mérocrines et apocrines, adapté de (Martini, 2011). Niveaux : (++) indique une teneur élevée ; (+) indique une teneur moyenne et (0) indique une absence de composé. Cette figure a été créée avec BioRender.com.

1.1.1.1.5. La vascularisation et l'innervation cutanée

La vascularisation cutanée se compose d'un système artério-veineux et lymphatique qui contient deux structures principales : un plexus vasculaire sous-papillaire qui délimite la limite inférieure du derme papillaire et un plexus superficiel profond. Le plexus profond est organisé par

des artères et des veines cutanées qui forment un réseau anastomotique parallèle à la surface cutanée. De ce dernier émanent des collatérales qui vont à la fois irriguer les glandes sudoripares et les follicules pileux, et s'étendre pour former un réseau anastomotique dense formé d'artérioles et veinules. C'est ce qu'on appelle le plexus vasculaire sous papillaire. De ce réseau, les capillaires artériels vont finalement s'organiser en anses capillaires pour irriguer les papilles dermiques (Prost-squarcioni *et al.*, 2008). Ces divers vaisseaux communicants permettent ainsi d'apporter nutriments et oxygène à l'épiderme avasculaire. À plus grande échelle, lorsque le besoin en apport sanguin augmente considérablement, les vaisseaux sanguins entourés de fibres musculaires lisses et de péricytes (ou cellules de Rouget) se contractent pour propulser le sang vers les muscles et les organes (Bergers and Song, 2005). Outre son rôle nutritif, les anastomoses artério-veineuses jouent également un rôle important dans la zone thermoneutre (Walløe, 2015). Cette microcirculation sanguine dermique a par ailleurs été décrite en « parapluie » par Braverman *et al.* et se démarque par son réseau de vaisseaux lymphatiques parallèle à celle-ci (Braverman, 2000) (Figure 1.5). L'organisation de la circulation lymphatique s'apparente à un calque du système vasculaire avec un plexus sous-papillaire et profond qui est proche des tissus sous-cutanés (Prost-squarcioni *et al.*, 2008). La connexion aux vaisseaux collecteurs superficiels lymphatiques dans le derme va assurer le drainage du liquide interstitiel contenant notamment de l'eau, des déchets, des cellules immunitaires et des antigènes hors des vaisseaux sanguins pour rejoindre par confluences successives les grosses veines à la base du cou.

De façon intéressante, le système vasculaire dermique change histologiquement selon l'âge avec une corrélation entre la diminution du nombre total de vaisseaux sanguins et le vieillissement cellulaire cutané (Gunin *et al.*, 2014).

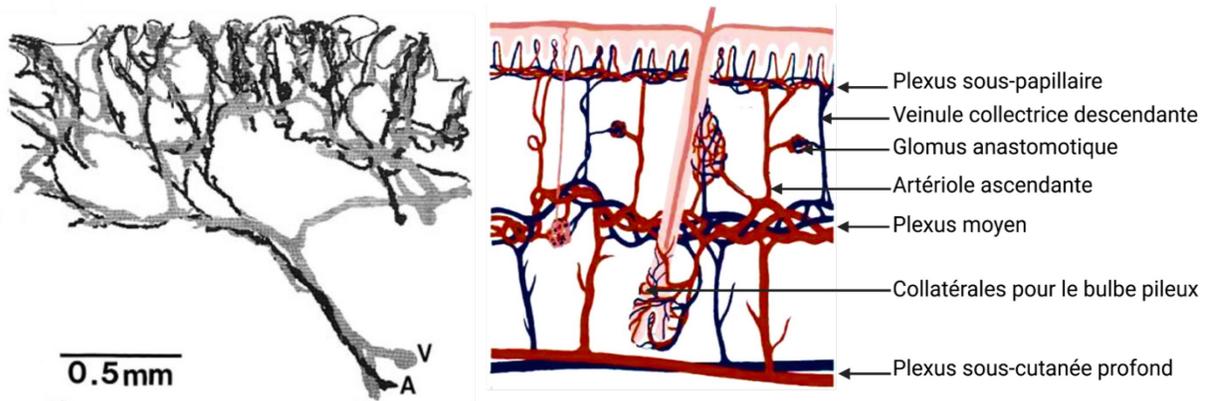


Figure 1.5 Représentation schématique de l'organisation du système microvasculaire cutané. Reconstruction dite « en parapluie » d'une branche du plexus moyen jusqu'au plexus sous-papillaire situé à 1-2 mm sous la surface épidermique (panneau de gauche). A, artériole ascendante d'où proviennent cinq branches immédiates finissant par des artérioles terminales donnant naissance aux anses capillaires. V, veinule collectrice descendante constituée de neuf veinules post-capillaires convergentes qui terminent les boucles papillaires de ce plexus. D'après Braverman *et al.* (Braverman, 2000). Les artérioles et veinules connectent les plexus sous-papillaire et profond et fournissent un réseau de collatérales qui alimentent les bulbes pileux et les glandes sudoripares (panneau de droite). Adapté de (Prost-squarcioni *et al.*, 2008).

Le système nerveux cutané est également organisé en plexus pour innover le derme et l'hypoderme, mais il possède aussi des terminaisons nerveuses libres au niveau de l'épiderme (excepté la couche cornée). Le système nerveux périphérique cutané est composé de voies afférentes (sensitives) transmettant les informations sensorielles des neurones somatiques provenant de stimuli externes environnementaux et de voies efférentes (motrices). Il existe deux types d'innervation pour les voies motrices appartenant au système nerveux périphérique : l'innervation somatique (volontaire) qui innerve les muscles squelettiques et végétative (involontaire) qui innerve, entre autres, quelques glandes endocrines, la majorité des glandes exocrines, les muscles lisses.

L'innervation végétative au niveau du derme est assurée de façon prédominante par des fibres post-ganglionnaires sympathiques non myélinisées de type C issues de la chaîne

ganglionnaire sympathique paravertébrale. Elle est impliquée dans les mécanismes de la transpiration au niveau des glandes sudoripares, la vasomotricité, le flux sanguin et la régulation inhérente de la température par libération de neurotransmetteurs, tels que l'acétylcholine au niveau des récepteurs muscariniques / nicotiniques ou encore les catécholamines au niveau des récepteurs adrénergiques (Glatte *et al.*, 2019).

D'autre part, l'innervation somato-sensorielle est à la base de la sensibilité cutanée qui regroupe la sensibilité mécanique, la sensibilité thermique et la sensibilité à la douleur (nociception). Leurs neurones sensoriels primaires ont leur corps cellulaire dans les ganglions de la racine dorsale et les ganglions sensoriels crâniens (Abraira and Ginty, 2013; Glatte *et al.*, 2019). Les nerfs somatiques myélinisés du derme forment des plexus sous-cutané et intradermique d'où proviennent différents types de terminaisons : libres, dilatées ou corpusculaires (Reznik, 1996). Dans l'épiderme, les terminaisons nerveuses sont libres et amyélinisées, tandis que dans l'hypoderme et le derme profond celles-ci sont myélinisées et encapsulées (corpuscule de Pacini) (Glatte *et al.*, 2019; Reznik, 1996). Physiologiquement, ces nerfs relayent chaque sensation grâce à des récepteurs cutanés spécifiques.

On distingue ainsi :

- Les terminaisons nerveuses libres, ramifiées, dérivées de petites fibres de type A δ et C somatiques au niveau des poils et des glandes sébacées qui sont des mécanorécepteurs tactiles cutanés, thermorécepteurs et des nocicepteurs (Abraira and Ginty, 2013; Glatte *et al.*, 2019). Les fibres C détectent principalement la chaleur alors que les fibres C et A δ répondent à la sensation de froid (Martín-Alguacil *et al.*, 2016).
- Les terminaisons nerveuses dilatées, constituées des fibres somatiques de type A δ , A β et C autour de la tige des follicules pileux sont sensibles aux mouvements de la peau et à la déflexion du follicule pileux. De plus, les disques de Merkel associant une fibre nerveuse libre de type A β et une cellule de Merkel font également partie de ce groupe (Abraira and Ginty, 2013).
- Les terminaisons corpusculaires comprennent les corpuscules de Meissner, Pacini, et Ruffini constituées de fibres somatiques de type A β . La sensibilité à la pression est apportée par les corpuscules de Merkel (couche basale de l'épiderme) et de Ruffini (derme) qui sont sensibles à la pression / l'indentation de la peau et la pression d'étirements, respectivement

(Abraira and Ginty, 2013). Enfin, les corpuscules de Meissner (derme papillaire) perçoivent la déformation dynamique en tant que mécanorécepteurs tactiles cutanés (Abraira and Ginty, 2013), tandis que les corpuscules de Pacini (derme profond, hypoderme) détectent les vibrations de contact à court terme et à haute fréquence (principalement de 20 à 1000 Hz) (Quindlen *et al.*, 2015). Dernièrement, les corpuscules de Krause (derme profond de la peau et des muqueuses) sont des corpuscules particuliers, autrefois considérés comme des récepteurs sensoriels du froid. Ils sont constitués de terminaisons axonales libres myélinisées contenues dans une capsule fibroblastique, d'où leur caractérisation « d'amas de terminaisons libres » (Cobo *et al.*, 2021).

1.1.1.2. Les fonctions cutanées

Notre peau est avant tout une barrière à divers niveaux : chimique, biologique et physique, qui lui assure le maintien de son intégrité et des structures qu'elle protège grâce à son système immunitaire puissant. En complément de son rôle sensoriel et de réservoir sanguin (voir section 1.1.1.1.5), la peau possède de nombreux rôles qui lui sont attribués de par ses structures et ses annexes, tels que : la protection, la thermorégulation et une fonction métabolique essentielle.

1.1.1.2.1. La peau, une barrière protectrice

La structure de la peau et sa position entre l'environnement externe et nos organes internes permettent la cohésion de trois barrières, l'une chimique, l'autre physique et une dernière biologique. Cette protection à trois niveaux est essentielle dans la lutte de l'organisme contre les divers stress externes et potentiellement dangereux. Ces stress peuvent provenir de certains agents toxiques (bactéries, virus, métaux lourds, substances chimiques), des rayons UV, des températures extrêmes et des agressions mécaniques.

La barrière chimique

Cette fonction barrière est notamment assurée par des antioxydants enzymatiques et moléculaires, des substances antimicrobiennes, le pH cutané, des substances filtrantes, ainsi que des molécules organiques acidifiantes pour la défense de l'organisme contre les substances pathogènes bactériennes, virales et les rayons UV. La peau est constituée d'une véritable armée de micro-organismes incluant les bactéries, les champignons et les virus qui sont répartis en deux

catégories : la flore cutanée résidente et la flore cutanée transitoire. Ce microbiome cutané recouvre la surface de la peau et est également retrouvé profondément au niveau des annexes cutanées (glandes, cheveux). De plus, il se distingue par un équilibre délicat entre l'hôte et les micro-organismes (Grice and Segre, 2011). En effet, lors d'un déséquilibre entre ces deux composantes, qui peut être d'origine endogène (ex : mutations au sein de la génétique microbienne) ou exogène (ex : hygiène corporelle, antibiotiques, vêtements), des infections ou des troubles cutanés peuvent survenir (Grice and Segre, 2011). Grâce à son pH acide, la peau permet de lutter contre les micro-organismes pathogènes nocifs de sa flore transitoire (Lambers *et al.*, 2006). Bien que son origine reste conjecturale, de nombreux acteurs participent au « manteau acide » cutané, comme d'une part, *P. acnes*, une bactérie commensale de la flore cutanée qui hydrolyse les triglycérides du sébum en acides gras contribuant ainsi au pH acide (Shu *et al.*, 2013). D'autre part, des mécanismes actifs et passifs semblent également être impliqués dans la formation du « manteau acide » (Lambers *et al.*, 2006). Parmi ces mécanismes, nous retrouvons du côté du mécanisme passif majoritairement des acteurs comme l'acide lactique et les acides pyrrolidone carboxylique et urocanique, des facteurs naturels d'hydratation (Pandey *et al.*, 2010). Le mécanisme actif, quant à lui, est formé principalement par des pompes à protons situées dans les membranes des corps lamellaires créant un gradient de pH variant de 2 à 3 unités du *stratum granulosum* à la surface de la peau (Chapman and Walsh, 1989; Fluhr and Elias, 2002; Hanson *et al.*, 2002). Le pH acide est également un déterminant sélectif pour la croissance des flores cutanées résidentes et transitoires en offrant à la fois le biotope adapté à la croissance de sa flore résidente (commensalisme) tout en s'assurant que celle-ci assure son rôle de défense contre la colonisation et la prolifération de bactéries nocives (mutualisme). *Staphylococcus epidermis* est par exemple une bactérie commensale et mutualiste, représentant environ 90 % de la flore résidente (Cogen *et al.*, 2008). En parallèle, d'autres acteurs, tels que les peptides antimicrobiens (défensines, cathélicidines, lactoferrine) perméabilisent entre autres la membrane bactérienne (Lehrer *et al.*, 2005). Les acides gras libres et les lipides possédant une base à longue chaîne tels que les sphingosines ont aussi montré avoir une activité antimicrobienne (Wertz, 2018).

Finalement, la peau est aussi une barrière photoprotectrice grâce à l'action conjointe de plusieurs acteurs : d'une part avec l'acide trans-urocanique (Gibbs and Norval, 2011) et d'autre part la mélanine en offrant une protection contre les dommages à l'acide désoxyribonucléique

(ADN) produits par absorption d'une partie des rayons ultraviolets (Brenner and Hearing, 2008; D'Orazio *et al.*, 2013). Cependant, leur efficacité en tant que photoprotecteur est contrastée par l'effet sensibilisateur de la mélanine et de l'acide cis-urocanique après une exposition UV générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Brenner and Hearing, 2008; Gibbs and Norval, 2011). Pour remédier à ce problème, la peau possède pour cela un autre système de protection à base d'enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase) produites notamment par les kératinocytes et les fibroblastes (Hellemans *et al.*, 2003). Parallèle à ces mécanismes, l'exposition aux UV produit aussi un épaissement de l'épiderme, appelé l'hyperkératinisation, évitant ainsi la pénétration du rayonnement UV (D'Orazio *et al.*, 2013).

La barrière physique

L'organisation de la couche cornée est un élément essentiel lui assurant une protection contre les agressions mécaniques amenant à différents types de déformation (écrasements, étirements, cisaillements, frictions) tout en maintenant son intégrité.

Ce bouclier face aux agressions physiques est permis grâce à l'amortissement des agressions mécaniques sur la structure de la peau grâce :

- Au niveau de l'épiderme, d'une part, à sa matrice fibreuse intracornéocytaire lui apportant une certaine souplesse, rigidité et résistance grâce à la présence de la kératine (Bragulla and Homberger, 2009). D'autre part, au moyen de son ciment lipidique intercornéocytaire, de son enveloppe cornée et de ses cornéodesmosomes lui apportant une certaine rigidité, cohésion intercellulaire et flexibilité au niveau de ses jonctions (Potter *et al.*, 2009)
- Au niveau du derme, sa matrice extracellulaire lui assurant une résistance à la traction (collagène) et une élasticité (élastine) (Muiznieks and Keeley, 2013).
- Au niveau de l'hypoderme, son tissu sous-cutané agissant comme un amortisseur de chocs et de pressions protégeant ainsi les os et les muscles par remodelage de la matrice extracellulaire (Alkhouli *et al.*, 2013).

Le maintien de l'homéostasie hydrique cutanée constitue également un paramètre important tout en apportant une certaine flexibilité au niveau de la couche cornée. En effet, l'eau agit comme un plastifiant par affinité envers la kératine de la peau ce qui influence fortement les propriétés viscoélastiques de la peau (Choe *et al.*, 2017). Cette hydratation est maintenue par plusieurs

facteurs, tels que les facteurs naturels d'hydratation qui contribueraient à la diffusion de l'eau vers les sites de kératines (Choe *et al.*, 2017), les lipides intercellulaires, les jonctions serrées et le glycolipide imperméabilisant qui offrirait une protection des substances hydrosolubles (Potter *et al.*, 2009). Cependant, cette imperméabilité n'est pas totale, car une légère déperdition hydrique constante par diffusion (PIE) et par la sueur des glandes sudoripares au niveau de l'épiderme a lieu quotidiennement à hauteur de 300-400 mL/jour (Dmitrieva and Burg, 2011). De plus, le film hydrolipidique aurait également un rôle pour retarder la déshydratation cutanée (Hussain *et al.*, 2017). La peau représente donc une barrière semi-perméable qui permet aussi la pénétration de nombreuses substances selon leur nature physico-chimique comme notamment les substances liposolubles ou encore les solvants organiques qui solubilisent les lipides (Barba *et al.*, 2016) et les métaux lourds apportés par la pollution environnementale (Tchounwou *et al.*, 2012).

1.1.1.2.2. La fonction de thermorégulation

Afin de maintenir l'homéostasie thermique de notre organisme, la circulation cutanée est soumise à de nombreux mécanismes de contrôles physiologiques régulés par le système nerveux sympathique contrôlant le flux sanguin. En effet, lorsque la température de l'organisme augmente, les nerfs vasodilatateurs du système sympathique, en grande majorité responsable de la vasodilatation cutanée (80-90 %), vont enclencher ce mécanisme pour induire une dissipation thermique. De plus, l'évaporation de la sueur en surface de la peau et la diminution des transferts de chaleur entre les organes profonds et la peau vont conjointement aider à la diminution de la température corporelle. Lors d'un refroidissement local de la peau, le flux sanguin diminue par la vasoconstriction des vaisseaux sanguins du derme sous l'action des nerfs vasoconstricteurs noradrénergiques pour entraîner une dissipation thermique en surface de la peau. Ce phénomène combiné à la génération de frissons permettent tous deux la génération et la conservation de la chaleur interne (Charkoudian, 2003). Mais la thermogénèse peut être également « non frissonnante » et médiée par le tissu adipeux sous-cutané contribuant à la fois au stockage énergétique, à l'isolation thermique et à la détection de variation de température par les cellules adipeuses blanches et beiges (senseur du froid). Ces boucles de rétroaction négative influençant la thermorégulation physiologique sont en fait enclenchées suite aux variations de température détectées par l'hypothalamus préoptique / antérieur au niveau du système nerveux central qui maintient un équilibre entre la dissipation thermique et la génération de chaleur (Ye *et al.*, 2013).

Le contrôle thermorégulateur du flux sanguin cutané peut varier pendant la ménopause chez la femme ou être altéré dans certaines pathologies (maladie de Raynaud, diabète de type 2) (Charkoudian, 2003).

1.1.1.2.3. La fonction métabolique

La peau est un tissu métaboliquement actif produisant des enzymes essentielles sur le plan biologique pour la synthèse, l'activation et la neutralisation de substances actives endogènes ou exogènes (ex : médicaments). Elle participe également à l'homéostasie du collagène (Ganceviciene *et al.*, 2012). Sous l'effet des rayonnements UV, le 7-déshydrocholestérol, précurseur biosynthétique du cholestérol, est utilisé pour synthétiser la vitamine D₃ (cholécalférol). Une fois celle-ci activée, elle va être transportée au niveau du foie puis des reins pour subir deux réactions d'hydroxylation formant le 25-hydroxyvitamine D (forme circulante majeure) et le 1,25-hydroxyvitamine D (calcitriol, biologiquement actif) (Institute of Medicine (US), 2011). De plus, la 1,25-hydroxyvitamine D a un rôle en favorisant l'absorption du calcium et du phosphore au niveau du tractus gastro-intestinal dans le métabolisme minéral (Shaker JL, Updated 2018 Jan 19). Les kératinocytes possèdent également la machinerie enzymatique pour métaboliser la vitamine D en métabolites actifs, notamment le calcitriol, ainsi que le récepteur de la vitamine D. Par ailleurs, la vitamine D et / ou son récepteur sont impliqués dans de nombreuses fonctions liées au cycle cellulaire des kératinocytes, la régulation du cycle pileux et à la suppression potentielle de tumeur dans le cas des cancers de la peau (Bikle, 2012). Malheureusement, une exposition chronique de la peau aux rayonnements UV entraîne un photo-vieillessement cutané générant des dommages au niveau de l'ADN qui se traduisent par des manifestations histologiques et cliniques importantes telles que les rides. Différentes stratégies métaboliques existent, afin de prévenir le photo-vieillessement comme les antioxydants endogènes enzymatiques et non enzymatiques (mélanine, glutathion, vitamines) ou encore les rétinoïdes endogènes qui vont inhiber la synthèse de collagénase et favoriser la production de collagène par les fibroblastes (Ganceviciene *et al.*, 2012).

La peau, tout comme le foie, possède un système métabolique au niveau de l'épiderme viable (majoritaire) et du derme basé sur plusieurs isoenzymes du cytochrome P450, ainsi que des protéines de transport d'influx et d'efflux au niveau des kératinocytes (Schaefer and Filaquier, 1992). Cette activité de biotransformation permet notamment de former une barrière biochimique

supplémentaire pour neutraliser les substances étrangères non piégées (solvants, médicaments, substances cancérigènes) par les premières barrières et représente au prorata du nombre de cellules 1/3 de l'activité métabolique du foie (Pyo and Maibach, 2019). L'absorption d'une substance active est donc directement influencée par ce processus métabolique qui peut augmenter par ailleurs la solubilité de molécules lipophiles, leur transport / diffusion à travers les couches cutanées, leur efficacité thérapeutique et / ou leurs effets indésirables *via* l'hapténation des protéines (réaction d'hypersensibilité médicamenteuse) (Pyo and Maibach, 2019; Schaefer and Filaquier, 1992). Cette activité enzymatique dépend de l'âge, du site anatomique et du sexe (Pyo and Maibach, 2019).

1.1.2. L'absorption cutanée de substances actives par voie transdermique

1.1.2.1. Les voies de passage transcutané

L'absorption cutanée est un phénomène passif qui permet le passage de substances actives à travers les structures de la peau. Ce phénomène commence tout d'abord par la libération de la substance active (perméant) de son véhicule. La première étape limitante réside dans le partage du médicament dans le *stratum corneum* (coefficient de partage véhicule / *stratum corneum*) dépendante de sa solubilité dans chaque partie (véhicule ou *stratum corneum*) et de sa diffusivité dans son environnement. Ce dernier paramètre est sous la dépendance des propriétés physicochimiques de la substance active (solubilité, poids moléculaire, charge) dans une région caractérisée à la fois par sa dynamique et son alternance de structure. Ainsi, la superposition des couches cutanées forme un enchaînement de barrières à prédominance avasculaire et lipophile (*stratum corneum*), suivant une structure aqueuse hydrophile (épiderme viable, derme) et enfin des réservoirs lipophiles en profondeur (tissu adipeux, hypoderme) (Vitorino *et al.*, 2015). De plus, en surface de la peau, des pores formés par des défauts ou des imperfections dans les espaces intercornéocytaires (Haftak, 2017) contribuent eux aussi à la prise en compte d'autres facteurs comme la tortuosité, la porosité et la distribution de la taille des pores. Ces divers facteurs vont donc influencer le trajet diffusionnel de la substance active (Neupane *et al.*, 2020; Vitorino *et al.*, 2015). Cette voie de passage est modifiée par des techniques, telles que l'occlusion augmentant l'hydratation cutanée ou encore après un traitement du *stratum corneum* avec des agents désorganisant le réseau lipidique lamellaire intercellulaire (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Vitorino *et al.*, 2015).

Ensuite, l'absorption cutanée peut être divisée en trois étapes :

- La première étape est la pénétration, qui est un mécanisme de passage de la substance active dans l'épiderme. Pour une action locale, l'absorption transcutanée sera diminuée, voire nulle, et la substance active s'accumulera dans une couche donnée de l'épiderme tandis que pour une action systémique la substance active rejoindra l'épiderme viable suivi du derme réticulaire augmentant par conséquent l'absorption transcutanée.
- La deuxième étape est la perméation, qui décrit le mouvement de passage d'une substance active d'une couche à l'autre.
- La dernière étape est la résorption, qui est l'absorption d'une substance active dans le système vasculaire (système lymphatique et / ou vaisseaux sanguins). Généralement, les médicaments sont libérés dans le sang par convection, puis pénètrent dans les parois des vaisseaux sanguins pour être libérés par la suite dans les tissus environnants par diffusion ou convection. Ces mécanismes ont donc un rôle prépondérant pour la résorption de petites molécules dans le sang (poids moléculaire < 1000 Da), tandis que des molécules plus importantes, telles que les peptides sont évacués par le système lymphatique (Hawley *et al.*, 1995).

Il existe quatre voies de pénétration de substance active dans la peau : (i) la voie intercellulaire entre les cornéocytes, (ii) la voie transcellulaire à travers les cornéocytes et les lamelles lipidiques intercellulaires, (iii) la voie transfolliculaire comprenant les follicules pileux et les glandes sébacées et (iv) la voie par le canal sudoripare des glandes mérocrines. Ces voies ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, une substance active peut utiliser plusieurs voies de pénétration selon ses propriétés physicochimiques. La somme des flux combinés de ces différentes voies détermine le flux global d'absorption à travers la peau (Ng and Lau, 2015) (Figure 1.6).

Dans la voie intercellulaire, le perméant emprunte le chemin tortueux de la matrice extracellulaire composé du ciment lipidique intercornéocytaire. Bien que le trajet diffusionnel soit plus long par cette voie, celle-ci est privilégiée par les molécules lipophiles ou amphiphiles non chargées et de faible poids moléculaire, et constitue une voie de transport continue à travers le *stratum corneum* (Escobar-Chávez, 2010; Neupane *et al.*, 2020; Ng and Lau, 2015; Vitorino *et al.*, 2015). De plus, la résistance diffusionnelle de ces espaces intercornéocytaires est plus basse que

celle des cornéocytes pour la voie transcellulaire grâce en partie aux lipides moins ordonnés et aux chaînes hydrophobes flexibles diminuant la répulsion stérique des chaînes lipidiques hautement ordonnées (Escobar-Chávez, 2010; Neupane *et al.*, 2020). Il existe par ailleurs une théorie de la diffusion en volume libre qui s'applique seulement pour de petits poids moléculaires (< 400 Da), selon laquelle les molécules hydrophobes « saute » de poche en poche de volume libre de 4 Å avec une durée de vie de fluctuation de la poche d'environ 1,6 μ sec. Ces poches sont formées par la densité de fluctuation des chaînes lipidiques. Ainsi, les molécules hydrophobes de haut poids moléculaire diffuseront avec la diffusion latérale des lipides (Mitragotri, 2003; Neupane *et al.*, 2020). Par ailleurs, les molécules hydrophiles peuvent aussi traverser les pores intercornéocytaires étroits (≤ 10 nm) résultant d'un mauvais assemblage des constituants des lipides lamellaires ou diffuser latéralement le long des têtes polaires des espaces interlamellaires remplis d'eau malgré leur faible abondance (Escobar-Chávez, 2010; Mitragotri, 2003; Neupane *et al.*, 2020).

La voie transcellulaire est considérée comme une voie polaire directe à travers le *stratum corneum* où les substances hydrophiles traversent les cornéocytes dont leur enveloppe et leur cytoplasme forment un milieu hydrophile enrichie de kératine hydratée. Cette perméation nécessite aussi un partage consécutif entre cet environnement polaire et les domaines lipidiques de la matrice extracellulaire et de l'enveloppe cornée étroitement liés aux lipides intercornéocytaires (Neupane *et al.*, 2020; Ng and Lau, 2015; Vitorino *et al.*, 2015).

La voie transfolliculaire et la voie de passage par le canal sudoripare des glandes mérocrines sont considérées comme des shunts de faible résistance, formant des ouvertures de faible largeur (≥ 5 μ m) et pouvant atteindre directement le derme réticulaire (Escobar-Chávez, 2010). Bien qu'ils ne représentent que de 0,1 à 1 % de la surface de la peau, leur contribution est à nouveau d'intérêt pour les régions riches en follicules. En effet, cette voie est notamment intéressante pour les formulations colloïdales formant des réservoirs au niveau de l'infundibulum, pour les molécules de grandes tailles entre 400 et 700 nm ne traversant pas librement le *stratum corneum* et pour les substances actives hydrophiles (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Neupane *et al.*, 2020; Patzelt and Lademann, 2015; Vitorino *et al.*, 2015). De plus, le film hydrolipidique aiderait la dissolution de substances actives à la fois hydrophiles et lipophiles, car les molécules

doivent posséder une lipophilie modérée ($\log P \sim 1$) pour pénétrer par la voie folliculaire (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). Cependant, des phénomènes physiologiques comme un follicule inactif (Patzelt and Lademann, 2015), la sécrétion de sueur, le flux de sébum dans le sens inverse de la perméation de la substance active, ainsi que les glandes sébacées captant les molécules lipophiles (Marieb *et al.*, 2014) retardent voire empêchent la pénétration de substances actives.

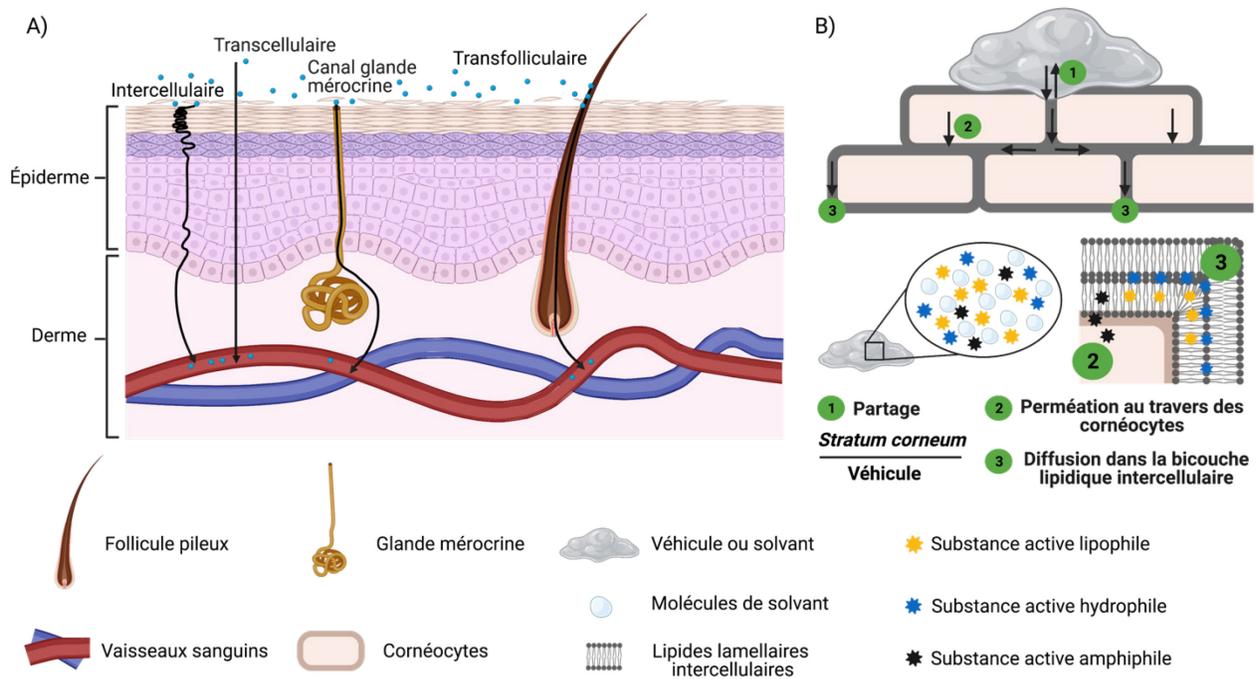


Figure 1.6 Représentation schématique du processus d'absorption cutanée. A) Les différentes voies de passage transcutané. B) Mécanismes potentiels pour le transport à travers la peau comprenant la diffusion et la distribution des substances dans le *stratum corneum*, la première barrière limitant la pénétration et perméation des substances actives. Adapté de (Roberts, 2002). Le processus d'absorption cutanée comprend donc différentes étapes : 1) la libération de la substance active de la formulation, 2) son partage et sa diffusion dans le *stratum corneum*, 3) son partage et sa diffusion dans l'épiderme viable et 4) son absorption dans les capillaires sanguins du derme papillaire pour rejoindre la circulation systémique. Cette figure a été créée avec BioRender.com.

1.1.2.2. Le mécanisme d'absorption percutanée

Les caractéristiques physicochimiques des perméants sont d'une importance essentielle pour l'absorption cutanée. L'étude de la cinétique de diffusion passive d'une molécule à travers la peau montre que la perméation ou le flux (J) à l'état d'équilibre est régi de manière simpliste par la loi de Fick :

$$J_{eq} = K_p \times \Delta C = \frac{K_m \times D \times \Delta C}{l} \text{ (Équation 1.1)}$$

$$D = \frac{l^2}{6T_{Lag}} \text{ (Équation 1.2)}$$

Où J est le flux percutané qui peut s'exprimer en $\mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$ avec K_p qui est le coefficient de perméabilité en cm/h , ΔC représentant la différence de concentration en substance active de part et d'autre de la membrane en $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, K_m qui est le coefficient de partage de la substance active à la surface de la couche cornée par rapport à sa concentration dans le véhicule (sans unité), D représentant le coefficient de diffusion en cm^2/h , l est l'épaisseur de la couche cornée en cm et T_{Lag} le temps de latence en h. Le coefficient de diffusion peut être estimé par la relation suivante suite à des mesures expérimentales (équation 1.2).

Le flux percutané correspond donc à la quantité de substance active qui diffuse par unité de surface et de temps. Par conséquent, ce processus est dépendant du gradient de concentration. Ce dernier correspond à la diffusion d'une substance active à travers une membrane (homogène, semi-perméable) d'une région plus concentrée en substance active (haut potentiel chimique) vers une région moins concentrée (bas potentiel chimique). Le graphique du flux de quantité absorbée en substance active en fonction du temps décrit une droite linéaire, après un temps de latence, correspondant à l'atteinte de l'état d'équilibre. En d'autres termes, lorsque le gradient de concentration devient constant de la couche cornée vers une couche interne. De plus, lorsque la saturation du véhicule est atteinte et que les conditions sink sont maintenues au niveau de la couche interne pour ne pas que la perméation soit limitée par la solubilité de la substance active, l'équation 1.1 devient :

$$J_{eq} = K_p \times C_v = \frac{K_m \times D \times C_v}{l} \text{ (Équation 1.3)}$$

Où C_v est la concentration de la substance active dans la formulation, la concentration de substance active dans la couche interne étant négligeable exprimée en $\mu\text{g} / \text{cm}^3$

Ces conditions sink sont définies comme la capacité du milieu de dissolution à dissoudre au moins 3 fois la quantité de substance active présente dans la forme galénique. En condition de saturation, l'activité thermodynamique de la substance active est à son maximum augmentant ainsi la perméation en influençant la libération et le flux de celle-ci à travers la peau. L'étape de résorption est généralement plus rapide que la perméation des substances actives à travers la peau. Selon l'action désirée locale ou systémique, les concentrations plasmatiques (C_{SS}) (Dancik *et al.*, 2008) ou épidermiques ($C_{SS, \text{épiderme}}$) à l'état d'équilibre (Roberts and Anissimov, 2005) à l'état d'équilibre sont décrites par les équations suivantes :

$$C_{SS} = \frac{F \times J_{eq} \times A}{Cl} \text{ (Équation 1.4)}$$

$$C_{SS, \text{épiderme}} = \frac{K_p \times C_v}{K_p + Cl_D / K_e} \text{ (Équation 1.5)}$$

Où F est la biodisponibilité *in vivo* (pas d'unité), A est l'aire d'application exprimée en cm², Ke est le coefficient de partage épiderme / véhicule (sans unité), Cl représente la clairance de la peau (action locale) ou du corps (action systémique) et Cl_D celle du derme exprimé en mL.min⁻¹.

Cependant, des mécanismes tels que le retour au site par le sang d'une substance active ou les cinétiques en doses finies de substance active compliquent les profils de pénétration dans la peau (Mitragotri *et al.*, 2011).

Diverses propriétés physico-chimiques des substances actives sont donc essentielles pour prédire la perméabilité y compris sa diffusion à travers la peau, telles que : le coefficient de partage ainsi que la taille / poids moléculaire et l'ionisation de la substance active.

1.1.2.2.1. Le coefficient de partage

Ce paramètre traduit de l'affinité, de la solubilité et du partage de la substance active dans son véhicule, ainsi que dans les différentes phases rencontrées tout au long du parcours de celle-ci : entre le *stratum corneum* et son véhicule, entre les lipides et les cornéocytes, et entre le *stratum corneum* et les couches cutanées internes hydrophiles. Bien que seulement la partie solubilisée de l'actif dans l'excipient diffuse, cette solubilité ne doit pas empêcher la diffusion de l'actif hors de

la formulation. Parmi les divers descripteurs présents dans les modèles simplistes du partage entre le *stratum corneum* et son véhicule, le plus commun est le logP. Celui-ci permet d'évaluer approximativement la solubilité de la substance active dans le *stratum corneum* et l'excipient via le coefficient de partage octanol / eau, où l'octanol représente un solvant modèle pour les lipides du *stratum corneum* et l'eau correspond aux cellules vivantes hydrophiles sous-jacentes de l'épiderme (N'Da, 2014). Par ailleurs, il a été montré qu'une molécule avec un logP entre 1 et 3 est associée à une perméation optimale dans la peau (N'Da, 2014; A. Williams, 2003). En effet, une molécule fortement lipophile s'accumulera au niveau du ciment intercellulaire du *stratum corneum* et sa libération sera faible du fait de sa forte affinité envers son véhicule lipidique (N'Da, 2014; Zhang *et al.*, 2009). Inversement, les molécules fortement hydrophiles ne pourraient pas être transférées au niveau du *stratum corneum* sauf si la peau se retrouve très hydratée par occlusion ou en utilisant des agents hydratants (A. C. Williams and Barry, 2012). L'effet de l'occlusion sur les molécules hydrophiles et amphiphiles reste toutefois controversé (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Hafeez and Maibach, 2013).

1.1.2.2.2. La taille / le poids moléculaire et la forme

La peau constitue une membrane compacte où l'espace disponible pour le passage du perméant est limité. Il doit donc disposer d'une masse moléculaire, d'une taille ainsi que d'une forme adaptée pour pénétrer dans l'espace intercellulaire et se déplacer dans les phases lipidiques ou aqueuses lors de la pénétration transépidermique. En effet, le *stratum corneum* agit comme une véritable barrière à la pénétration de molécules de poids moléculaire supérieur à 500 Daltons selon « la règle des 500 daltons » suite aux découvertes empiriques de Bos *et al.* (Bos and Meinardi, 2000; Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). La tortuosité est aussi un élément sous la dépendance de la taille des molécules (descripteur corrélé au poids moléculaire et au volume moléculaire pour la plupart des molécules) (Neupane *et al.*, 2020). Par conséquent, les molécules de faible taille auront une grande capacité à diffuser dans une grande fraction de pores de la peau augmentant ainsi la longueur de leur trajet par rapport aux molécules possédant un rayon de van der Waals plus élevé (Mitragotri, 2003; Neupane *et al.*, 2020). Cette diffusion étant inversement proportionnelle au rayon hydrodynamique de la molécule (équation de Stokes-Einstein), les petites molécules auront donc une perméabilité augmentée *in fine*. D'autre part, les coefficients de diffusion dans des systèmes plus visqueux sont d'autant plus affectés par la dépendance du poids moléculaire dans la

diffusion de la substance active (Mitragotri, 2003). La forme de certains médicaments comme les prodrogues influence aussi le flux de perméation. Ainsi, l'augmentation de la longueur de la chaîne ester et sa ramification sont deux facteurs qui contribueraient à diminuer le flux de perméation transdermique (N'Da, 2014).

1.1.2.2.3. L'ionisation de la substance active

Considérant le gradient de pH du *stratum corneum* vers le *stratum granulosum* qui augmente et que l'ionisation d'une molécule est à la fois dépendante de son pH et de son pKa, le degré d'ionisation du perméant est sujet à être modifié. Le partage d'un composé ionisable (LogD) sera donc changé en fonction du pH et influencera directement la solubilité et le coefficient de partage. Ainsi, une molécule sous forme ionisée aura un logD plus bas (solubilité dans l'eau augmentée) qu'une espèce non ionisée et donc une perméabilité diminuée (Baba *et al.*, 2017).

D'autres facteurs tels que les interactions inter- et intramoléculaires ainsi que le point de fusion de la substance active influencent aussi la solubilité dans le *stratum corneum* et donc sa pénétration. En effet, selon le modèle de Hadgraft *et al.* (Hadgraft *et al.*, 1990), un abaissement du point de fusion en dessous de 200 °C augmenterait la contrainte de solubilité dans le *stratum corneum* et donc sa pénétration transcutanée (N'Da, 2014; Vitorino *et al.*, 2015). La formation de liaisons hydrogène basée sur le transfert partiel d'un atome d'hydrogène du donneur (NHD, number of *H-bond donors*) à l'accepteur (NHA, number of *H-bond acceptors*) (Choy and Prausnitz, 2011; X. Liu *et al.*, 2011; N'Da, 2014), les forces de van der Waals (Liu *et al.*, 2011; N'Da, 2014), ainsi que la dipolarité d'une substance active (Liu *et al.*, 2011) influencent aussi la pénétration cutanée. Puisque le *stratum corneum* est principalement un donneur de liaison hydrogène, la formation de liaison hydrogène entre la substance active et celui-ci est un déterminant influençant négativement la perméation de l'actif à travers les couches du *stratum corneum* (N'Da, 2014; Pugh *et al.*, 1996).

Finalement, il existe également une règle largement utilisée pour de nombreuses voies d'administration de substances actives en tenant en compte à la fois de leur diffusion à travers une barrière lipidique et de leur solubilité dans les phases aqueuses, qui est la « règle des cinq » proposée par Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001). Cette relation prédit une mauvaise absorption ou perméation lorsque poids moléculaire > 500, NHD > 5, NHA > 10 ou log P > 5 (Choy and Prausnitz, 2011; Lipinski *et al.*, 2001).

1.1.2.3. Les méthodologies pour améliorer la pénétration et l'absorption de substances actives

Bien que l'administration percutanée offre divers avantages par rapport aux autres voies d'administration (auto-administration, pas d'effet de premier passage hépatique et de dégradation enzymatique ou acide), elle est jalonnée de nombreux défis pour la pénétration et l'absorption de substances actives. En effet, selon l'effet local ou systémique désiré, la formulation galénique détient un effet aussi important que les propriétés physico-chimiques des molécules thérapeutiques pour optimiser leur efficacité thérapeutique dont l'atteinte de la cible et leur sécurité d'emploi. Cependant, de nombreux facteurs physiologiques de la peau sont à considérer sachant que tous les médicaments ne possèdent pas l'ensemble des propriétés idéales nécessaires à leur administration.

Ce premier facteur englobe majoritairement :

- La variabilité de l'épaisseur du *stratum corneum*, l'architecture dense de ces couches cellulaires et les caractéristiques de ses couches de lamelles lipidiques influençant l'absorption. En effet, une diminution de l'épaisseur du *stratum corneum*, de la dimension des cornéocytes (les petits diminuent la longueur du trajet intercellulaire), une augmentation du flux sanguin (flux sanguin : front > avant-bras > mollet sous vasodilatateur topique) et du pourcentage en contenu lipidique sont d'autant de facteurs qui augmentent la pénétration au niveau du site d'application ou de régions du *stratum corneum* (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Tagami, 2008). Ces différences de perméabilité en termes d'absorption dans la peau suivent l'ordre établi et généralisé suivant : organes génitaux > tête et cou > tronc > bras > jambe (N'Da, 2014; Tagami, 2008; Vitorino *et al.*, 2015).
- Le développement épidermique, y compris le *stratum corneum* qui est pleinement fonctionnel chez les bébés de faibles poids et prématurés de 23-25 semaines seulement après 4 semaines. Cette fragilité de la barrière est donc à prendre en compte aux vues de l'augmentation de la perméation considérable de composés jusqu'à 30-32 semaines où la fonction barrière devient comparable à celle de l'adulte (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). De plus, chez les nouveau-nés et les petits nourrissons, le ratio surface corporelle / poids est plus élevé que chez l'adulte. Ce facteur en combinaison à de faibles taux de

sébum peut entraîner une absorption excessive de substance active. Ainsi, ils courent un plus grand risque de toxicité systémique suite à l'application d'un traitement thérapeutique ou de substances chimiques sur la peau (Oranges *et al.*, 2015). Lors du vieillissement, la peau subit plusieurs changements structurels amenant à une sècheresse cutanée (diminution de la production en sébum et de la quantité de glandes sudoripares), une réduction du contenu lipidique du *stratum corneum* et souvent une microcirculation moins étendue sous celui-ci (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Vitorino *et al.*, 2015). Ces changements affectent également les couches sous-jacentes avec un épiderme aminci, une jonction dermoépidermique altérée, une réduction du flux sanguin et des fibres de collagène au niveau du derme qui deviennent plus épaisses avec les fibres élastiques (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). Avec l'âge, les molécules lipophiles auront donc une meilleure perméation que les substances actives hydrophiles (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Vitorino *et al.*, 2015).

- L'hydratation de la peau au niveau du *stratum corneum* est sous la dépendance de facteurs externes (humidité, température, hydratants, occlusion) et internes (PIE, taux de kératinisation). En modifiant la physiologie de la peau par l'hydratation, la perméation de certaines substances actives peut être augmentée *via* le gonflement des cornéocytes et un réagencement au niveau des lipides et des protéines favorisant la formation de réservoir d'eau dans l'espace intercellulaire et entre les cornéocytes (Bouwstra *et al.*, 2003). Une occlusion de la peau peut ainsi contribuer à augmenter la solubilité de la substance active dans le *stratum corneum* augmentant ainsi le K_m *stratum corneum* / véhicule. Cette occlusion peut être réalisée par le recouvrement de la peau directement (gants, vêtements, timbres transdermiques, pansements) ou indirectement par des films ou des substances imperméables (ex : véhicules topiques contenant des graisses et / ou des huiles à longue chaîne hydrocarbonée (vaseline, paraffine)). De plus, cet effet permettrait d'augmenter la température corporelle et par conséquent la résorption de la molécule par le réseau sanguin du derme (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017) (voir section 1.1.1.1.5). Bien qu'il n'y ait aucune relation claire entre la lipophilie et la perméation dues à l'occlusion, il semblerait dernièrement que des études montrent un avantage préférentiel de l'occlusion pour l'absorption percutanée de substances actives très lipophiles (Hafeez and Maibach, 2013).

- L'altération de la fonction barrière de la peau par des pathologies cutanées de types acné vulgaire, dermatite atopique (eczéma), ichtyose, psoriasis peuvent aussi avoir une influence sur la perméation par divers mécanismes comme une anomalie de composition de lipides, de protéines, de prolifération des kératinocytes ou encore de desquamation (Pellerin *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 1995). Ces pathologies entraînent donc une exposition plus importante à la substance thérapeutique (Marieb *et al.*, 2014; N'Da, 2014; Vitorino *et al.*, 2015). Cette exposition se retrouve par ailleurs amplifiée par une sécheresse importante et des lésions cutanées présentes pour la plupart de ces pathologies suivant une PIE augmentée (Escobar-Chávez, 2010; Pellerin *et al.*, 2013; Yamamoto *et al.*, 1995).

En tenant en compte ces facteurs, de nouvelles stratégies ont été employées pour améliorer l'absorption de médicaments sur la peau. Selon le classement établi par Ramadan *et al.*, il existe trois générations de technologies permettant d'augmenter la délivrance transdermique de médicament par l'emploi de différentes techniques reposant sur la diffusion passive ou active (Ramadan *et al.*, 2021).

1.1.2.3.1. La première génération de systèmes transdermiques

Cette première génération regroupe des formulations topiques classiques (vaporisateur, gel, crème, onguent, timbre transdermique) sans l'intervention de plateformes très élaborées (Prausnitz and Langer, 2008). Les timbres transdermiques peuvent être soit de type réservoir (liquide, à base de gel ou état solide) ou matriciel (polymère semi-solide ou solide). Par ailleurs, on y retrouve la plupart des timbres transdermiques à ce jour commercialisés et utilisés en clinique (Tableau 1.1). Dans l'ère transdermique, une variante à cette première génération se présente sous une autre forme posologique impliquant un vaporisateur liquide dosé (exemple Evamist[®] pour l'estradiol) ou un gel (exemple Androgel[®] pour la testostérone) pour garantir un effet réservoir directement au niveau du *stratum corneum* et une utilisation efficace des médicaments (Paudel *et al.*, 2010).

Cependant, ces technologies reposent sur une méthode de diffusion passive qui est fortement limitée par les propriétés physico-chimiques de la substance active qui doit être efficace à faible dose (Ramadan *et al.*, 2021). De nouvelles approches ont donc été développées pour améliorer la délivrance d'une gamme plus large de médicaments qui agissent au niveau : (i) des

interactions substance active / véhicule, (ii) de la solubilité de la substance active par l'utilisation de vésicules ou particules, (iii) du *stratum corneum* en modifiant son imperméabilité ou en le contournant et (iv) de la diffusion passive en la remplaçant par des systèmes de diffusion active utilisant des forces physiques.

1.1.2.3.2. La deuxième génération de systèmes transdermiques

La deuxième génération de système transdermique a été une première phase visant à améliorer la perméabilité de la peau au niveau de la couche cornée en utilisant des méthodes basées sur des transporteurs vésiculaires, des promoteurs chimiques d'absorption ou encore des techniques de diffusion active (ionophorèse, ultrasons non cavitationnels). Cependant, ces nouveaux systèmes ont fait progresser majoritairement l'administration de petites molécules sans toutefois avoir un impact sur l'administration de macromolécules (Prausnitz and Langer, 2008).

1.1.2.3.2.1. L'interaction médicament-véhicule

Une première stratégie pour améliorer l'absorption cutanée est d'agir au niveau de l'interaction médicament-véhicule. Différentes solutions ont été proposées *via* l'utilisation de promédicament (liaison du médicament à un fragment inactif comme des chaînes d'alkyles ou d'éthylène glycol) (N'Da, 2014) et l'appariement d'ions (médicament ionisé et associé à une espèce ionique opposée) (Suresh and Paul, 2011) pour augmenter l'hydrophobicité et la neutralité de la forme active, respectivement. Pour les promédicaments, il convient de noter que suite à leur biotransformation (facteur limitant l'absorption transdermique), il peut y avoir une production de métabolites toxiques (Pyo and Maibach, 2019). D'autres méthodes utilisent plutôt des systèmes eutectiques ou le potentiel chimique, qui sont basés sur la thermodynamique des systèmes. Selon ces techniques, le mélange médicament-véhicule doit posséder des propriétés chimiques idéales qui peuvent être obtenues en évaluant plusieurs combinaisons avec les composants du mélange. Parmi les différents paramètres testés, la force motrice du perméant derrière les propriétés de solubilité, de partage entre les phases et de diffusion de celui-ci peut être modulé pour approcher des propriétés idéales (potentiel chimique) (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). D'autre part, l'atteinte d'une forte activité thermodynamique entre le perméant et le véhicule en atteignant un bas point de fusion est un point critique essentiel pour améliorer la perméation cutanée, tout en perturbant la structure du *stratum corneum* (systèmes eutectiques) (Karande and Mitragotri, 2009).

Le cas de la sursaturation

Un état transitoire, métastable et saturé peut être créé pour augmenter le flux d'absorption de substance active à travers la peau. Cet état utilise l'activité thermodynamique du perméant dans son véhicule qui est augmentée au-delà de son unité (augmentation du potentiel chimique). C'est-à-dire avec une concentration en substance active supérieure à sa solubilité à l'équilibre (Schittny *et al.*, 2020). Il existe deux méthodes basées sur : un mélange de co-solvants avec l'ajout rapide d'un contre-solvant (ce qui peut être l'absorption d'eau de la PIE en eau suite à l'application de la formulation) et l'évaporation rapide d'un ou plusieurs solvants volatils après application (la substance active doit être soluble dans le solvant) (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). L'effet de la sursaturation a été implémenté avec succès pour un système d'administration de médicament sursaturé à base d'un vecteur de délivrance *self-emulsifying drug delivery system*. De plus, l'ajout d'hydroxypropyl méthylcellulose a permis d'augmenter la stabilité du système à pH acide (pH 1.2) (Rosso *et al.*, 2021). La stabilité de l'état cristallin de la substance active dépend donc de la présence additionnelle de ces polymères, mais aussi de la stabilité de la substance active en elle-même dans cet état saturé, ce qui est souvent le cas pour des médicaments complexes (Schittny *et al.*, 2020).

Malgré ces avantages, ces techniques sont toujours limitées par la diffusion passive où le *stratum corneum* reste le premier défi à la délivrance transdermique de médicaments.

1.1.2.3.2.2. Les vecteurs d'administration

Une deuxième stratégie pour améliorer le transport de substance active à travers la peau est apportée par l'utilisation de systèmes tels que les nanoparticules, les liposomes et leurs analogues. Ces systèmes nanoparticulaires comprennent pour la délivrance transdermique de médicaments, en majorité, les vésicules à base de lipides (les liposomes et leurs dérivés, éthosomes et transféosomes), à base de tensioactifs (les niosomes et les micro- / nano-émulsions), les phytosomes, les dendrimères, les nanoparticules (nanoparticules lipidiques solides (SLN, *solid lipid nanoparticles*), nanostructurées (NLC, *nanostuctured lipid carriers*) et gélifiées (GLN, *gelled lipid nanoparticles*)) ainsi que celles polymériques (nanosphères et nanocapsules polymériques). Leurs caractéristiques sont détaillées dans la Figure 1.7. De par leurs compositions, ils permettent de protéger la substance active au cœur de la formulation et également d'augmenter la

solubilisation du médicament. De plus, ils peuvent moduler et / ou améliorer le partage du médicament dans la peau en augmentant ainsi la perméabilité cutanée *via* divers mécanismes.

Les liposomes sont capables d'adhérer à la surface de la peau et de déstabiliser, fusionner ou se mélanger avec la bicouche lipidique du *stratum corneum* grâce à leurs phospholipides. Ce phénomène cause un relâchement de la structure organisée du *stratum corneum* pour y libérer la molécule immobilisée hydrophile ou hydrophobe) (Haque and Talukder, 2018; Ramadon *et al.*, 2021). Cependant, la taille moléculaire ainsi que la diminution de la fluidité du système diminuent la perméation dans la peau favorisant ainsi une action locale au niveau de la couche cornée et l'effet réservoir (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020; Prausnitz and Langer, 2008; Vitorino *et al.*, 2015). Cette diminution de l'aspect déformable des vecteurs peut être entraînée par l'ajout de cholestérol par exemple dans les vésicules ou encore par la modification de la composition en phospholipides leur conférant un état gel (Kirjavainen *et al.*, 1999; Peralta *et al.*, 2018; Svarc and Hermida, 2020). Les transférosomes sont par ailleurs des dérivés des liposomes qui offrent une structure plus flexible et déformable, ce qui augmente leur perméation dans des couches plus en profondeur (Peralta *et al.*, 2018; Schneider *et al.*, 2009; Vitorino *et al.*, 2015). Une attention particulière à prendre en compte avec ce type de système déformable est d'éviter l'occlusion qui élimine vraisemblablement le gradient d'eau transcutanée qui sert de force conductrice au passage de ces vésicules ultra-flexibles à travers la peau (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). Bien qu'il existe divers avantages à l'utilisation de ces vecteurs, certaines limitations rendent difficile leur transition en clinique. Parmi celles-ci, on retrouve l'instabilité du système (variation de la taille des vecteurs, charge de surface) altérant la stabilité du médicament incorporé, leur production à l'échelle industrielle et la faible encapsulation de substances actives hydrophiles pour les liposomes conventionnels (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). Les éthosomes sont, quant à eux, composés en plus des phospholipides, d'éthanol, qui permet de conférer à la formulation un effet promoteur d'absorption et une certaine déformabilité pour traverser aisément par la région intercellulaire du *stratum corneum* (Niu *et al.*, 2019; Svarc and Hermida, 2020).

Les micro- / nano-émulsions sont thermodynamiquement stables et jouissent des propriétés des tensioactifs (fluidisation, altération et dissolution des lipides du *stratum corneum*) (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020; Mundstock *et al.*, 2014; Vitorino *et al.*, 2015). Selon

leur taille, elles peuvent atteindre la circulation systémique (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). En outre, plus leur taille est faible, plus les vecteurs sont capables de rejoindre la circulation systémique (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). Ceci favorise d'autant plus le phénomène basé sur l'effet d'augmentation de surface du matériel par unité de volume, ce qui donne à la substance active plus de réactivité chimique (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020).

Les nanoparticules SLN et NLC sont des systèmes qui permettent de former un film homogène, uniforme et occlusif, grâce à leur propriété d'adhésion au niveau du *stratum corneum* (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020; Svarc and Hermida, 2020). Ils interagissent donc avec les lipides cutanés en modifiant la fonction barrière du *stratum corneum* plus ou moins en profondeur dépendamment de leur viscosité (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). Ces propriétés occlusives sont d'autant plus élevées que la formulation contient de lipides, ce qui permet le classement du système le plus occlusif au moins occlusif suivant : SLN > NLC > nanoémulsions (Fang *et al.*, 2014). Malgré leurs avantages, les systèmes NLC sont plus stables au long terme en gardant plus longtemps la substance active encapsulée et ont une meilleure efficacité d'encapsulation que les SLN qui ont un réseau cristallin plus ordonné de lipides (Vitorino *et al.*, 2015). Afin d'améliorer la stabilité des NLC, les dispersions colloïdales de GLN peuvent aussi être utilisées. Ils permettent ainsi de stabiliser la substance active piégée dans un cœur gélifiée sans affecter ses propriétés (Carranca *et al.*, 2017). De plus, ces systèmes contiennent également des agents tensioactifs qui peuvent fluidifier ou déstructurer transitoirement le *stratum corneum* (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). Un autre facteur important de ce type de nanoparticules est leur taille qui détermine leur répartition. Ainsi, les nanoparticules plus petites peuvent atteindre la circulation systémique, celles ayant une taille intermédiaire peuvent se déposer au niveau des follicules pileux, tandis que les nanoparticules de taille plus importante restent en surface (Fang *et al.*, 2014; Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020).

Les nanoparticules polymériques sont des nanoparticules qui offrent une certaine stabilité colloïdale en plus d'utiliser des polymères biocompatibles et / ou biodégradables naturels ou synthétiques (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020; Svarc and Hermida, 2020; Vitorino *et al.*, 2015). Ces vecteurs ont également l'avantage d'être appropriés potentiellement pour

l'administration de macromolécules (peptides, protéines ou oligonucléotides comme l'ADN ou les petits acides ribonucléiques (ARN) messagers interférents). Cependant, les polymères synthétiques sont plus favorables pour l'administration de médicaments en raison de leur uniformité d'un lot à l'autre et de leur degré de pureté plus élevé. Parmi les mécanismes de perméation rapportés pour les particules polymériques, les dendrimères permettent à la fois d'interagir avec les lipides cutanés et de dénaturer les protéines de kératine pour permettre un meilleur passage par la voie transcellulaire (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). Un deuxième type de voie de passage empruntée par les nanoparticules est la voie folliculaire. Ces accumulations folliculaires ont été retrouvées dans le cas de nanoparticules de polystyrène non biodégradable (Fang *et al.*, 2014; Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). En plus de la taille des particules, la charge superficielle des polymères a aussi son importance pour l'interaction des vecteurs avec les lipides / protéines du *stratum corneum* mais aussi potentiellement au niveau de l'irritation cutanée et d'autres effets indésirables (Fang *et al.*, 2014; Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). La plupart des applications retrouvées de ces nanoparticules polymériques demeurent toutefois en surface de la peau pour une action locale, comme pour les écrans solaires augmentant le temps de résidence de molécules hautement lipophiles (composés organiques) (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020). En outre, une stratégie consistant à incorporer des nanosphères dans des gels hydrophiles a permis d'améliorer leurs temps de contact et donc de favoriser une meilleure perméation cutanée par rapport à des formulations de dispersion aqueuses (Batheja *et al.*, 2011). De plus, en modifiant la composition en polymères, ce système permettrait de contrôler la libération de la substance active et ainsi de minimiser les effets indésirables locaux et systémiques (Ghasemiyeh and Mohammadi-Samani, 2020).

1.1.2.3.2.3. La modification de la barrière cutanée

La modification des propriétés du *stratum corneum* par hydratation de la peau et l'utilisation de promoteurs d'absorption sont à la base de cette approche visant à augmenter la perméabilité de la peau aux substances actives.

La technique d'hydratation est un processus permettant de s'affranchir de l'utilisation de substances chimiques potentiellement toxiques / irritantes. Plusieurs méthodes ont été utilisées à ce jour : timbres, pansements occlusifs, ajouts d'excipients lipidiques pour prévenir de la perte en

eau et par l'utilisation d'humectants et / ou hydratants (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Haque and Talukder, 2018; Ramadan *et al.*, 2021). Parmi les agents de liaison à l'eau, nous retrouvons l'urée et la glycérine qui imite le rôle des facteurs naturels d'hydratation (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017) (Figure 1.7).

Les promoteurs d'absorption chimiques (Figure 1.7) agissent d'une part en perturbant la bicouche lipidique du *stratum corneum* (fluidisation, extraction de lipides intercellulaires) et d'autre part, par interaction avec les protéines (ex : dénaturation / modification / conformation) augmentant l'hydratation de la kératine et le gonflement des cornéocytes. C'est le cas du diméthylsulfoxyde (DMSO), du 1-dodecylazacycloheptan-2-one (Azone[®]), des membres du groupe pyrrolidone (ex : N-méthyl-2-pyrrolidone (NMP), 2-pyrrolidone), des acides gras (ex : acide oléique, acide laurique), de l'urée et des agents tensioactifs (notamment le polysorbate (Tween) et le laurylsulfate de sodium) (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Haque and Talukder, 2018; Karande and Mitragotri, 2009; Ramadan *et al.*, 2021). Les promoteurs d'absorption peuvent également modifier le coefficient de partage du médicament en modifiant les propriétés de solvant du *stratum corneum*. C'est le mécanisme privilégié des alcools (propylène glycol, éthanol, alcool isopropylique) et des terpènes (monoterpènes, sesquiterpènes) (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Haque and Talukder, 2018; Karande and Mitragotri, 2009; Ramadan *et al.*, 2021; Vitorino *et al.*, 2015). Toutefois ces « agresseurs chimiques » peuvent provoquer des érythèmes qui vont accroître l'absorption systémique par augmentation du flux sanguin au niveau du derme papillaire (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017; Karande and Mitragotri, 2009). Ils doivent donc être inertes, non toxiques, non allergiques, non irritants et leurs effets doivent être réversibles (Vitorino *et al.*, 2015). De plus, leur concentration efficace est dépendante du médicament, ce qui a abouti à des approches combinées de plusieurs activateurs chimiques en association (troisième génération) (Karande and Mitragotri, 2009; Prausnitz and Langer, 2008). Mitragotri *et al.* ont par ailleurs établi des prédictions de structures chimiques pour les promoteurs d'absorption ciblant leur action sur le *stratum corneum* pour diminuer l'irritation cutanée (en cas d'absence de changement de la bande I amide de la protéine du *stratum corneum*) et augmenter l'absorption percutanée (par modification de l'étirement symétrique du CH₂ lipidique) (Karande *et al.*, 2005).

Cette deuxième génération a été aussi le début de l'avènement des technologies qui utilisent l'application de forces physiques externes pour administrer les substances actives par diffusion passive. L'iontophorèse utilise l'énergie électrique sous forme de petits courants capables d'augmenter l'absorption cutanée de médicaments ionisables, principalement sous forme d'« ions médicamenteux » (poids moléculaire < 10000 Da) (électrophorèse) et plus rarement faiblement chargés ou neutres (électroosmose) (Ramadon *et al.*, 2021). Ce système est limité par l'irritation cutanée et les douleurs induites par le courant, ce qui rend difficile la prédiction de la biodisponibilité complexe des médicaments (modulée dans le temps / contrôle du dosage du médicament), en plus de son coût (Prausnitz and Langer, 2008; Ramadon *et al.*, 2021).

1.1.2.3.3. Troisième génération de systèmes transdermiques

Les technologies de diffusion active de troisième génération comprennent l'électroporation, la sonophorèse et l'ablation thermique. Elles entraînent un impact important au niveau du *stratum corneum*, comme la création de micro-canaux / cavités (électroporation, sonophorèse) ou la suppression du *stratum corneum* (technique de microscission).

La sonophorèse est une technique basée sur l'utilisation des ultrasons de basse fréquence pour désorganiser la disposition des bicouches lipidiques du *stratum corneum*. En plus des effets thermiques induits par les ultrasons, l'effet de cavitation est également connu pour créer des cavités et des microbulles de gaz qui déclenchent des ondes de choc et des microjets liquides, augmentant ainsi de façon combinée la perméabilité de médicaments. De nombreuses classes de molécules hydrophiles et hydrophobes, de petites et grandes tailles (macromolécules, protéines) ont pu être délivrées grâce à ce système (Alkilani *et al.*, 2015; Dragicevic and Maibach, 2017; Ramadon *et al.*, 2021; Vitorino *et al.*, 2015). Néanmoins, la sonophorèse reste une technique coûteuse et qui nécessite la présence d'un personnel qualifié (Ramadon *et al.*, 2021).

L'électroporation repose sur l'application d'impulsions électriques de haute tension (10 à 1000V) sur une courte durée (< millisecondes) pour perméabiliser le *stratum corneum* avec des pores aqueux dans la bicouche lipidique du *stratum corneum* (Dragicevic and Maibach, 2017; Ramadon *et al.*, 2021; Vitorino *et al.*, 2015). Cette méthode a donc le potentiel d'augmenter

l'administration transdermique de macromolécules (peptides, vaccins, ADN) (Dragicevic and Maibach, 2017; Prausnitz and Langer, 2008).

Cette 3e génération a également permis l'investigation de technologies capables de contourner la barrière quasi-imperméable du *stratum corneum* grâce à la création de micro-perforations (microaiguilles, microscission, micro-ablation) ou l'élimination des couches cellulaires successives du *stratum corneum* (stripping de la peau, microdermabrasion, papier de verre).

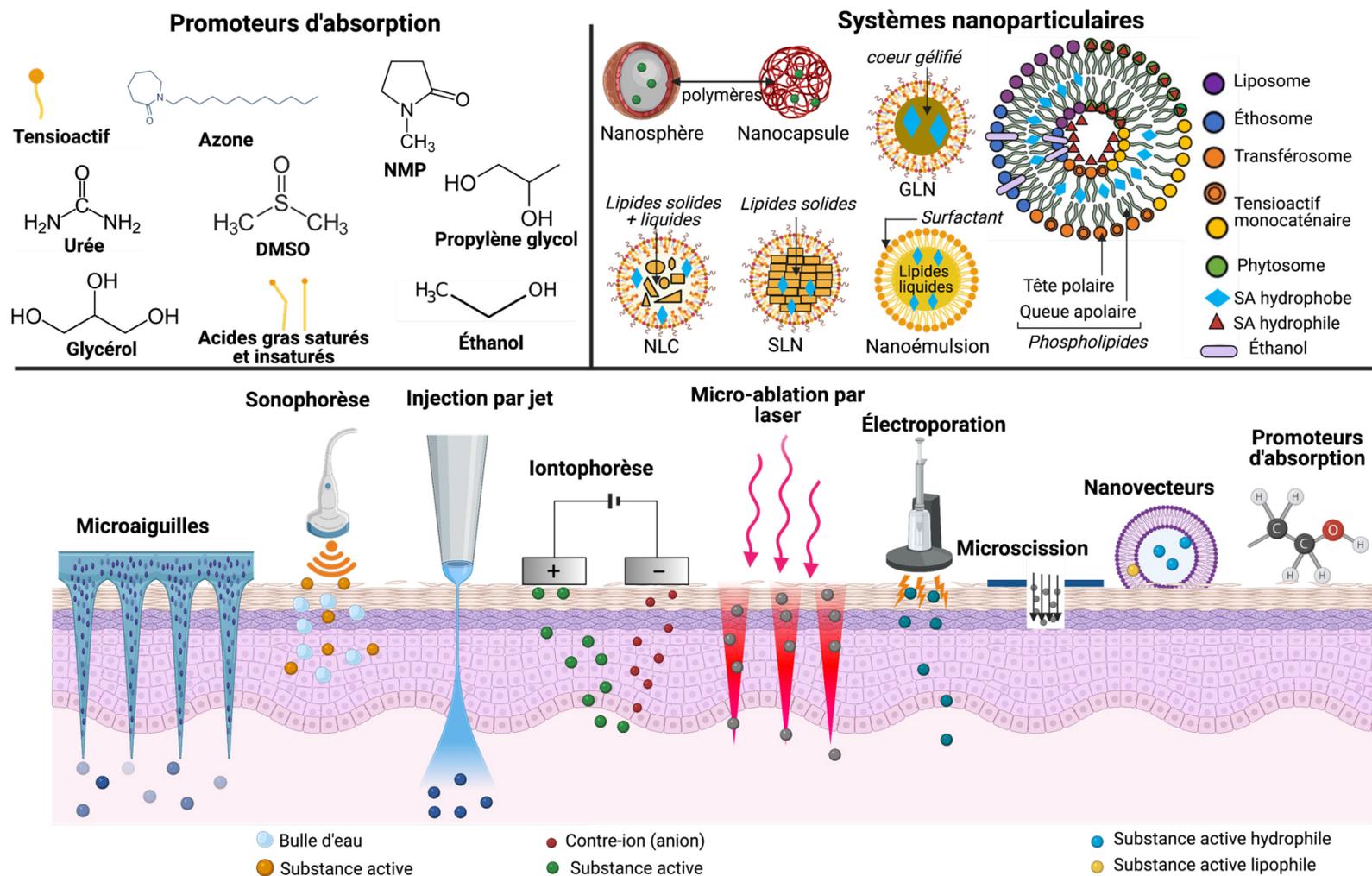


Figure 1.7 Stratégie de 2e et 3e générations pour améliorer l'administration transdermique de médicament. Azone, 1-dodecylazacycloheptan-2-one ; DMSO, diméthylsulfoxyde ; NMP, N-méthyl-2-pyrrolidone ; NLC, nanoparticule lipidique nanostructurée ; SLN, nanoparticule lipidique solide ; GLN, nanoparticule lipidique gélifiée. Les nanovésicules de liposome, éthosome, transférosome et phytosomes sont adaptées de (Ramadon *et al.*, 2021). Cette figure a été créée avec BioRender.com.

La technique de microdermabrasion est utilisée couramment en cosmétique comme une méthode non invasive s'appuyant sur l'utilisation de microparticules (typiquement d'oxyde d'aluminium, 200 μm) cristallines, tranchantes, aux multiples facettes et pressurisées pour bombarder la surface de la peau et l'abraser en formant des microcoupes. Cette technique est plus rapide et reproductible que le stripping de la peau (par bandes adhésives) et a montré notamment augmenter la perméabilité des molécules hydrophiles (poids moléculaire de 130 Da à 6 KDa) (Dragicevic and Maibach, 2017). Cependant, l'effet de l'administration transdermique du médicament est limité en temps par la rapide cicatrisation de la peau entre 1-2 jours (sans occlusion) (Andrews *et al.*, 2011). La microscission s'apparente à la microdermabrasion avec l'utilisation de particules d'oxydes d'aluminium à vitesse accélérée sous l'action d'un gaz inerte (ex : azote) pour créer des microconduits dans la peau (Dragicevic and Maibach, 2017; Herndon *et al.*, 2004; Ramadan *et al.*, 2021). Bien que les particules d'oxyde d'aluminium soient inertes, la toxicité induite suite à leur accumulation sous forme de dépôts dans la peau est encore inconnue à long terme (Dragicevic and Maibach, 2017; Ramadan *et al.*, 2021).

Les méthodes de micro-ablation de la peau ont aussi été développées en utilisant trois principales techniques d'énergie : un courant électrique dans une gamme de radiofréquence (vibrations des ions), un laser (excitation des molécules d'eau), ou une énergie thermique (filament métallique, jet de vapeur d'eau) (Alkilani *et al.*, 2015; Dragicevic and Maibach, 2017). Ces techniques permettent l'échauffement transitoire et localisé du *stratum corneum* pendant une durée allant des microsecondes aux millisecondes formant ainsi des micropores (Prausnitz and Langer, 2008). Elles sont aussi souvent associées à des systèmes de délivrance tels que les nanoparticules pour augmenter l'administration d'ADN ou encore aux timbres transdermiques contenant des peptides ou des protéines (Dragicevic and Maibach, 2017).

Dernièrement, les timbres de microaiguilles, constitués d'aiguilles de l'ordre du micron avec des hauteurs comprises entre 25 et 2000 μm , permettent de perméabiliser la couche cornée grâce à la perforation des microaiguilles dans la peau (Ramadan *et al.*, 2021). Ce système sans douleur (comparé aux aiguilles hypodermiques), auto-administrable et peu invasif, possède divers avantages : (i) il augmente la perméabilité de la peau en créant des micropores, (ii) il peut transporter des substances actives adsorbées à la surface ou encapsulées dans des nanoparticules,

(iii) les microaiguilles sont capables, malgré leur ciblage du *stratum corneum*, de transpercer également l'épiderme et le derme superficiel sans toutefois atteindre les terminaisons nerveuses et vaisseaux sanguins du derme (Prausnitz and Langer, 2008; Ramadan *et al.*, 2021). Il existe différents types de système microaiguilles qui utilisent divers mécanismes de libération de la substance active selon leurs structures / composition : solides, creuses, se dissolvant dans la peau et recouverte d'une substance active (Alkilani *et al.*, 2015; Dragicevic and Maibach, 2017; Prausnitz and Langer, 2008; Ramadan *et al.*, 2021; Vitorino *et al.*, 2015). Une large catégorie de molécules, macromolécules et nanoparticules peuvent être administrées par cette technologie pour atteindre une libération rapide ou contrôlée (Alkilani *et al.*, 2015; Dragicevic and Maibach, 2017; Prausnitz and Langer, 2008; Ramadan *et al.*, 2021). Suite à l'application des microaiguilles, la cicatrisation peut aller de 2 à 40 heures (sous occlusion) (Dragicevic and Maibach, 2017). Dernièrement, l'administration du vaccin antigrippal *influenza* grâce à un dispositif composé d'une microaiguille creuse est en cours d'homologation en Europe suite aux essais cliniques (Soluvia[®]) (Prausnitz and Langer, 2008). Les différents types de timbre microaiguilles pour l'administration de médicament, ainsi que leurs modèles d'études *in vitro* / *in vivo* et leurs mécanismes augmentant la pénétration de substances actives seront abordés dans la section 1.2.1.2.

Les divers types de systèmes transdermiques commercialisés à ce jour sont inclus dans le tableau 1.1.

1.1.2.4. Les facteurs d'exposition à la substance active modifiant l'absorption percutanée

Bien que le type de vecteur choisi, les propriétés de la substance active et la physiologie de la peau définissent en grande partie le mécanisme d'absorption transcutanée, les interactions entre les substances actives et la peau ne dépendent pas seulement de ces aspects. En effet, l'absorption est proportionnelle à plusieurs facteurs : la surface, la fréquence et l'épaisseur d'application au niveau de la couche cornée.

Certaines formulations sont donc limitées par la surface d'application, comme par exemple pour les timbres transdermiques contrairement aux formulations semi-solides ou liquides. Ces dernières sont néanmoins limitées par une faible substantivité qui nécessite plusieurs applications pour atteindre l'efficacité thérapeutique contrairement au timbre où la fréquence d'application est

réduite (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017). Il est alors légitime de penser qu'une dose plus élevée, une durée plus longue de traitement, une surface d'application plus importante et une fréquence d'application plus élevée augmenteraient la quantité de médicament absorbée, suivant la relation de Fick. Cependant, selon des données expérimentales, en augmentant la fréquence d'application, il n'y a eu aucune différence significative pour une même dose de corticostéroïdes ($13.3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) appliquée une fois ou 3 fois par jour (total : $40 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) (Wester *et al.*, 1977). Bien que les études en dose multiples sont à ce jour insuffisantes (Law *et al.*, 2020), ce phénomène peut être expliqué par une saturation de l'effet réservoir en surface de la substance active qui diminue l'absorption pour les applications suivantes lors d'administrations répétées au même endroit (Teichmann *et al.*, 2005). De plus, une exposition répétée à une substance active peut entraîner une toxicité chimique (ex : corticostéroïdes qui induisent de l'atrophie) car l'effet réservoir quant à lui est toujours présent et capable de diffuser la substance active dans les couches profondes pendant de longue période de temps (Law *et al.*, 2020). Cet effet est par ailleurs augmenté pour les substances actives possédant une forte lipophilie et affinité envers les protéines (Cross *et al.*, 2003). Pour traiter des pathologies cutanées chroniques (ex : dermatite atopique, psoriasis), il est donc nécessaire d'avoir des systèmes offrant une forte substantivité, un étalement pratique et une efficacité thérapeutique suffisante avec de faibles fréquences d'application. En outre, la formation d'émulsions filmogènes constituées d'une émulsion lipophile dans hydrophile (L / H) plastifiée dans une dispersion d'Eudragit® ont montré avoir un net avantage face aux formulations semi-solides pour maintenir une concentration efficace dans la peau sous 12 heures. De plus, leurs propriétés adhésives et élastiques étaient suffisantes pour assurer leur maintien à la surface de la peau (Dragicevic-Curic and Maibach, 2017).

Tableau 1.1 Les différents types de systèmes transdermiques commercialisés. Liste adaptée de (Pastore *et al.*, 2015; Paudel *et al.*, 2010; Prausnitz and Langer, 2008; Ramadon *et al.*, 2021)

Génération	Type de système	Diffusion	Substance active	Indication thérapeutique	Nom du produit	Compagnie	Année d'approbation
1	Timbre TDS réservoir / membrane	Passive	Scopolamine	Mal des transports	Transderm-Scop	Novartis Consumer Health	1979
1	1. Timbre TDS réservoir / membrane 2. Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Nitroglycerine	Angine de poitrine	1. Transderm-Nitro 2. Nitro-Dur	1. Novartis 2. Merck	1. 1981 2. 1995
1	Timbre TDS réservoir / membrane	Passive	Clonidine	Hypertension	Catapres-TTS	Boehringer Ingelheim	1984
1	1. Timbre TDS réservoir / membrane 2. Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Estradiol	Symptômes de la ménopause (THS)	1. Estraderm 2. Climara	1. Novartis 2. Bayer Healthcare	1. 1986 2. 1994
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Fentanyl	Douleur chronique	Duragesic	Janssen Pharmaceutica	1990
1	1. Timbre TDS matriciel 2. Timbre TDS réservoir / membrane	Passive	Nicotine	TRN	1. Habitrol 2. Nicoderm	1. Novartis Consumer Health 2. GlaxoSmithKline	1. 1990 2. 1991
1	1. Timbre TDS matriciel / adhésif actif 2. Timbre TDS réservoir / membrane	Passive	Testostérone	Hypogonadisme	1. Testoderm (plus disponible) 2. Androderm	1. Alza 2. Watson Laboratories	1993 1995
2	Iontophorèse	Active	Lidocaïne / épinéphrine	Analgésie cutanée locale	Iontocaine	Iomed	1995
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Estradiol / noréthindrone	Symptômes de la ménopause (THS)	Combitimbre	Novartis	1998
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Lidocaïne	Douleur de névralgie post-herpétique	Lidoderm	Endo Pharmaceuticals	1999
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Ethinyl estradiol / norelgestromin	Contraception	Ortho Evra	Ortho-McNeil Pharmaceutical	2001
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Estradiol / levonorgestrel	Symptômes de la ménopause (THS)	Climara Pro	Bayer Healthcare Pharmaceuticals	2003
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Oxybutynin	Vessie hyperactive	Oxytrol	Watson Pharma	2003
2	Émulsion micellaire	Passive	Estradiol	Traitement des symptômes vasomoteurs liés à la ménopause	Estrasorb	Novavax	2003
3	Sonophorèse	Active	Lidocaïne	Anesthésie cutanée locale	SonoPrep (plus disponible)	Echo Therapeutics	2004

2	Iontophorèse	Active	Lidocaïne / épinéphrine	Analgésie cutanée	Lidosite	Vyteris	2004
2	Timbre TDS -Mélange eutectique mélange - technologie CHADD®	Passive	lidocaïne / tétracaïne	Anesthésie cutanée locale	Synera	Endo Pharmaceuticals (Chadds Ford, PA)	2005
2	Iontophorèse	Active	Fentanyl hydrochloride	Douleurs postopératoires aiguë modérées à sévères	Ionsys (E-trans)	Alza	2006
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Methylphenidate	ADHD	Daytrana	Shire	2006
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Selegiline	Trouble dépressif majeur	Emsam	Bristol-Myers Squibb	2006
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Rotigotine	Maladie de Parkinson	Neupro	Schwarz Pharma	2007
1	Timbre TDS matriciel	Passive	Rivastigmine	Démences	Exelon	Novartis	2007
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Diclofénac / Épolamine	Traitement topique douleur aiguë	Flector	Institut Biochimique SA	2007
2	Solution cutanée / spray transdermique à séchage rapide MTDS	Passive	Estradiol	Symptômes de la ménopause (THS)	Evamist	KV pharmaceuticals	2007
3	Powderject / particules de médicament à vitesse accélérée	Active	Lidocaïne hydrochloride monohydrate	Anesthésie locale	Zingo	Anesiva	2007
2	Gel de transféosome	Passive	Kétoprofène	Douleur liée aux contractions musculaires excentriques	Diractin	Idea AG, Alpharma	2007
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Menthol / méthylsalicylate	Muscles et douleurs articulaires	Salonpas	Hisamitsu Pharmaceuticals	2008
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Granisetron	Nausées et vomissements induits par la chimiothérapie	Sancuso	Strakam International	2008
1	Timbre TDS matriciel / adhésif actif	Passive	Buprénorphine	Douleurs chroniques	Butrans	Purdue Pharma	2010
2	Solution cutanée / pompe transdermique à séchage rapide MTDS	Passive	Testostérone	Hypogonadisme	Axiron	Lilly et Acrux	2010
2	Iontophorèse	Active	Sumatriptan	Migraine	Zecuity	Nupathe Inc.	2013
3	Intraject / jet liquide pressurisé	Active	Sumatriptan	Migraine	Sumavel Dose Pro	Zogenix	2013

TDS : transdermal delivery system, THS : traitement hormonal substitutif, TRN : thérapie de remplacement de la nicotine, CHADD : controlled-heat aided drug delivery (thermal ablation), ADHD : attention deficit hyperactivity disorder, MTDS : metered dose therapeutic system. Cette liste comprend les systèmes d'administration transdermiques approuvés par la FDA où seul le premier système d'administration approuvé pour un médicament ou une combinaison de médicaments donnés est indiqué. Les crèmes, pommades, gels et vaporisateurs topiques de première génération ne sont pas inclus. Les systèmes implantables seront abordés dans la section 1.2.2.2

1.2. Les technologies pharmaceutiques applicables par voie transcutanée

1.2.1. Les principaux systèmes d'administration de médicaments par voies transdermique et parentérale

1.2.1.1. Les systèmes d'implant se formant *in situ* pour la libération prolongée de médicaments

Les systèmes d'administration prolongée de médicaments par voie parentérale ont attiré l'attention depuis ces dernières décennies en raison de plusieurs avantages par rapport à d'autres systèmes à libération prolongée de médicaments administrés par voie orale. En effet, bien que la voie orale soit non invasive, de nombreux systèmes sont toujours incapables de libérer la substance active sous plusieurs semaines ou mois à cause de certaines limitations. Ces limitations comprennent l'effet de premier passage hépatique élevé, la dégradation au niveau du tractus gastro-intestinal et la faible perméabilité intestinale (Alkilani *et al.*, 2015; Kanwar and Sinha, 2019; Wright and Burgess, 2012). Les systèmes d'administration prolongée de médicaments ont donc offert une avenue alternative pour : (i) réduire la fréquence d'administration grâce à une libération contrôlée jusqu'à plusieurs mois, (ii) améliorer l'efficacité des médicaments tout en réduisant les effets secondaires de par la diminution de la fluctuation de la concentration plasmatique en substance active entre pic et vallée, (iii) obtenir une observance thérapeutique élevée chez les patients et (iv) modifier la biodisponibilité du médicament (rétention du médicament au niveau local élevé) (Kanwar and Sinha, 2019; Wright and Burgess, 2012).

Parmi les différentes méthodes physiques pour obtenir une libération prolongée de médicaments, les systèmes d'implant se formant *in situ* sont une approche prometteuse par rapport aux autres systèmes d'administration prolongée pour la voie parentérale, tels que les microsphères / microparticules, les suspensions parentérales et les implants chirurgicaux. Les implants se formant *in situ* sont des solutions / suspensions de polymères liquides de faible viscosité à température ambiante générant un dépôt gélifié (semi-solide) au site d'injection. Les gels *in situ* ont été étudiés en sciences pharmaceutiques pour la libération contrôlée de médicaments par diverses voies : orale (troubles digestifs, bronchopneumopathie chronique obstructive), parentérale (cancer de la

prostate, parodontite, délivrance de gènes et d'hormones de croissance), oculaire (traitement du glaucome), cutanée (cicatrisation des plaies, génie tissulaire) et nasal (inflammation, démangeaisons) (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Madan *et al.*, 2009; Wright and Burgess, 2012). Outre leur application thérapeutique, les implants se formant *in situ* sont aussi utilisés pour la culture cellulaire tridimensionnelle ou comme véhicule pour la transplantation cellulaire (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Lee, 2018).

1.2.1.1.1. Les avantages des systèmes d'implant se formant *in situ*

Les principaux avantages de l'implant se formant *in situ* par comparaison à la préparation de microsphères / microparticules sont leur coût de production faible et leur procédure de fabrication simple en une seule étape qui est adaptée pour les molécules sensibles (ex : pH, température) (Kanwar and Sinha, 2019; Madan *et al.*, 2009). Ceci permet d'assurer l'uniformité et la reproductibilité du produit qui est donc facilement transposable à l'échelle industrielle. Ces systèmes présentent aussi des avantages au niveau de l'administration de la substance active, telles que leur stabilité accrue (absence généralement de reconstitution avant administration, peu d'excipients utilisés), l'encapsulation efficace de substances actives à la fois hydrophiles et hydrophobes (distribution uniforme, vaccins, peptides, protéines) et leur facilité d'administration. Ils sont par ailleurs moins douloureux que les implants préformés et possèdent une plus faible viscosité généralement à température ambiante que les suspensions et microsphères / microparticules (Kanwar and Sinha, 2019). En fonction du type de polymères utilisés et des mécanismes de formation, les propriétés physicochimiques des implants se formant *in situ* peuvent être modulées pour contrôler la libération de substance active (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Madan *et al.*, 2009).

1.2.1.1.2. La classification des systèmes d'implants se formant *in situ* basée sur le mécanisme de formation du dépôt

Les implants se formant *in situ* ont été classés en trois groupes principaux selon leurs mécanismes de formation, selon la classification de Kempe and Mäder (Kempe and Mäder, 2012) (Figure 1.8) : - les systèmes polymères réticulés *in situ*, -les organogels se solidifiant *in situ* et - les systèmes de séparation de phase *in situ*.

1.2.1.1.2.1. Les systèmes polymères réticulés *in situ*

Ces systèmes *in situ* peuvent être obtenus grâce à la formation de réseaux de polymères réticulés par polymérisation photo-initiée, la réticulation physique de monomères ou la réticulation chimique avec l'utilisation d'agents de réticulation.

La polymérisation photo-initiée

La photopolymérisation radicalaire est le procédé généralement utilisé lors des applications biomédicales utilisant la polymérisation induite par la lumière. Cette photopolymérisation radicalaire repose sur la conversion de photopolymère liquide (mélanges liquides de monomères et d'oligomères) en polymères solides en trois étapes principales : l'initiation, la propagation ou la croissance de la chaîne polymère et la terminaison. La photopolymérisation radicalaire est principalement utilisée pour les monomères avec divers groupes fonctionnels qui peuvent être polymérisés comme les acrylates et les méthacrylates (Tomal and Ortyl, 2020). La génération de radicaux à partir d'initiateurs photo-excités est réalisée par un clivage- α homolytique (type I) ou par réaction bimoléculaire d'abstraction d'un atome d'hydrogène (type II) sous lumière UV (majoritairement) ou visible (Chiulan *et al.*, 2021; Tomal and Ortyl, 2020). La lumière visible est utilisée pour la polymérisation radicalaire en association majoritaire avec les photo-initiateurs de type II (ex : éosine Y soluble dans l'eau). Une attention particulière est à apporter à l'inhibition de ce procédé par l'oxygène qui peut entraîner une extinction des états excités de l'initiateur (Tomal and Ortyl, 2020). Les nombreux avantages de cette technique (polymérisation rapide, absence de solvants, réaction à température physiologique) ont permis leur utilisation dans une vaste gamme d'applications médicales : au niveau dentaire, de l'ingénierie tissulaire (adhérence des films), de la bioimagerie, du diagnostic (génétique ou cellulaire), de l'administration de médicaments (ex : hormones, facteurs de croissance, anti-inflammatoires) et comme dispositif biomédical (orthopédique) (Baroli, 2006). Cependant la faible profondeur de pénétration des sources lumineuses limite à ce jour leur application clinique principalement aux applications dentaires (Chiulan *et al.*, 2021; Tomal and Ortyl, 2020).

La réticulation physique de monomères

La réticulation physique des polymères est formée par des interactions inter- et intramoléculaires de faibles énergies (les interactions électrostatiques : les liaisons ioniques et hydrogène, les interactions hydrophobes, l'empilement π - π et les forces de van der Waals) formant un réseau interconnecté par des liaisons non covalentes réversibles (faible force mécanique). Par ailleurs, les complexes polyélectrolytes (*polyelectrolyte complexes*, PEC) entre l'alginate et les cations bivalents (calcium) ont permis l'administration de médicaments ophtalmiques grâce à la concentration en calcium physiologique de l'œil suffisante pour induire la gélification (Kempe and Mäder, 2012; Madan *et al.*, 2009). Bien que certains hydrogels peuvent s'autoréticuler sans agent de réticulation ou catalyseur, divers stimuli externes affectent souvent la gélification (température, pH, lumière, enzymes). La formation de PEC entre le chitosane (polymère polycationique) et un polyanion, réticulant les chaînes de polymère par des ponts ne peut se produire qu'à des valeurs de pH comprises dans l'intervalle de pKa des deux polymères (Kanwar and Sinha, 2019). Cette sensibilité au pH va par ailleurs contrôler la libération de médicament et la taille des pores de diffusion suite au gonflement de la structure (Kempe and Mäder, 2012). Des interactions « *host-guest* » peuvent aussi mener à la formation de supramolécules comme les complexes d'inclusion. Ceci a notamment eu un impact en ingénierie tissulaire par le développement de nouveaux systèmes centrés sur l'association de la α - ou la β -cyclodextrine avec d'autres polymères (ex : acide hyaluronique, polyéthylène glycol, l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA, *poly(lactic-co-glycolic acid)*) et utilisés comme système cicatriciel et auto-guérisant (Lee, 2018).

Les systèmes chimiquement réticulés

Contrairement à la réticulation physique, la réticulation chimique permet la formation de réseaux de polymères liés par des liaisons covalentes grâce à la modification chimique des polymères (ex : par ajout de groupements fonctionnels thiol) ou l'ajout d'agent de réticulation préférablement non toxiques (ex : la génipine). Ces systèmes sont mécaniquement résistants et utilisent des réactions chimiques *in situ* tels que les réactions de chimie clic de Diels Alder, d'addition de Michael, de formation de base Schiff, ou encore enzymatiques. Des systèmes basés sur des biopolymères autoréticulants ont par ailleurs été développés par la réticulation de la gélatine avec l'alginate dialdéhyde oxydé en présence de borax. Ceux-ci ont été appliqués comme tissu cicatrisant (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012).

1.2.1.1.2.2. Les organogels se solidifiant *in situ*

Les organogels sont des systèmes semi-solides constitués d'une phase organique immobilisée dans un réseau tridimensionnel de fibres gélifiantes auto-assemblées, réticulées ou enchevêtrées. Afin de diminuer la viscosité du système et en faciliter l'injection, la NMP est souvent ajouté au système. Il permet, une fois sa diffusion hors du système post-injection, la formation du réseau par interactions physiques de faible énergie (notamment de van der Waals et liaisons hydrogène). D'autres systèmes injectables n'utilisant pas la NMP ont été étudiés en utilisant des lipides amphiphiles insolubles dans l'eau (ex : esters d'acides gras de glycérol) qui s'hydratent et gonflent avec l'eau environnante après injection en formant un réseau de phases cubiques avec des cristaux liquides lyotropes (Kanwar and Sinha, 2019; Rahnfeld and Luciani, 2020). Cependant, la viscosité et la stabilité de ces systèmes sont fortement dépendantes du point de fusion des huiles et des cires (Kempe and Mäder, 2012). Ceci a donc conduit à l'investigation de systèmes de faible viscosité associant les monoglycérides, l'eau et des co-solvants organiques (ex : DMSO, éthanol, 2-pyrrolidone, polyéthylène glycol 300 (PEG₃₀₀)) facilement stérilisables (autoclavage, filtration aseptique) (Ahmed *et al.*, 2010). En plus de la limitation provoquée par l'injection de ces systèmes sans solvant organique à haute température, certains d'entre eux possèdent une instabilité due à leur forme galénique. C'est le cas des organogels de monostéarate de sorbitane, à courte demi-vie, formés par des émulsions H / L au site d'injection (Lee *et al.*, 2019). Néanmoins, cette instabilité peut être améliorée par l'ajout d'un tensioactif non ionique, tel que le polysorbate 20 (Murdan, van den Bergh, *et al.*, 1999). Ce type de système, employé comme potentiel système d'administration de vaccin, a montré une délivrance prolongée d'antigènes modèles (albumine de sérum bovin et l'hémagglutinine) grâce à la présence d'une alternance de compartiments hydrophile-hydrophobe dans l'implant (Murdan, Gregoriadis, *et al.*, 1999).

1.2.1.1.2.3. Les systèmes de séparation de phases *in situ*

Une dernière stratégie pour former des dépôts de médicament après injection repose sur le phénomène de séparation de phase d'une solution. Ainsi, ce phénomène provoque un changement brusque de la solubilité de polymères suite à des stimuli externes, tels que la température, le pH ou l'élimination du solvant organique.

Les systèmes gélifiants induits par le pH

Les transitions sol-gel des polymères contenant des groupes fonctionnels ionisables (polyélectrolytes) peuvent être induites suite à des variations du pH environnemental. Cependant, un des problèmes récurrents est que ces polymères sont solubles à pH acide (ex : carbopol[®], chitosane) pour se séparer à pH basique (Kanwar and Sinha, 2019; Madan *et al.*, 2009). Une solution a toutefois été apportée par l'ajout d'un polymère hydrosoluble, l'hydroxypropylméthylcellulose, pour réduire la concentration de la solution en Carbopol[®] et par conséquent son acidité (Madan *et al.*, 2009). Deux méthodes peuvent également être combinées pour former des gels *in situ* comme c'est le cas pour les complexes interpolymères PEG-acide polyméthacrylique (PMA, *poly(methyl acrylate)*) (30-60 % m/m), où le PMA est non-ionisé à pH acide. En effet, à pH physiologique, lorsque les co-solvants (éthanol, NMP) maintenant le système sous forme liquide diffusent et s'échangent avec l'eau, le gel se forme (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012). L'utilité de ce système a été prouvée pour délivrer des protéines comme l'insuline (antidiabétique) et l'albumine (antigène modèle dans le cas de vaccination) (Kempe and Mäder, 2012).

Les pâtes thermoplastiques

Les pâtes thermoplastiques sont des systèmes composés de polymères avec un point de fusion / température de transition vitreuse dans l'étendue de gamme de 25 °C à 65 °C qui forment une solution lorsqu'ils sont chauffés au-dessus de ce point. Malgré que ce type de système est dépourvu de solvants organiques, les températures de transition vitreuse élevée de certains polymères (≥ 60 °C) comme l'acide polylactique (PLA, *poly(lactic acid)*) ou encore le poly(ϵ -caprolactone) (PCL) provoquent des douleurs à l'injection et une libération lente de la substance active (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Madan *et al.*, 2009). Pour remédier à ces problèmes, des implants à base de poly (ortho-ester) à bas poids moléculaire en combinaison avec de l'acide lactique ont été développés (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012). De plus, des systèmes à base du polymère PCL en association avec des additifs hydrosolubles (gélatine, albumine, dextrane, méthylcellulose, chlorure de sodium) ont aussi été étudiés pour moduler la libération de médicaments comme le paclitaxel (agent antinéoplasique) plus ou moins rapidement de quelques jours à plusieurs semaines (Kanwar and Sinha, 2019; Madan *et al.*, 2009).

Les systèmes de gélification thermiquement induits

Les systèmes se gélifiant sous l'effet de la température corporelle subissent une transition sol-gel qui ne nécessite pas l'emploi de solvants organiques ou de réactifs additionnels. Cependant, les transitions de phases sont dépendantes des interactions moléculaires, telles que les liaisons hydrogène ou les effets hydrophobes entre les chaînes de polymères. La formation des liaisons hydrogène pour solubiliser le polymère devient ainsi défavorable à une certaine température (LCST, *lower critical solution temperature*), ce qui augmente les interactions polymère-polymère (Kempe and Mäder, 2012). Les propriétés physico-chimiques des médicaments, des polymères, l'addition de sels / tensioactifs, et la vitesse de la cinétique de transition sol-gel sont autant de paramètres qui influencent les propriétés du gel thermosensible et la libération en substance active (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012). Divers systèmes composés de gélifiants synthétiques ou naturels ont été rapportés.

Un de ces systèmes utilise le Poloxamer 407 considéré comme sécuritaire (effet dose-dépendant) avec le Poloxamer 188, qui lui est approuvé pour l'administration parentérale. Cependant, la réticulation physique entre les micelles du gel de Poloxamer 407 est faible, ce qui limite leur application pour des thérapies court terme (Kempe and Mäder, 2012). Les blocs de copolymère PEG et PLGA ont également permis la formation de micelles polymériques dans l'eau qui s'agrègent à température corporelle (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Madan *et al.*, 2009; Wright and Burgess, 2012). Ce système permet une double administration de substances actives lipophiles (dans le noyau interne de PGLA) et hydrophiles (noyau externe de PEG), ce qui modifie la vitesse et la durée de libération de chaque type de médicament (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012). Ils ont par ailleurs été utilisés en oncologie de par la technologie ReGel[®] contenant du paclitaxel (Oncogel[®]) jusqu'à des essais cliniques de phase II dans le cadre du cancer de l'œsophage, du cerveau et du sein. Néanmoins, leur étude a été interrompue en phase IIb chez les patients atteints d'un cancer de l'œsophage, car cette thérapie néoadjuvante à la chimiothérapie standard et à la radiothérapie avant la chirurgie n'a montré aucun impact sur le critère principal, à savoir la réponse tumorale globale (Kempe and Mäder, 2012). Chenite *et al.* ont développé un système de chitosane avec β -glycérophosphate (β -GP) qui possède un intérêt spécifique pour l'ingénierie tissulaire (cicatrisation des plaies chroniques, réparation du cartilage) (Chenite *et al.*, 2000; Kempe and Mäder, 2012). Le système BST-Car-Gel[®] (mélange de

chitosane / β -GP et de sang autologue) a par ailleurs complété son étude clinique (ClinicalTrials.gov, identifiant NCT00314236) sur 80 participants, possédant des fractures du genou, répartis sur trois pays (le Canada, la Corée du sud et l'Espagne). Le traitement BST-CarGel a montré avoir un meilleur remplissage des lésions et une qualité de réparation de tissus supérieure au traitement par microfracture seul avec une tolérance et un bénéfice clinique similaire (Stanish *et al.*, 2013).

Les systèmes de transition sol-gel par échange / diffusion de solvants

Le système de séparation de phase par échange de solvants a été introduit par Dunn *et al.* dans les années 1990 (Dunn *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 1997). Ce concept est basé sur la dissolution d'un polymère (sauf pour la technologie SABER[®] utilisant l'isobutyrate d'acétate de saccharose), biodégradable et insoluble dans l'eau (ex : PLGA, PLA) dans un solvant organique et miscible à l'eau (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012). Le solvant organique diffuse alors dans le tissu environnant après injection, alors que les fluides corporels aqueux pénètrent dans l'implant formant un dépôt par séparation de phases et précipitation du polymère. Leur grand potentiel de transition sol-gel pour encapsuler les substances actives qui sont libérées après dégradation de l'implant par des processus de diffusion les rendent très attractifs. Par ailleurs, ce sont les seuls systèmes d'implants se formant in situ qui sont à ce jour commercialisés. On retrouve par exemple Atridox[®] pour l'administration de doxycycline (parodontite) et Eligard[®] pour l'administration de leuprolide (cancer de la prostate) (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Wright and Burgess, 2012). Plusieurs paramètres affectent la viscosité des solutions (poids moléculaire, concentration du polymère) et la vitesse de la transition sol-gel (miscibilité des solvants à l'eau). En effet, une concentration et un poids moléculaire élevé de polymère diminuent l'injectabilité et la libération en rafale initiale (« burst effect ») de la substance active (Kempe and Mäder, 2012). De plus, la miscibilité élevée du solvant pour le non-solvant (ex : NMP, 2-pyrrolidone, DMSO, glycofurol) entraîne une inversion de phase rapide (de l'ordre des secondes-minutes) formant ainsi des implants avec de larges pores de diffusion des substances actives. Ainsi, en diminuant l'affinité solvant / non-solvant avec des solvants organiques tels que la triacétine ou l'alcool benzylique, la taille des pores suite au dépôt diminue avec une inversion de phase plus lente (de l'ordre des heures-jours) (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; McHugh, 2005; Wischke and Schwendeman, 2012). Une des préoccupations majeures de ces systèmes est l'absence de réaction

d'irritation locale ou de toxicité systémique au vu de certaines études contradictoires pour certains solvants, ainsi que l'instabilité des polymères dans certains solvants à teneur élevée en eau et stockés à une température supérieure à 4 °C (ex : PLGA) (Dong *et al.*, 2006; Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Wischke and Schwendeman, 2012).

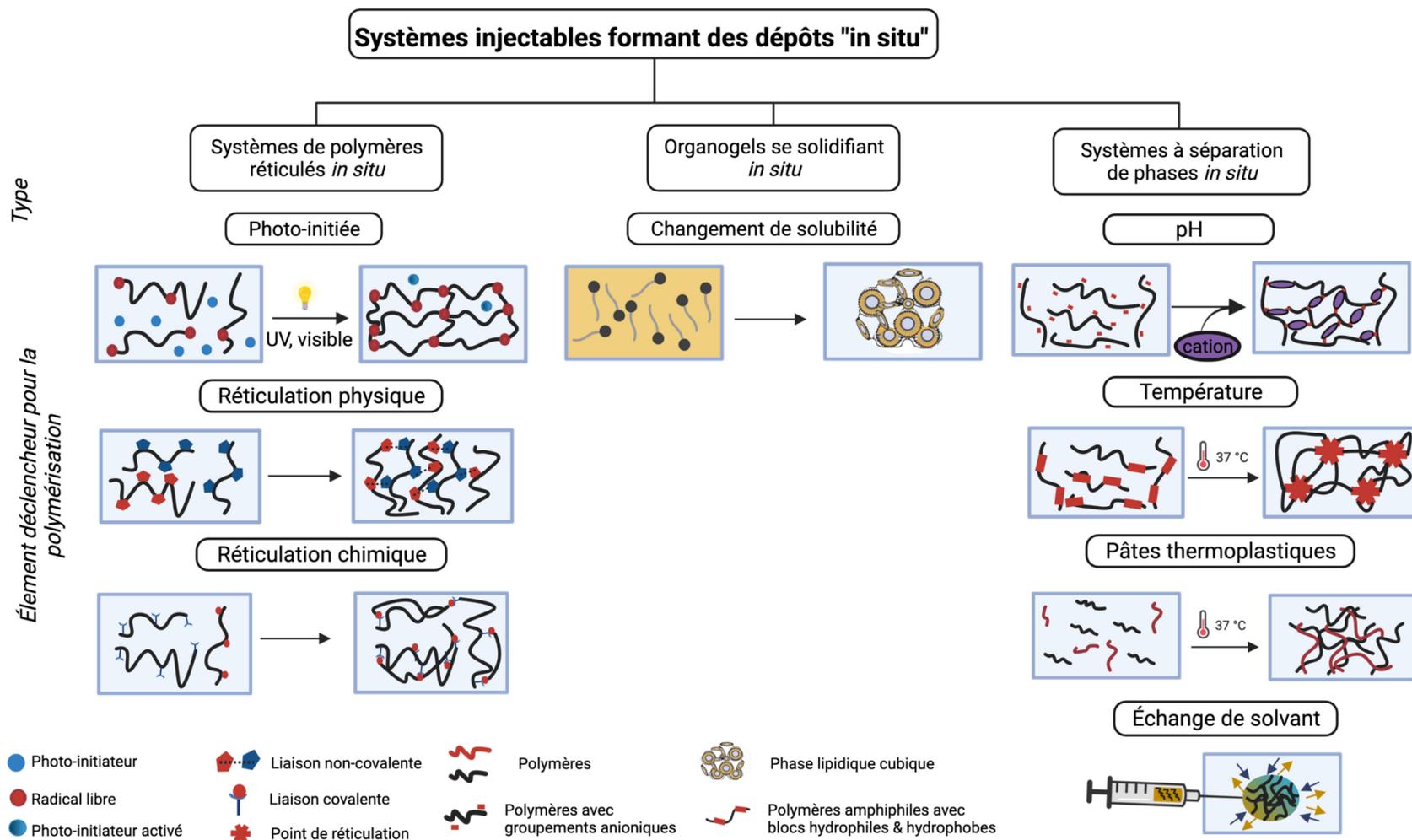


Figure 1.8 Classification des systèmes injectables formant des dépôts « *in situ* » en fonction des mécanismes impliqués dans leur formation. Schéma de classification modifié de (Kempe and Mäder, 2012). Cette figure a été créée avec BioRender.com.

1.2.1.1.3. La composition des implants *in situ* formés par inversion de phase

1.2.1.1.3.1. Les polymères

En raison de la large variété de polymères commercialisés, les systèmes de formation *in situ* ont notamment été caractérisés par leurs différentes organisations structurales. Les polymères utilisés dans les systèmes d'implants se formant *in situ* formés par échange / diffusion de solvants sont qualifiés de polymères intelligents car ils sont sensibles au changement de phase. Ces polymères utilisés principalement pour former des systèmes à libération contrôlée sont classés dans différentes catégories : (i) provenance (naturelle ou synthétique), (ii) solubilité (soluble dans l'eau à insoluble dans l'eau) et (iii) biodégradabilité (biodégradables à non biodégradables).

L'utilisation de polymères comme biomatériaux pour des applications biomédicales doit répondre à un certain nombre d'exigences du point de vue physico-chimique, biologique, mécanique et de dégradation. Ces biomatériaux doivent être biocompatibles, ce qui signifie qu'ils doivent remplir leur fonction *in vivo* sans provoquer de réponses locales ou systémiques néfastes dans le corps (Song *et al.*, 2018). Pour cela, les polymères biodégradables pouvant se décomposer et être éliminés après leur action dans l'organisme sans accumulation ont eu un grand intérêt. La biodégradation sous l'action d'enzyme et / ou par détérioration chimique associée aux organismes vivants se produit sur deux étapes : la fragmentation et la bioassimilation ou l'élimination du corps. La première étape décrit la fragmentation des polymères en espèces de masse moléculaire inférieure par réactions biotiques (dégradations par des microorganismes) ou abiotiques (oxydation, photodégradation ou hydrolyse). La bioassimilation des monomères de polymère est gérée par des micro-organismes pour produire des produits de dégradation inoffensifs et biocompatibles. La biodégradabilité dépend de la nature du polymère et notamment de sa structure chimique qui doit contenir des liaisons chimiques facilement clivables (Vroman and Tighzert, 2009).

On distingue deux classes de polymères biodégradables, ceux produits à partir de matières premières dérivées soit de ressources pétrolières (ressources non renouvelables, synthétiques) ou soit de ressources biologiques (ressources renouvelables, naturelles). Parmi les polymères synthétiques, on retrouve les polymères biodégradables « hydrophobes » couramment utilisés de

la famille des polyesters aliphatiques (les polyhydroxyacides, les polyanhydrides et les polyorthoesters). Les polyhydroxyacides tels que le PLA, le PLGA, et le PCL sont un choix populaire en raison de leur approbation par la FDA et de leur recherche poussée ayant permis leur utilisation en clinique (Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Song *et al.*, 2018; Ulery *et al.*, 2011).

Ces systèmes possèdent de nombreux avantages :

- Des propriétés mécaniques flexibles pour le PCL et modulables pour le PLGA par le ratio LA / GA favorables pour des applications en ingénierie tissulaire et administration contrôlée de médicaments (Leroux *et al.*, 2020; Makadia and Siegel, 2011; Pawlik *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2018; Ulery *et al.*, 2011; Vroman and Tighzert, 2009). Ainsi, la forme amorphe du PLGA (constituée moins de 70 % en LA) présenterait une faible résistance mécanique permettant une dispersion uniforme de la substance active, tandis que la forme cristalline conviendrait à des applications d'ingénierie mécanique avec une meilleure résistance mécanique. Cependant, dans un environnement humide, la température de transition vitreuse (T_g , *glass temperature*) du PLGA diminue, ce qui entraîne une plastification de la matrice polymérique et donc une diminution de ces propriétés mécaniques (Makadia and Siegel, 2011; Song *et al.*, 2018; Ulery *et al.*, 2011; Vroman and Tighzert, 2009).
- Une facilité de fabrication permettant la conception de nombreuses tailles et formes (films, fibres, nanoparticules, échafaudages poreux) de systèmes (Leroux *et al.*, 2020; Makadia and Siegel, 2011; Ulery *et al.*, 2011; Vroman and Tighzert, 2009).
- Une cinétique de dégradation ajustable en faisant varier notamment la cristallinité, le poids moléculaire, la taille et la forme de la matrice (ex : porosité, épaisseur). En général, la dégradation du PLGA et la vitesse de libération du médicament par diffusion et érosion peuvent être accélérées par : (i) une augmentation de l'hydrophilie pour les polymères riches en acide polyglycolique (PGA, *poly(glycolic acid)*) (ii) plus d'interactions chimiques entre les groupes hydrolytiques, (ii) une diminution de la taille du polymère sauf pour la forme énantiomère (L) de l'acide poly L-lactique (PLLA, *poly(L-lactic acid)*) qui augmente sa cristallinité (iii) moins de cristallinité et (iv) un plus grand rapport surface / volume du dispositif (structure poreuse) (Makadia and Siegel, 2011). Suite à la dégradation dans l'eau du PLGA par hydrolyse de ses liaisons esters, un environnement acide se forme par

diffusion des produits de dégradation (PLA et PGA) non toxiques vers la surface de l'implant et le milieu externe (Hines and Kaplan, 2013; Kanwar and Sinha, 2019; Makadia and Siegel, 2011). Le PLA et le PGA seront métabolisés puis éliminés sous forme de dioxyde de carbone et d'eau ou excrétés par le rein (seulement pour le PGA) (Kanwar and Sinha, 2019; Makadia and Siegel, 2011). L'hydrolyse de la PCL est, quant à elle, considérée lente en raison de la longueur du segment aliphatique hydrophobe entre les groupes esters de la chaîne principale et de son degré élevé de cristallinité (Almeida *et al.*, 2019; Pawlik *et al.*, 2019). Les produits de dégradation résultants sont des molécules solubles dans l'eau (Almeida *et al.*, 2019).

- L'encapsulation de molécules hydrophobes de par l'« hydrophobicité » des polymères et en manipulant la composition en PLA (plus hydrophobe) pour aider à la dispersion et stabilisation des molécules (Hines and Kaplan, 2013; Makadia and Siegel, 2011).
- La possibilité d'être fonctionnalisé pour former des copolymères à blocs comme le poly (L-lactide-co-caprolactone-co-glycolide). L'association entre ces derniers permet d'augmenter la stabilité thermique du polymère PLLA seul, mais aussi de neutraliser les produits de dégradation acide de celui-ci (Fernández *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2016).

D'autres solutions ont été apportées pour diminuer l'acidification du milieu suite à la dégradation des implants de copolymères d'acide lactique comme par exemple par l'utilisation d'organogélifiants de faible masse moléculaire (LMOG, *low molecular weight organogelators*), tels que le monostéarate de sorbitane, des dérivés d'acides aminés (ester méthylique de N-béhénoyl L-tyrosine, ester méthylique de N-stéaroyl ou L-lauroyl L-alanine, ester méthylique de N-icosanoyl-l-sérine, dérivés de l-lysine) ou encore des esters gras glycéryliques (Bastiat and Leroux, 2009; Bastiat *et al.*, 2010; Couffin-Hoarau *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2020; Kanwar and Sinha, 2019; Kaplan *et al.*, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Lee *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2016; Madan *et al.*, 2009; Motulsky *et al.*, 2005; Murdan, Gregoriadis, *et al.*, 1999; Plourde *et al.*, 2005). L'utilisation de biomolécules pour la synthèse d'organogélifiants dérivés d'acides gras et d'acides aminés possède de nombreux avantages en termes de biodégradabilité et biocompatibilité tout en gardant les avantages des polymères synthétiques (reproductibilité, production à l'échelle industrielle, contrôle des paramètres physico-chimiques et de la structure).

1.2.1.1.3.2. Les solvants

Les propriétés du solvant utilisé dans la préparation des systèmes *in situ* injectable dépendent de plusieurs facteurs : (i) sa solubilité et compatibilité chimique avec le polymère choisi pour assurer la stabilité du système et une faible viscosité à l'injection, (ii) sa biocompatibilité, (iii) sa miscibilité dans l'eau et les fluides corporels pour permettre l'échange solvant / non-solvant et (iv) sa capacité à faciliter la transition sol-gel du système (Kanwar and Sinha, 2019).

Les solvants couramment utilisés pour les systèmes d'implants se formant *in situ* formés par échange / diffusion de solvants peuvent être classés en deux catégories: les liquides organiques hautement miscibles dans l'eau et ceux faiblement miscibles dans l'eau.

Les solvants hautement miscibles dans l'eau

Cette catégorie comprend compte tenu des systèmes étudiés à ce jour dans les implants se formant *in situ* : la NMP, le DMSO, l'acétone, le propylène glycol, le tétrahydrofurane, la 2-pyrrolidone (application vétérinaire majoritairement), le glycofurol, le myristate ou palmitate d'isopropyle et le PEG de bas poids moléculaire. Dû à leurs pouvoirs de solvation et leur forte miscibilité dans l'eau (inversion de phases rapide), ces systèmes sont moins visqueux donc plus faciles à injecter et forment un système polymérique hautement poreux *in situ* (diffusion de la substance active plus rapide), respectivement. L'entrée rapide de l'eau dans le système crée un environnement hydrophile dans l'implant et améliore ainsi sa biocompatibilité *in vivo* (Ahmed *et al.*, 2014; Brodbeck *et al.*, 1999; Dong *et al.*, 2006; Kanwar and Sinha, 2019; McHugh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Wischke and Schwendeman, 2012; Zhang *et al.*, 2019). De plus, afin d'améliorer la toxicité systémique, certains de ces solvants tels que la NMP, DMSO et le glycofurol ont été utilisés en association avec le PEG et le propylène glycol (Le Renard *et al.*, 2010).

Les solvants faiblement miscibles dans l'eau

Afin de réduire la taille des pores par inversion de phase lente, divers solvants ont été utilisés, tels que le benzoate de benzyle (utilisé majoritairement pour des formulations topiques), la triacétine (utilisé majoritairement pour des formulations orales) et l'alcool benzylique (utilisé majoritairement comme agent conservateur). L'effet de libération en rafale a été ainsi réduit par l'utilisation de ces solvants seuls ou en associations benzoate de benzyle / alcool benzylique,

triacétine / NMP, benzoate de benzyle / NMP ou carbonate de propylène ou DMSO (Ahmed *et al.*, 2014; Brodbeck *et al.*, 1999; Chen and Singh, 2005; Kanwar and Sinha, 2019; McHugh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Wischke and Schwendeman, 2012; Zhang *et al.*, 2019). Cependant, le maintien d'une viscosité adaptée pour favoriser l'injectabilité de ces systèmes doit être maintenu avec l'emploi de solvant plus « hydrophobe ».

Bien que le paramètre de miscibilité des solvants est important, ces solvants peuvent être aussi classés selon leur polarité. En effet, il a été montré que la dégradation des polymères de PLGA était plus lente dans des solvants aprotiques polaires (DMSO, NMP, triacétine, acétate d'éthyle) que dans des solvants protiques polaires (PEG 400, 2-pyrrolidone, citrate de triéthyle) (Ahmed *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2006). La capacité de donneur de liaison hydrogène et de former des liaisons hydrogène avec le polymère des solvants protiques polaires serait à l'origine de l'augmentation de l'hydrolyse du PLGA. D'autre part, les solvants aprotiques polaires offriraient une protection des liaisons ester en restreignant leur accès à l'eau dans ce cas-ci (Dong *et al.*, 2006).

Le cas particulier des huiles pour organogels injectables

Les systèmes d'organogels développés dans la littérature étaient principalement composés des huiles végétales de carthame et de soja (Bastiat and Leroux, 2009; Bastiat *et al.*, 2010; Couffin-Hoarau *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2016; Motulsky *et al.*, 2005; Plourde *et al.*, 2005). Ceci est dû au fait que l'huile végétale est une matière première biosourcée qui peut être métabolisée et former des produits de dégradation potentiellement biocompatibles (Lligadas *et al.*, 2013). Les principales liaisons retrouvées entre les organogélifiants et les huiles végétales sont généralement de type de van der Waals et liaisons hydrogène. Ces liaisons sont dépendantes notamment de la longueur de la chaîne alkyle et de la capacité de solvation du solvant envers l'organogélifiant. En effet, une longueur de chaîne alkyle plus grande augmentera les interactions de type van der Waals (faibles interactions) et la résistance du gel. De plus, les gels se formant majoritairement par liaisons de van der Waals créeront plus de liaisons avec des huiles riches en triacylglycérol qu'en acides gras libres (Lupi *et al.*, 2016). La stabilité des huiles est donc directement reliée à leur composition en acides gras. L'huile de carthame avec une teneur en acide oléique élevée est relativement stable au niveau de sa stabilité oxydative (> 70 % d'acides gras totaux). Cependant, l'huile de soja est souvent associée à des antioxydants ou d'autres huiles pour

élever sa faible stabilité thermo-oxydative à cause d'une teneur élevée en acide linoléique (~ 50 % d'acides gras totaux) (Madhujith and Sivakanthan, 2018).

1.2.1.1.4. Le mécanisme de diffusion des substances actives à partir des implants sous-cutanés

Dès l'injection de la solution / suspension polymérique, les implants se formant *in situ* subissent un processus de gélification complexe qui a pu être schématisé pour les systèmes d'échange de solvant / non solvant *via* un diagramme de phases ternaire (Figure 1.9). Au sein de ce processus dépendant de la température, l'échange liquide-liquide et la structure de l'implant résultant sont fortement affectés par la thermodynamique et la cinétique du système. Dans ce diagramme, le mécanisme d'inversion de phase se produit par nucléation et croissance du polymère (entre les courbes binodale et spinodale, région métastable) ou par décomposition spinodale (dans la zone spinodale, région instable). Ce dernier mécanisme emprunte la voie ii de précipitation (phase hétérogène), ce qui affecte la distribution des pores (régions pauvres en polymère) lors du dépassement du point critique et forme une structure bicontinue. La position de la courbe binodale (sépare les régions monophasées et biphasées) proche de l'axe polymère-solvant indique une phase rapide d'inversion (morphologie « Finger-like ») tandis qu'un déplacement vers la droite du diagramme de celle-ci entrainera une phase lente d'inversion (morphologie « sponge-like »). Ces courbes critiques peuvent être déterminées par différents modèles mathématiques, dont la théorie de Flory-Huggins, et des paramètres d'interaction des composants du système *via* des données expérimentales (Idris *et al.*, 2017; Romay *et al.*, 2021).

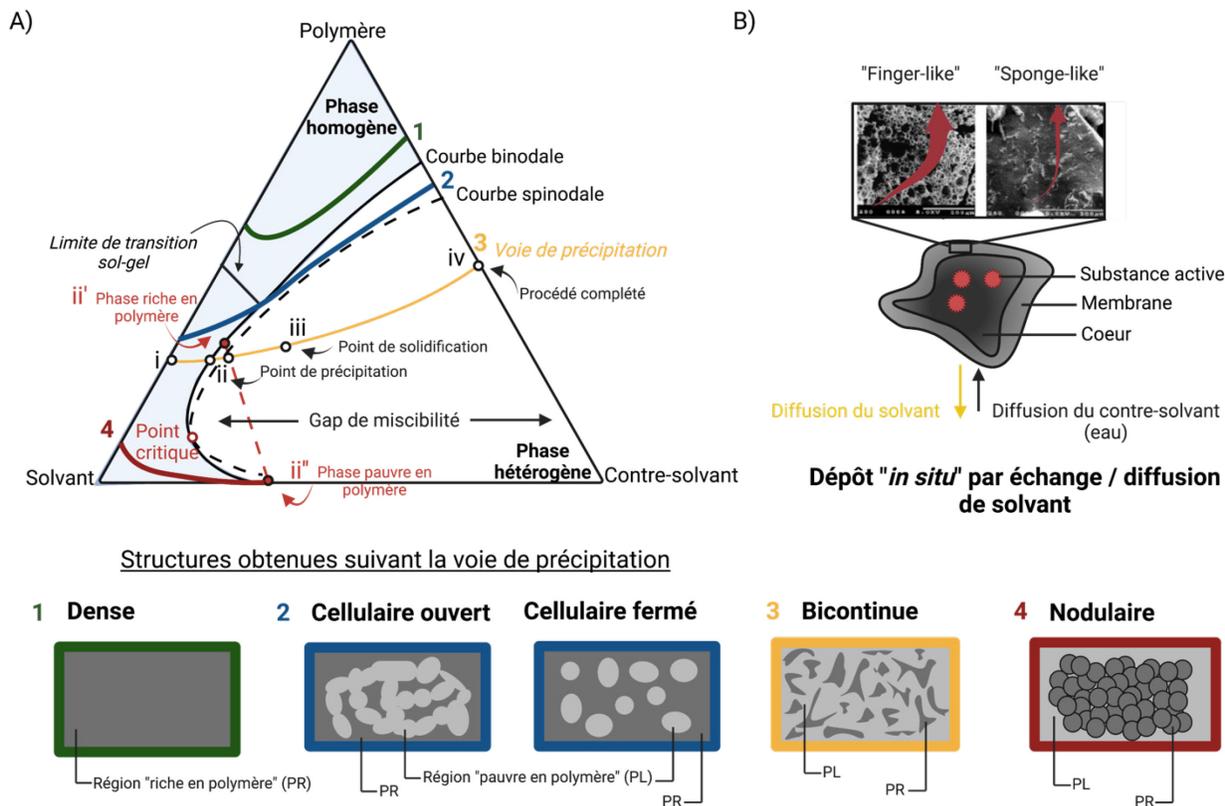


Figure 1.9 Mécanismes de formation et de fonctionnement des implants se formant *in situ* par échange / diffusion de solvant. (A) Représentation schématique d'un diagramme de phases ternaire représentant les trois composants de ce système de dépôt : le polymère, le solvant et le non-solvant. Plusieurs voies peuvent être suivies pendant cet échange solvant / non-solvant, ce qui entraîne la formation de plusieurs morphologies. Adapté de (Romay *et al.*, 2021) (B) Composition et mécanisme de fonctionnement des dépôts *in situ* avec une emphase sur la composition de la membrane. La matrice polymérisée est entourée de gouttelettes pauvres en polymère dispersé qui vont influencer le flux de libération de la substance active (proportionnel à l'épaisseur de la flèche). Figure modifiée de (McHugh, 2005). Cette figure a été créée avec BioRender.com.

Afin de maîtriser le mécanisme de libération et contrôler la libération de la substance active ultérieure, il est important de prendre en compte certains paramètres au sein des différents systèmes d'implants se formant *in situ*. Ces divers paramètres comprennent : (i) la forme de l'implant suite à l'injection de la solution / suspension polymérique (dimension / aire de surface) et (ii) la transition

sol-gel ou gel-sol qui dépend des propriétés physico-chimiques du système et qui va influencer la structure et la libération en rafale de la substance active.

Le mécanisme de libération de substances actives des systèmes polymériques par inversion de phase recense généralement les phénomènes suivant : (i) la dissolution du médicament, (ii) sa diffusion à travers la matrice de polymère (phase riche en polymère) et / ou à travers les pores (phase pauvre en polymère) remplis d'eau (en séquentiel ou en parallèle) de la matrice qui peuvent être entraînés par des gradients de potentiel chimique ou encore par pompage osmotique / convection, (iii) la dégradation et l'érosion des polymères et (iv) les interactions médicament - médicament ou polymère-médicament. Les phénomènes de dissolution et de diffusion selon les propriétés physico-chimiques de la substance active seront abordés dans la section 1.2.1.1.5. L'étude des mécanismes et des cinétiques de relargage de substance active des implants se formant *in situ* a été décrite par de nombreuses recherches, mais celles-ci ont surtout été centrées sur les systèmes d'administration à base de PLGA (Ahmed *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2014; Brodbeck *et al.*, 1999; Chen and Singh, 2005; Hines and Kaplan, 2013; Kamaly *et al.*, 2016; Kanwar and Sinha, 2019; Makadia and Siegel, 2011; McHugh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2010; Suh *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2014; Wischke and Schwendeman, 2012; Zhang *et al.*, 2019). Concernant les implants *in situ* d'organogels, les principaux phénomènes rapportés sont la diffusion, la solubilisation et la dégradation / érosion (de surface majoritairement) des polymères par hydrolyse ou sous l'action des estérases et lipases endogènes (Bastiat *et al.*, 2010; Couffin-Hoarau *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2020; Kaplan *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019; Plourde *et al.*, 2005). Malheureusement, les études portant sur les phases précises de libération de la substance active de ces implants n'ont pas encore été largement étudiées.

Trois phases typiques de libération du médicament à partir des systèmes à base de PLGA ont été identifiées après injection *in situ* (Ahmed *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2014; Brodbeck *et al.*, 1999; Chen and Singh, 2005; Hines and Kaplan, 2013; Kanwar and Sinha, 2019; Makadia and Siegel, 2011; Parent *et al.*, 2013; Suh *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2014; Wischke and Schwendeman, 2012) :

1. La phase de libération du médicament en rafale lors d'une période de latence avant la formation du dépôt. Cette libération se fait en surface *via* les pores du système.

2. La diffusion lente du médicament dans la matrice polymérique de par l'implication des phases riches et faibles en polymères.
3. Une première phase de dégradation généralement par hydrolyse de façon générale pour les polymères synthétiques suivie d'une deuxième phase rapide de libération de la substance active par érosion. Cette érosion a lieu quand le poids moléculaire du polymère partiellement dégradé atteint une masse suffisamment faible pour se solubiliser et diffuser hors de l'implant.

Un certain nombre de paramètres sont à prendre en compte dans la vitesse de libération du médicament, tels que la nature, la concentration, la cristallinité, l'hydrophilie et le poids moléculaire du polymère. De plus, la miscibilité du solvant pour le non-solvant et les additifs utilisés dans la formulation vont aussi avoir une influence particulière sur la phase de libération de la substance active de l'implant. Les deux processus principaux : la diffusion du médicament et l'érosion de la matrice sont donc influencés par ces divers paramètres et peuvent avoir lieu de façon concomitante (Hines and Kaplan, 2013; Makadia and Siegel, 2011). Ils vont contribuer par ailleurs à augmenter la taille des pores et modifier leur tortuosité, ce qui va augmenter la libération de la substance active en fonction du temps. Cependant, dans certains systèmes (notamment ceux hydrophobes), l'érosion est considérée comme un mécanisme à part entière de libération de la substance active (Kamaly *et al.*, 2016).

L'effet de libération en rafale de la substance active hors de l'implant

Dans un cadre idéal, le profil de libération d'un médicament administré par un système d'implant se formant *in situ* serait d'ordre zéro tout en minimisant l'effet de libération en rafale initial pour obtenir un maintien de l'administration du médicament dans une fenêtre thérapeutique spécifique. Cet effet de libération initiale en rafale a lieu généralement dans les premières 24 heures avant que le taux de libération atteigne un profil stable et est accéléré lors d'une inversion de phase rapide (Ahmed *et al.*, 2012; Ahmed *et al.*, 2014; Kamaly *et al.*, 2016; Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012; Makadia and Siegel, 2011; McHugh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2010; Suh *et al.*, 2021; Thakur *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Cette dernière peut être due (i) à une forte miscibilité du solvant pour le non-solvant, (ii) un faible poids moléculaire de la substance active de préférence hydrophile ou encore un rapport polymère / médicament faible, (iii)

des pressions osmotiques, ce qui libère une dose importante en bolus de la surface de l'implant par les larges pores et (iv) la forme / microstructure de l'implant post-injection influencée par le procédé de fabrication. Les inconvénients de cette rapide libération incontrôlée sont que certains médicaments ont des fenêtres thérapeutiques étroites (ex : hormones de croissance, les agents chimiothérapeutiques comme le paclitaxel, le docétaxel, l'oxaliplatine), ce qui augmente leurs effets indésirables et leur toxicité potentielle. De plus, cela réduit leur efficacité en termes de vecteur à libération prolongée de médicament, par conséquent l'administration de nouvelles doses de médicament est plus fréquente. Cependant, dans certains cas comme pour l'administration prolongée d'antibiotiques dans le cas de fractures, la libération en rafale est nécessaire pour obtenir une dose de charge initiale pour empêcher la formation d'un biofilm protecteur par les bactéries (Gimeno *et al.*, 2015).

Bien que l'effet de libération en rafale ne peut être éliminé complètement, un certain nombre de paramètres dans la formulation peuvent être modifiés par :

- La diminution de la miscibilité du solvant pour le non-solvant changeant ainsi la dynamique d'inversion de phase. Ce phénomène produit des dépôts solides qui peuvent se former dans un intervalle de quelques minutes (implant à petits pores) à plusieurs heures (implant à gros pores). Différentes morphologies peuvent être obtenues selon la voie de précipitation suivie dans la phase hétérogène pour la formation de l'implant *in situ*, ce qui affecte la distribution des pores et donc la cinétique de libération de la substance active (voir Figure 1.9) (Ahmed *et al.*, 2012; Brodbeck *et al.*, 1999; McHugh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019; Kanwar and Sinha, 2019)
- Une concentration initiale en polymère ou un poids moléculaire élevé(e), ce qui diminue la diffusivité de l'échange solvant-non solvant par augmentation de la viscosité et de l'hydrophobicité (structure dense avec diminution de la taille des pores, voir Figure 1.9). (Ahmed *et al.*, 2012; Kamaly *et al.*, 2016; Patel *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2019). Cependant, cette augmentation en viscosité du système ne doit pas entraver l'injectabilité de celui-ci (Kempe and Mäder, 2012; McHugh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2014).
- L'ajout d'un second polymère, la complexation / densification de la substance active comme additifs au système. En effet, l'ajout d'un polymère hydrophobe (ex : acide stéarique, monostéarate de glycéryle) ou d'un complexe protéine-zinc a permis de diminuer

la libération en rafale d'un médicament lipophile (ex : rispéridone, antipsychotique) ou d'une protéine (ex : hormone de croissance humaine par diminution de la solubilité dans l'eau) des implants PLGA, respectivement. À l'opposé de l'emploi de polymère hydrophobe, l'utilisation de la polyvinylpyrrolidone (PVP) de haut poids moléculaire (poids moléculaire = $1300000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) en tant que polymère hydrophile à faible concentration (3 % m/m) a significativement augmenté la libération de lysozyme lors de la formation de l'implant (Parent *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2014).

- L'addition d'un groupement terminal fonctionnel. Les polymères PLGA peuvent être coiffés d'un groupe ester moins polaire que le polymère non coiffé (groupe carboxylique à l'extrémité). Ainsi, il a été montré que la vitesse de libération de médicament protéique était ralentie lorsque le polymère était non coiffé. Ce phénomène semble être dû à l'interaction ionique des résidus d'acides aminés avec les groupements terminaux carboxyliques (Parent *et al.*, 2013; Thakur *et al.*, 2014).
- Le contrôle de la forme de l'implant. La microstructure interne de l'implant obtenue dépend de plusieurs paramètres lors du processus de précipitation, tels que la formulation (composition, viscosité, solubilisation), l'environnement (protéines, cellules, pH, ions, pression des tissus) et la procédure d'administration (vitesse d'administration, type d'aiguille, localisation). Ce paramètre est très important et est une source de limitation actuelle pour contrôler l'effet de libération en rafale initiale, les conditions de diffusion de la substance active et établir des corrélations *in vitro-in vivo*. En effet, le trajet diffusionnel du solvant et la vitesse d'échange du solvant / non-solvant seront déterminés par la forme de l'implant. Plus le polymère précipite, plus les distances de diffusion seront étendues au sein de l'implant. Une des solutions pour leur expansion en clinique serait l'utilisation de dispositifs d'injection standardisés (contrôle de la vitesse, volume, profondeur d'injection) (Suh *et al.*, 2021).

1.2.1.1.5. L'effet des propriétés physico-chimiques des substances actives sur leur libération dans la peau

Dans les systèmes d'implants se formant *in situ*, la substance active peut être présente sous forme dissoute ou dispersée selon ses propriétés physicochimiques et sa concentration. Le principal mécanisme permettant la libération de la substance active étant la diffusion, l'étude de petites

substances actives dispersées (rispéridone et la palipéridone) dans le solvant organique (DMSO) ont montré avoir une libération plus lente que celles dissoutes dans le solvant NMP. Cependant, les molécules de haut poids moléculaire, telles que les protéines ont accéléré leur libération lorsqu'elles étaient présentes sous l'état dispersé. Cet effet peut être dû à la présence d'agrégats de taille importante formant des pores en surface qui augmente la diffusion de la substance active et la dégradation du système (Parent *et al.*, 2013). Généralement, une augmentation de la concentration en substance active à une valeur définie pour chaque système (dépendamment du type de médicament et du système) dans l'implant a permis d'augmenter le taux de libération en substance active (ex : substance active étudiée : testostérone) (Chen and Singh, 2005; Parent *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2010). L'étude de ces derniers permet de formuler des systèmes injectables à haute concentration en actif lorsque la marge d'augmentation en concentration de la substance active contribuant à ne pas modifier le taux de libération est élevée. Ceci apporte à la fois un gain au niveau économique avec une diminution du volume de l'implant, mais aussi au niveau du patient, en diminuant les douleurs liées à l'administration du système (Parent *et al.*, 2013).

Un autre point important est l'interaction du médicament avec les excipients du système qui peut accélérer la vitesse de dégradation de l'implant se formant *in situ* et la vitesse de diffusion du médicament par rapport à leur affinité pour l'eau. En effet, un médicament de type hydrophile peut augmenter à la fois sa diffusion dans le système suite au gonflement du polymère (ex : N-acétyl-cystéine, kétoprofène) et la dégradation des chaînes de polymère (ex : aspirine) en tant que donneur de liaisons hydrogène (Ahmed *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2014; Wischke and Schwendeman, 2012). D'un autre côté, le polymère et / ou le solvant peuvent dégrader un médicament (contrainte de l'eau et environnement acide pour les implants de PLGA) ou interagir par liaisons ioniques avec celui-ci en ralentissant la dégradation par érosion de la matrice (Hines and Kaplan, 2013; Kamaly *et al.*, 2016; Parent *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2010; Wischke and Schwendeman, 2012; Zhang *et al.*, 2019).

1.2.1.2. L'administration transdermique de médicaments par microaiguilles

Le concept de base des microaiguilles a été proposé par Gerstel et Place en 1976 pour fournir une nouvelle voie d'administration alliant à la fois les avantages de l'injection parentérale et des timbres transdermiques tout en s'affranchissant des défis associés à ces deux systèmes d'administration (passage des barrières de la voie cutanée et / ou lié à leur formulation) (Gerstel, 1976). Le potentiel des microaiguilles comme système de délivrance de médicaments pour améliorer l'efficacité des médicaments et l'observance thérapeutique fait l'objet de nombreuses recherches au niveau de la fabrication des timbres de microaiguilles et des composants de formulation. En effet, les méthodes de fabrication utilisant des microaiguilles à base de métaux se sont dirigées vers des techniques peu coûteuses utilisant des substances biocompatibles ou des polymères biodégradables se retrouvant dans les dispositifs approuvés par la FDA.

1.2.1.2.1. Les matériaux pour la fabrication de microaiguilles

Initialement, le silicium a été le premier matériau utilisé pour la fabrication de microaiguilles pour ses attributs mécaniques, tels que leur résistance à percer la peau et les différentes formes qui peuvent être obtenues lors de la fabrication. Cependant, de nombreux désavantages ont été rapportés lors de leur fabrication (coût, temps, étapes) et au niveau de leur biocompatibilité notamment à cause de la cassure des aiguilles (non dégradables) dans la peau. Ceci peut donc entraîner un encrassement biologique tout en induisant une réponse inflammatoire chez le patient (Guillot *et al.*, 2020; Ita, 2015; Jung and Jin, 2021; Kirkby *et al.*, 2020; Waghule *et al.*, 2019). Afin de se diriger vers des microaiguilles présentant une meilleure biocompatibilité et résistance aux fractures, d'autres matériaux ont été utilisés, tels que l'acier inoxydable, le titane, le palladium et le nickel. D'autres matériaux ont également été utilisés peu coûteux naturels ou synthétiques / semi-synthétiques pour leurs aspects biocompatibles comme les polymères hydrosolubles ou biodégradables (ex : alcool polyvinylique (PVA, *poly(vinyl alcohol)*) / alcool polyvinylique, PVP, PLGA, chitosane), les glucides (ex : maltose, sucrose, tréhalose, mannitol), les céramiques (ex : alumine, sulfate de calcium dihydraté) et les verres de silice. En revanche, ceux-ci sont moins résistants à la contrainte mécanique que les métaux (Guillot *et al.*, 2020; Indermun *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021).

1.2.1.2.2. Les types de microaiguilles pour l'administration transdermique de substances actives

En contournant le *stratum corneum*, la livraison de macromolécules a été possible en utilisant des stratégies de distributions différentes reposant présentement sur le réglage de la force d'insertion et de la géométrie des microaiguilles (hauteur, largeur, forme géométrique). Certaines régions peuvent être ainsi ciblées pour diminuer la dose requise pour obtenir l'effet thérapeutique désiré (ex : vaccination avec présence de cellules immunitaires dans l'épiderme / derme). Selon la conception de la microaiguille, généralement organisée en réseau pour améliorer le contact avec la peau et la pénétration des substances actives, cinq types d'approches pour l'administration de médicament ont été recensés (Figure 1.10). Le choix du type de microaiguilles pour l'administration d'un médicament donné doit être maximisé pour obtenir les meilleures efficacité et observance possibles compte tenu du traitement de chaque patient.

La fabrication de microaiguilles doit prendre en compte les propriétés élastiques de la peau s'opposant à la pénétration des aiguilles et à la libération efficace de substance active surtout pour les microaiguilles émoussées et courtes. À ce jour de nombreuses techniques ont été rapportées utilisant notamment des technologies de systèmes micro-électromécaniques (*microelectromechanical systems*, MEMS) incluant la lithographie aux rayons X, le micro-usinage laser (découpe, ablation), la gravure ionique réactive profonde, la gravure humide (en phase liquide) et sèche (en phase gazeuse, gaz ou plasma), et la micro-fabrication à base de polymère (micro-moulage, moulage par injection, photopolymérisation, photolithographie et gouttelettes produites par soufflage dans l'air) (Guillot *et al.*, 2020; Indermun *et al.*, 2014; Ita, 2015; Jung, 2014; Kim *et al.*, 2012; Ramadon *et al.*, 2021; Waghule *et al.*, 2019). Plus récemment, l'impression 3D a permis de produire des microaiguilles aux géométries plus variables et complexes en utilisant des procédés, tels que la stéréolithographie de haute précision, la méthode de traitement numérique de la lumière ou la modélisation par dépôt en fusion (Jung and Jin, 2021).

Les microaiguilles solides

C'est le premier concept qui a été développé pour améliorer l'administration transdermique de médicaments par diffusion passive en deux étapes. Les microaiguilles permettent ainsi de créer des microconduits en prétraitement, ce qui permettra par la suite l'absorption de médicaments en

appliquant un timbre de microaiguilles transdermique chargé de médicament (approche « Poke and patch »). En 1998, Henry *et al.* ont fabriqué une microaiguille solide à base de silicium pour l'administration transdermique d'une sonde fluorescente, la calcéine (Henry *et al.*, 1998). Les autres types de matériaux utilisés pour ce type de microaiguilles ont été le métal (titane, tungstène, acier inoxydable, nickel), la céramique (alumine, sulfate de calcium dihydraté), le polymère biodégradable PLA (Guillot *et al.*, 2020; Indermun *et al.*, 2014; Ita, 2015, Jung and Jin, 2021; Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021; Waghule *et al.*, 2019). L'administration transdermique de macromolécules hydrophiles a pu ainsi être améliorée face aux systèmes classiquement utilisés par voie passive. Parmi les macromolécules étudiées, on retrouve l'albumine de sérum bovin, l'insuline, l'immunoglobuline G humaine (anticorps), les peptides (L-carnitine, tétrapeptide-3, hexapeptide, acétyl hexapeptide-3), l'ocytocine (hormone post-hypophysaire) et l'ovalbumine (antigène modèle, vaccination) (Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2014). Différentes techniques de fabrication sont retrouvées pour la production de ces microaiguilles solides comme : (i) la photolithographie pour les microaiguilles en silicium ou en polymère, (ii) la gravure humide et sèche qui détermine la forme effilée de la pointe des aiguilles pour les microaiguilles en silicium ou en métal, (iii) l'ablation laser pour les microaiguilles en silicium, (iv) le micro-moulage pour les microaiguilles en céramique et (v) la découpe laser pour les microaiguilles en métal (Guillot *et al.*, 2020; Ita, 2015; Jung and Jin, 2021; Kim *et al.*, 2012; McAllister *et al.*, 2003).

Les microaiguilles enrobées de médicament

Les microaiguilles enrobées sont des microaiguilles solides comprenant un revêtement de surface composé d'une formulation médicamenteuse (solution ou dispersion avec agents épaississants et tensioactifs) qui sera dissout au contact du liquide interstitiel (approche « coat and poke »). Cette technologie permet l'administration du médicament en une seule étape de par son adhésion sur les pointes de microaiguilles. Ces microaiguilles ont été utilisées dès 2004 pour la délivrance de macromolécules enduites avec une solution de desmopressine. Par la suite, d'autres microaiguilles enrobées de médicament ont été produites pour améliorer la délivrance de protéines comme l'insuline, l'ovalbumine, l'antigène de surface de l'hépatite B, l'hormone parathyroïdienne, la toxine botulique-A et l'albumine de sérum bovin. Elles ont aussi été utilisées pour l'administration de virus / bactérie inactivée comme la grippe, le papillomavirus humain, le virus

du chikungunya et la bactérie *Mycobacterium bovis* ou encore pour administrer de l'ADN et des peptides (voir tableau 1.2) (Indermun *et al.*, 2014; Ita, 2015; Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021; Waghule *et al.*, 2019). Cependant, un inconvénient majeur de ce système est la quantité limitée de médicaments qui peut être délivrée et qui dépend de l'épaisseur de la couche de surface. Ceci limite ainsi l'utilisation de ce type de microaiguilles pour des médicaments avec une grande puissance (Jung and Jin, 2021; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021). Généralement, les microaiguilles enrobées de médicament sont produites à partir de microaiguilles solides en métal ou de polymères qui sont plongées ou pulvérisées avec une ou plusieurs solutions / suspensions aqueuses (ex : nanoparticules) de médicaments (Kim *et al.*, 2012; Waghule *et al.*, 2019).

Les microaiguilles creuses

En 1996, Gross et Kelly ont élaboré les premières aiguilles creuses avec une chambre de médicament à la fois expansible et contractile pour l'administration de médicament. Ce système a été repris et amélioré par Zhan *et al.* en 2000 qui ont rapporté la création de microaiguilles creuses (Ramadon *et al.*, 2021). Les microaiguilles creuses sont conçues pour administrer le médicament (en solution ou dispersion) chargé à l'intérieur de la microaiguille et injecté à travers le canal creux de l'aiguille (approche « Poke and flow »). Ce système permet donc un chargement de doses plus élevées en médicament que les deux microaiguilles précédentes (solides et enrobées) (Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021; Waghule *et al.*, 2019). Cependant, bien que ce système soit également centré sur l'administration de macromolécules (ex : insuline, toxine botulique A, albumine de sérum bovin, ARNm) et en particulier les vaccins qui peuvent être insérés dans des nanoparticules, les canaux peuvent se retrouver par conséquent obstrués (Guillot *et al.*, 2020; Ita, 2015; Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021). Le débit et la pression de libération de substance active peuvent donc être ajustés par la taille des pores des canaux (Kim *et al.*, 2012; Waghule *et al.*, 2019). De plus, ce système a également été adapté pour le prélèvement de faibles volumes sanguins (20 μ L) de manière non invasive ou encore pour améliorer l'administration transdermique de calcéine et d'albumine de sérum bovin en association avec la sonophorèse (Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020). Ces microaiguilles sont composées de divers matériaux : des métaux, du silicium, du verre ou des polymères (ex : poly(méthacrylate de méthyle), polyimide) (Ita, 2015; Kim *et al.*, 2012; Ramadan *et al.*, 2021). La fabrication de ce type

de système est réalisée en utilisant diverses techniques de MEMS, tels que la photolithographie suivie d'une gravure humide (Guillot *et al.*, 2020; Ita, 2015; Jung and Jin, 2021; Kim *et al.*, 2012; McAllister *et al.*, 2003).

Les microaiguilles se dissolvant dans la peau

Ce type de microaiguilles est retrouvé dès 2006 avec une technologie qui permet après insertion du timbre la dissolution des aiguilles dans la peau (approche « Poke and release ») (Ramadon *et al.*, 2021). La vitesse de libération des médicaments est donc sous la dépendance de la composition en polymères (type, concentration) solubles et biocompatibles formant la matrice (Ramadon *et al.*, 2021). De plus, de nombreux paramètres peuvent être modifiés pour conserver l'activité de certaines molécules sensibles aux conditions de fabrication et d'entreposage (séchage, température, humidité, agents stabilisants) ou interagissant avec des polymères (nature du polymère, concentration) (Ita, 2015; Kirkby *et al.*, 2020).

À ce jour, la fabrication des microaiguilles se dissolvant dans la peau fait intervenir le plus souvent des procédés de micro-moulage avec des moules en silicone ou de polydiméthylsiloxane (PDMS) en utilisant de nombreux polymères peu coûteux notamment le PLGA, le PVA, le PVP, les copolymères de poly (méthyl vinyl éther-co-anhydride maléique ou méthyl vinyl éther-co-acide maléique) commercialisés sous le nom GantrezTM et les dérivés de glucides (pullane, acide hyaluronique, carboxyméthylcellulose, maltose, tréhalose) (Guillot *et al.*, 2020; Indermun *et al.*, 2014; Ita, 2015; Jung and Jin, 2021; Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021). Cette technologie peut libérer des médicaments (Guillot *et al.*, 2020; Indermun *et al.*, 2014; Jung and Jin, 2021; Kim *et al.*, 2012; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021; Waghule *et al.*, 2019) :

- de faible poids moléculaire : sumatriptan (antimigraineux), vitamine B12, adénosine (antiarythmique), dutastéride (inhibiteurs de la 5-alpha réductase), rilpivirine (antirétroviral), albendazole (antiparasitaire antihelminthique) et chlorhydrate de sinoménine (phytothérapie pour les rhumatismes et l'arthrite).
- de poids moléculaire élevé : héparine de faible poids moléculaire (anticoagulant) chlorhydrate de vancomycine (antibiotique), insuline, bevacizumab (anticorps monoclonal, antinéoplasique), ovalbumine, albumine de sérum bovin, protéine

recombinante entérotoxine B staphylococcique, IgG, interféron- α -2b (immunothérapie), desmopressine (voir tableau 1.2), polymixin B (antibiotique), cyclosporine A (immunosuppresseur), érythropoïétine (stimule la production de globules rouges) et exendine-4 (diabète de type 2).

- à base de nanoparticules associées à la matrice polymérique comme les SLN et les microparticules de PLGA pour les molécules plus lipophiles, telles que la doxycycline (antibiotique), la diéthylcarbamazine (antiparasitaire anthelminthique) et l'albendazole (antiparasitaire anthelminthique).
- de type plasmide tel que le p2CMVmIL-12 codant pour l'interleukine-12 (cytokine).
- de type bactérie pour la vaccination (ex : *P. aeruginosa* inactivé par la chaleur).

Cependant, ce type de système présente des inconvénients inhérents surtout : (i) au dépôt de polymères dans la peau, ce qui peut entraîner des effets indésirables (érythèmes, accumulation hépatique ou lymphatique) lors d'application répétée de polymères de haut poids moléculaire et (ii) aux quantités limitées de médicaments qui peuvent être encapsulées dans les aiguilles (Jung and Jin, 2021; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021; Waghule *et al.*, 2019).

Les microaiguilles formant un hydrogel

Les microaiguilles formant un hydrogel constituent la technologie la plus récente. Elles ont été inventées par Donnelly *et al.* en 2007 (Ramadon *et al.*, 2021). Ce système repose sur des polymères super-gonflants capables d'absorber le liquide interstitiel après insertion dans la peau (approche « Poke and release »). Un réservoir contenant le médicament, non mélangé au polymère, se dissout lorsque le polymère gonfle, et permet aux molécules de médicament de diffuser à travers les conduits formés par les microaiguilles. Il existe différents types de réservoir communément retrouvés dans la littérature, tels que : (i) les films oraux (exemples d'excipients : PVA, PVP, glycérol), (ii) les comprimés lyophilisés (exemples d'excipients : mannitol, gélatine, NaCl, sucrose) se dissolvant rapidement, (iii) les solvants organiques solubles dans l'eau en tant que co-solvants pour les substances actives lipophiles (exemples d'excipients : PEG₄₀₀, propylène glycol, méthanol) et (iv) les comprimés compressés (exemples d'excipients : D-sorbitol) (Ita, 2015; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadon *et al.*, 2021; Turner *et al.*, 2021).

Ces microaiguilles sont fabriquées généralement selon les mêmes procédés que ceux utilisés pour les microaiguilles se dissolvant dans la peau, mais avec divers polymères réticulés, tels que le PEG / GantrezTM, la gélatine / PVA ou encore le diméthacrylate d'éthylène glycol réticulé avec du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (EGDMA, *ethylene glycol dimethacrylate* / HEMA, *2-hydroxyethyl methacrylate*) (Ita, 2015; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021; Turner *et al.*, 2021). Diverses molécules et macromolécules ont été étudiées à la fois au cours d'études *in vitro* et *in vivo* (modèle : rat ou souris seulement pour l'ovalbumine) *via* ce type de microaiguilles pour améliorer l'absorption transdermique de médicaments comme l'ovalbumine, le bevacizumab, le donépézil et le chlorhydrate de metformine (Guillot *et al.*, 2020; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021; Turner *et al.*, 2021). Ce système présente par ailleurs de nombreux avantages face aux autres types de microaiguilles comme : (i) leur production dans une large gamme de taille et de géométrie au niveau des aiguilles qui peuvent facilement être stérilisées, (ii) la libération de médicaments qui ne possèdent pas forcément une grande puissance, car il est possible de charger de fortes doses de médicament dans le réservoir et (iii) le retrait des microaiguilles après insertion ne produisant pas de déchets tranchants et de dépôt de polymère dans les tissus cutanés (Guillot *et al.*, 2020; Ita, 2015; Kirkby *et al.*, 2020; Ramadan *et al.*, 2021; Turner *et al.*, 2021).

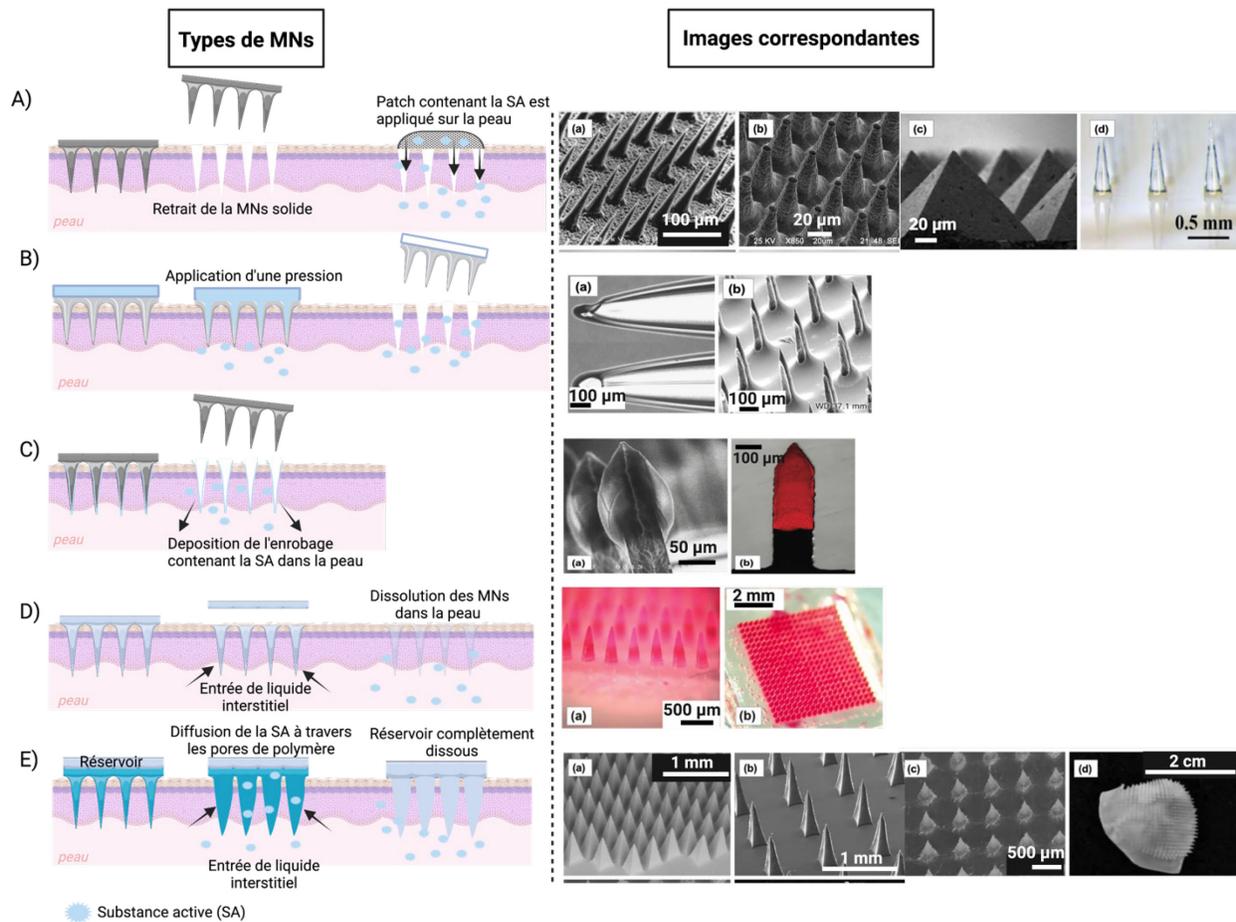


Figure 1.10 Administration de substances actives par divers types de microaiguilles. Méthodes d'administration de médicaments à l'aide de divers types microaiguilles sur la peau (panel de gauche) : A) solides, B) creuses, C) enrobées, D) se dissolvant dans la peau et E) formant un hydrogel. Exemples d'images correspondantes de microaiguilles (panel de droite) fabriquées en : Aa) silicium, Ab) tungtène, Ac) sulfate de calcium dihydraté, Ad) acide polylactique, Ba) et Bc) verre, Ca) titane enrobées de desmopressine, Cb) acier inoxydable enrobées d'ADN, Da) et Db) PVP, Ea) GantrezTM réticulé par du PEG, Eb) PVA réticulé par la gélatine, Ec) EGDMA réticulé par HEMA et Ed) GantrezTM réticulé par du PEG après administration. Les types de microaiguilles et les images correspondantes ont été adaptés de (Ramadon *et al.*, 2021). PVP, polyvinylpyrrolidone; PVA, acide polyvinylique; EGDMA, diméthylacrylate d'éthylène glycol; HEMA, méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. Cette figure a été créée avec BioRender.com.

1.2.1.2.3. Les modèles d'études *in vitro* et *in vivo* pour les tests de performance

L'évaluation de l'efficacité des dispositifs médicaux à pénétrer et à libérer une substance active est une étape essentielle pour optimiser la perméabilité d'une substance active et minimiser la quantité résiduelle de médicaments post-application. La performance du système transdermique peut être évaluée par divers modèles allant des méthodes officinales aux méthodes utilisant les cellules de diffusion verticale de Franz (Figure 1.11).

Les méthodes officinales comprennent les appareils des tests de dissolution : (i) appareil à disque (USP 5 / Ph. Eur 2.9.4.1), (ii) appareil à cylindre (USP 6 / Ph. Eur 2.9.4.3), (iii) appareil à mouvement alternatif (appareil USP 7) et (iii) une variation de l'appareil USP 5 avec une extraction cellulaire (Ph. Eur 2.9.4.2). La méthode de la palette disque avec un assemblage de disque en acier inoxydable (disque non flottant, exposé au milieu de dissolution) est la méthode la plus largement utilisée, car elle est simple et facile à reproduire par rapport aux autres appareils plus complexes (Brown *et al.*, 2015). Le milieu doit idéalement refléter les conditions physiologiques de la peau (pH de 5-6 et température de 32 °C) et est souvent composé de mélanges aqueux standard avec ou sans tensioactifs (ex : tampon phosphate salin (PBS, *phosphate-buffered saline*) avec de l'albumine de sérum bovin) mais aussi de mélanges aqueux-organiques. Ces mélanges contenant de l'alcool ou un tensioactif sont dépendants de la quantité et des propriétés physicochimiques de la substance active afin de préserver les conditions sink (Ruela, 2016).

Dans le cas de test de libération ou de dissolution *in vitro* de la substance active, la configuration expérimentale (milieu de dissolution, type et vitesse d'agitation, température, humidité) ainsi que la peau (type, état) ou la membrane synthétique utilisée vont influencer la perméabilité cutanée de médicament (Neupane *et al.*, 2020; Ruela, 2016).

Un autre type de méthodologie utilisé pour la libération *in vitro* de substances actives préalablement validée et basée sur les directives de la FDA pour l'industrie (SUPAC-SS: formes posologiques semi-solides non stériles) est le système de la cellule de diffusion à chambre ouverte (cellule de Franz). Ce système peut utiliser soit une membrane synthétique (poreuses inertes ou en silicone) ou de la peau (humaine ou animale). La diffusion du médicament en conditions statiques ou en flux à travers la membrane se fait à partir du produit dans la chambre du donneur vers le

milieu de la cellule réceptrice. Ce système permet la préservation du produit et du milieu récepteur qui se retrouve séparé. Le profil de libération d'une substance active peut être déterminé à différents temps par dosage lors de prélèvement séquentiel au niveau du milieu récepteur. Ces derniers peuvent être analysés par différentes méthodes analytiques et notamment la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC, *high performance liquid chromatography*) avec un détecteur ultraviolet / visible ou en association avec la spectrométrie de masse (MS, *mass spectrometry*) (Brown *et al.*, 2015).

Les molécules diffusent à travers la peau en conséquence d'une force thermodynamique apportée par le gradient de concentration. Mais, cette variable est souvent utilisée comme approximation, compte tenu du fait que, l'activité thermodynamique de la molécule est aussi impliquée dans la force motrice pour la diffusion. Cette activité thermodynamique peut être simplement décrite comme une mesure de la tendance d'échappement des molécules envers leur solvant. Donc, une solution saturée en principe actif a une activité thermodynamique de maximale de 1 puisque toutes autres molécules additionnelles généreront un solide. Ceci permettra l'obtention d'un flux de concentration maximum lorsque la plus grande activité thermodynamique dans le véhicule est atteinte et lorsque le coefficient d'activité effectif de la substance active dans la membrane est faible. L'activité thermodynamique du médicament influencé par ses propriétés physicochimiques tels que sa solubilité, ses interactions excipients-médicaments et son coefficient de partage, est donc un facteur clé pour prédire la performance du système utilisé. Le plus souvent, ce paramètre est déterminé par l'utilisation d'une membrane synthétique pour son faible coût, sa disponibilité et son homogénéité de structure facilitant la reproductibilité des résultats. Ces membranes synthétiques peuvent être constituées de silicone, de polycarbonate, de cellulose ou ses polymères en combinaison (Neupane *et al.*, 2020). Les formulations sont par la suite adaptées en conséquence pour leur éventuelle application en préclinique puis clinique. Dans certaines études, les films de polymères comme la Parafilm® M (composée essentiellement de polyoléfinés et de cire de paraffine), la gélatine (en association avec le PDMS) et l'agarose ont par ailleurs été utilisées pour analyser la profondeur d'insertion des microaiguilles *in vitro*. Les propriétés mécaniques modulables (pores, élasticité) et la transparence des gels en font un modèle qui peut s'adapter pour imiter la peau humaine tout en visualisant directement la profondeur d'insertion des aiguilles (Makvandi *et al.*, 2021).

Au niveau de l'Organisation de Coopération et de Développement Économique, les modèles de peau sont préconisés, afin d'assurer une interprétation significative de la perméabilité des médicaments à partir d'une procédure d'essai validée, fiable et reproductible. Ces modèles d'études comprennent généralement un tissu excisé d'origine humaine, de souris ou de porc ou encore de modèles de peau artificiels pour étudier la perméation cutanée *ex vivo* des médicaments (Makvandi *et al.*, 2021; Ruela, 2016). Les modèles de peau artificiels comprennent des cultures cellulaires tridimensionnelles (3D) des principaux composants de la peau / épiderme humain reconstruit : les kératinocytes et / ou les fibroblastes qui peuvent être placés sur des gels de polymère comme le collagène ou sur des filtres de polycarbonate (ex : EpiSkin™, SkinEthic™, pour des modèles d'épiderme et EpiDerm™ Full Thickness, Labskin™, pour des modèles de peau) mais aussi dans des échafaudages d'ingénierie dans un gel 3D (ex : collagène). Cependant, ces cultures sont majoritairement utilisées pour des tests d'irritation et de cytotoxicité, car elles ont montré une plus forte perméation de substances actives comparées à de la peau humaine ou animale (Neupane *et al.*, 2020). Ceci peut être dû au fait que la peau n'est pas une barrière homogène et que chaque couche cutanée possède des propriétés physicochimiques (hydrophilie ou lipophilie des couches), une résistance électrique (intégrité de la barrière de la peau) et des propriétés mécaniques distinctes (anisotropie et viscoélasticité de la peau) (Makvandi *et al.*, 2021; Neupane *et al.*, 2020).

Les propriétés biomécaniques de la peau dépendent de nombreux facteurs, tels que l'épaisseur de la peau, l'âge, les pathologies affectant l'intégrité de son *stratum corneum*, les prédispositions génétiques de chaque individu et les facteurs environnementaux (contrainte force-déformation, température). Dépendamment de la contrainte appliquée, l'élastine, le collagène et la matrice extracellulaire vont être impliqués dans la réponse mécanique de la peau de par : (i) l'alignement des fibres de collagène (renforcement de la rigidité des tissus), (ii) l'interaction entre le collagène et de la matrice extracellulaire (comportement viscoélastique) et (iii) la réponse de l'élastine et la substance fondamentale à faible contrainte (comportement isotrope des tissus) (Makvandi *et al.*, 2021). De plus, l'intégrité de la peau est directement liée à l'impédance de la peau (Ruela, 2016). En effet, grâce à ses propriétés diélectriques provenant des lipides-protéines de l'épiderme et à sa résistance électrique issue de son *stratum corneum*, la peau est capable de s'opposer à un flux de courant alternatif. Plusieurs études ont donc montré la capacité des microaiguilles à diminuer l'impédance cutanée et donc à augmenter la perméabilité de la peau. À

cet effet, diverses techniques qui mesurent les variations du gradient de concentration en eau ont été utilisées par la mesure de la PIE, la spectroscopie infrarouge ou encore la spectroscopie d'impédance électrique (Curdy *et al.*, 2004; Gupta *et al.*, 2011; Jonathan Hadgraft *et al.*, 2015; Morin *et al.*, 2020). L'inclusion des propriétés biomécaniques de la peau lors du perçage des microaiguilles est donc importante pour améliorer la pénétration des substances actives libérées *via* ce système chez l'homme.

Les tissus excisés d'animaux ou humains (peau entière, membrane épidermique ou la peau dermatomée) sont par conséquent largement acceptés comme modèles pour étudier l'absorption de produits thérapeutiques. La peau humaine reste le modèle le plus approprié pour le passage en clinique des formulations développées, mais son utilisation reste limitée au niveau éthique et réglementaire (Makvandi *et al.*, 2021; Neupane *et al.*, 2020; Ruela, 2016). Malgré la variabilité des modèles animaux (structure, épaisseur, résistance à la perméabilité, activité enzymatique), ceux-ci sont utilisés comme alternative, notamment la peau de porc et de souris (Figure 1.11) (Makvandi *et al.*, 2021; Neupane *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2017). La peau de porc est histologiquement similaire à la peau humaine au niveau de sa structure (épaisseur du *stratum corneum*, épiderme, densité des follicules pileux, rapport collagène / élastine) (Makvandi *et al.*, 2021). Le cochon miniature (mini-pig) entre 3 et 6 mois a une épaisseur de peau au niveau du dos similaire à celle de l'homme adulte (Harvey and Danks, 2010), ce qui en fait un modèle idéal pour des études *in vivo* (biodistribution et pharmacocinétique). Cependant, la capacité d'insertion des microaiguilles dans certaines régions de peau de ces modèles diffère de la peau humaine (Makvandi *et al.*, 2021). De même, la corrélation des performances *in vitro-in vivo* sera dépendante des épaisseurs des deux modèles choisis. À cet égard, Garland *et al.* ont montré que le profil de perméation du bleu de méthylène (molécule modèle) après application de microaiguilles au travers de la peau de porc néonatale dermatomée (300-350 μm) était similaire au profil pharmacocinétique *in vivo* chez un modèle de rat après administration de ces mêmes microaiguilles (Garland *et al.*, 2012). Afin de visualiser la délivrance d'une sonde fluorescente dans la peau, des techniques qualitatives peuvent être utilisées comme généralement la microscopie confocale à balayage laser ou la tomographie par cohérence optique. Le dosage quantitatif de la substance active retenu dans la peau peut être réalisé après séparation par « tape-stripping » du *stratum corneum*, isolation des couches cutanées pour l'épiderme et le derme ou de la peau entière après une biopsie (Ruela, 2016).

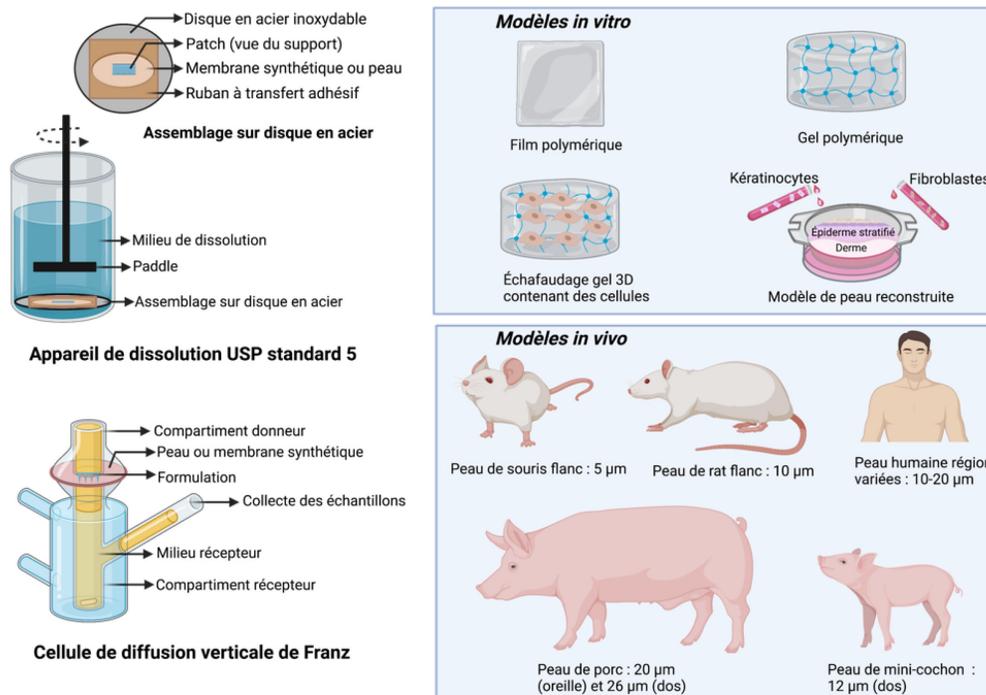


Figure 1.11 Méthodes et types de modèles utilisés pour les études *in vitro* / *in vivo* pour la voie cutanée. Représentation schématique de méthodes utilisées pour les études de libération / dissolution de médicaments *in vitro* (panel de gauche) et modèles *in vitro* / *in vivo* employés pour les études de pénétration / perméation de substance active après administration de microaiguilles. Cette figure a été créée avec BioRender.com.

1.2.1.2.4. Les paramètres influençant le mécanisme d'absorption des microaiguilles se dissolvant dans la peau

Lors de l'administration des microaiguilles, la rupture temporaire de la peau permet aux aiguilles de créer des pores pour la diffusion de substances actives dans l'épiderme et / ou la couche supérieure du derme afin qu'ils puissent atteindre leur site d'action. Pendant cette période d'application, il est essentiel que les pores restent ouverts et se referment post-application. Ceci afin d'éviter des infections potentielles à cause de l'infiltration de microorganismes. En vue de la commercialisation de la technologie des microaiguilles, les études *in vivo* et clinique confirment ce point, à savoir qu'une fois percée, la peau se referme rapidement ne montrant aucun signe d'infection systémique (Makvandi *et al.*, 2021). Après insertion des polymères solubles, ceux-ci sont dissous par transport du liquide interstitiel de la pointe vers le support des microaiguilles (Lee

et al., 2008). L'absorption percutanée de chaque substance active administrée par ce système sera donc influencée par divers paramètres tels que l'insertion des microaiguilles dans la peau et la vitesse de dissolution de la matrice de polymère.

La géométrie des aiguilles

L'élasticité de la peau est un facteur à prendre en compte pour une pénétration adéquate des microaiguilles. En conséquence, la géométrie du réseau d'aiguilles doit être adaptée pour favoriser une insertion efficace et indolore en ajustant l'espacement entre les aiguilles, la forme, la hauteur ainsi que le diamètre à la fois à la base et à la pointe de l'aiguille. Ainsi, les réseaux de microaiguilles sont soumis à l'effet « *bed of nails* » au cours duquel la force appliquée sur chaque aiguille est répartie sur tout le réseau de microaiguilles. Ce phénomène se produit par ailleurs lors de l'augmentation de la densité des aiguilles, ce qui entraîne l'incapacité de toutes les aiguilles à vaincre l'élasticité de l'épiderme et à percer la peau. De plus, certains critères comme la diminution du rayon de la pointe des aiguilles (diminution de l'angle de contact) et la forme de la pointe de l'aiguille triangulaire > carrée > hexagonale ont montré améliorer la capacité d'insertion des microaiguilles (Makvandi *et al.*, 2021).

Li *et al.* ont par exemple étudié l'effet de la géométrie des microaiguilles sur leurs capacités d'insertion et de dissolution pour administrer l'ovalbumine. Ils ont rapporté qu'une diminution de l'angle au sommet des aiguilles ainsi qu'une augmentation de la taille des microaiguilles et du ratio hauteur / base (ratio d'aspect) des aiguilles entraînaient une plus grande délivrance d'ovalbumine affectant ainsi la réponse immunitaire chez le rat. Toutefois, bien que les aiguilles avec un rapport d'aspect plus élevé sont plus faciles à insérer, un rapport d'aspect inférieur génère des aiguilles mécaniquement plus résistantes. La forme conique des microaiguilles s'est également avérée avoir le temps de dissolution le plus rapide face aux formes cône-cylindre, pyramide / rectangulaire, pyramide / hexagonale (Li *et al.*, 2020).

Récemment, une étude de modélisation informatique sur des microaiguilles hydrosolubles a été réalisée en simulant le processus de dissolution des pointes des aiguilles dans un milieu poreux. Les conclusions de l'étude ont permis de proposer une nouvelle structure de microaiguilles possédant un réseau de convexités hémisphériques nommées « *array in array* » qui ont permis d'augmenter le flux de médicament et sa concentration finale dans les tissus. De plus, la diminution

de la distance entre les centres de microaiguilles adjacentes (« pitch size ») et l'augmentation de la hauteur des aiguilles ont permis d'augmenter la libération de la substance active dans les tissus en utilisant un modèle de microaiguilles coniques simples se dissolvant dans la peau (Kim *et al.*, 2015; Zoudani and Soltani, 2020). Cependant bien que diminuer la « pitch size » est bénéfique pour la libération de substance active, les microaiguilles ne doivent pas être trop rapprochées pour éviter l'effet « bed of nails » (Zoudani and Soltani, 2020). Par conséquent, un juste équilibre doit être trouvé entre la capacité d'insertion des microaiguilles et l'efficacité de perméation de la substance active.

Le type de polymères

La dissolution rapide des polymères hydrosolubles permet la libération rapide des médicaments (de type bolus). Toutefois, une étude a montré qu'en ajoutant une sonde fluorescente modèle, la sulforhodamine B, dans la couche de support et dans les pointes de microaiguilles pyramidales de carboxyméthylcellulose, une administration sous forme prolongée était obtenue. De plus, la cinétique de libération de la substance active peut être prolongée de plusieurs heures à plusieurs jours en utilisant un polymère se dissolvant plus lentement comme l'amylopectine ou en augmentant la concentration en polymère (Lee *et al.*, 2008).

Généralement, les polysaccharides hydrosolubles (ex : carboxyméthylcellulose, hydroxypropylméthylcellulose, acide hyaluronique, dextrane, alginate de sodium) sont utilisés pour la fabrication de microaiguilles solubles. Leurs groupements hydrophiles abondants ainsi que leurs ramifications leur confèrent une excellente solubilité dans l'eau (Wang *et al.*, 2017). Néanmoins, les polymères demeurent moins résistants au niveau thermique et mécanique que les métaux avec des valeurs plus faibles de module de Young (ou module élastique), de force (résistance à la déformation, formation de fissure) et de dureté (résistance à la rupture sous déformation) et (Makvandi *et al.*, 2021).

Outre les polysaccharides, la gélatine, le PVP et le GantrezTM sont aussi hydrosolubles et utilisés pour améliorer les performances mécaniques de ce type de microaiguilles (Wang *et al.*, 2017). La nature et la concentration des polymères seuls ou en association peuvent être ajustées pour augmenter la résistance mécanique des microaiguilles ainsi produites pour une application clinique spécifique (Makvandi *et al.*, 2021). Les cinétiques de dissolution peuvent être également

prolongées de quelques heures en ajoutant des polymères moins hydrosolubles (ex : PVA) ou en faisant varier le rapport massique entre polymères de différentes solubilités (Wang *et al.*, 2017).

Le remplissage en médicament

La concentration en substance active peut également influencer la vitesse de dissolution du polymère et donc la cinétique de libération de la substance active. En effet, Zoudani *et al.* ont montré que la dissolution s'accélère quand la concentration en macromolécules hydrophiles (isothiocyanate-dextrane de fluorescéine, sonde fluorescente) encapsulées dans les microaiguilles de PVP augmente, à l'aide d'une simulation numérique en milieu poreux (Zoudani and Soltani, 2020). De plus, Quinn *et al.* ont constaté que l'efficacité du système d'administration était fortement diminuée par l'ajout de médicaments hydrophobes (atorvastatine calcique trihydratée, ~4 % libéré) en raison de leur mauvaise dissolution dans les microaiguilles de polymère hydrophile (GantrezTM) face à l'encapsulation de médicaments plus hydrophiles (aspirine et lisinopril dihydraté, ~70 et 30 % libérés, respectivement) (Quinn *et al.*, 2015). Mais, il est important de noter que la résistance des microaiguilles peut être affaiblie par l'incorporation de médicament en son sein. Pour remédier à ce problème, une étude a révélé que l'incorporation de nanoparticules d'hydroxydes doubles lamellaires à faible concentration (5 % en m/m) dans une matrice de carboxyméthylcellulose a permis d'augmenter significativement la résistance mécanique (module élastique, dureté) des microaiguilles sans affecter la vitesse de dissolution de celles-ci (Yan *et al.*, 2014).

1.2.1.2.5. Les différentes applications pour l'administration transdermique de peptides

Les applications des microaiguilles se sont élargies suite aux améliorations des techniques de fabrication et de l'encapsulation de substances actives au sein des systèmes. Les applications récentes de microaiguilles incluent : i) l'amélioration de la délivrance de protéines ou de peptides de haut poids moléculaire, (ii) la libération de doses élevées pour des substances actives qui ne possèdent pas une grande puissance et (iii) une stabilité accrue face à des formulations liquides injectables.

Au niveau de la livraison de peptides, les microaiguilles ont été utilisées en cosmétologie pour lutter contre le vieillissement prématuré de la peau afin d'augmenter leur efficacité face aux

formulations de crèmes conventionnelles et leur tolérance. Au niveau pharmaceutique, l'emploi de microaiguilles pour l'administration de peptides a été testé pour surmonter les inconvénients de certaines voies comme la voie orale, nasale ou parentérale pour le traitement de nombreuses pathologies au niveau local ou systémique (diabète, énurésie, hémophilie A, neuropathies périphériques (douleur)). Ces microaiguilles sont par ailleurs attrayantes pour les pathologies cutanées (psoriasis, cicatrices chéloïdes) en raison de leur possibilité de libérer des peptides hydrophiles ou lipophiles localement au long terme, réduisant ainsi la toxicité systémique. Ces microaiguilles quasi exclusivement préparées à base de polymère et en majorité se dissolvant dans la peau sont répertoriées dans le tableau 1.2.

Tableau 1.2 Exemple de systèmes transdermiques formés de timbres de microaiguilles étudiés pour la délivrance de peptides

Type de microaiguilles	Peptide(s) encapsulé(s)	Modèles de peau études <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Indication thérapeutique	Conclusions générales de l'étude	Références
Macroflux®	Desmopressine	<i>In vitro</i> & <i>in vivo</i> Cochon d'Inde glabre (HGP)	– Diabète insipide – Énurésie – Hémophilie A	Les microaiguilles à faible enrobage de desmopressine (dose cible 20 µg) ont montré une administration de médicament optimale (biodisponibilité de 85 %, SEM 30 %). Diminution de l'efficacité d'administration en augmentant la dose à cause de la viscosité de la solution. Absence de dépôt cutané, administration rapide (Tmax de 60 min).	(Cormier <i>et al.</i> , 2004)
Microaiguilles se dissolvant dans la peau	Cyclosporine A	– <i>In vitro</i> peau de porc – <i>In vivo</i> rats (– Sprague-Dawley)	Psoriasis	Augmentation de l'effet réservoir de la peau et lente absorption de la cyclosporine A par rapport à la même dose administrée par voie orale (AUC et Tmax augmentés de 2.7 et 4 fois respectivement, dose cible de 441.18 µg / kg). Ceci est dû aux propriétés hydrophobes et au poids moléculaire élevé de la cyclosporine A non solubilisé dans son véhicule.	(Jeong <i>et al.</i> , 2018)
Microaiguilles formant un hydrogel	GAP-26	Modèle de chéloïde <i>ex vivo</i> sur peau entière humaine	Cicatrices chéloïdes	Modulation des pores pour l'encapsulation de Gap-26 en modifiant le temps de réticulation par UV. Les microaiguilles encapsulant le GAP-26 étaient efficaces à inhiber l'expression de collagène (double application sur 4 semaines, dose de 125 µg).	(Liu <i>et al.</i> , 2017)
Microaiguilles se dissolvant dans la peau	Exendine-4	<i>In vivo</i> rats diabétiques GK / Slc	Diabète de type 2	Diminution du temps de la fermeture des pores après application de microaiguilles comparé à une injection SC (disparition à 24 h pour les microaiguilles). Suppression dose dépendante des niveaux de glucose sanguin lors de tests de tolérance au glucose intrapéritonéal comparable à une injection SC (profils PK similaires).	(Liu <i>et al.</i> , 2016)
Microaiguilles enrobées de médicament	Peptide-A	<i>In vivo</i> cochon miniature (Yucatan & Yorkshire)	N/A	Biodisponibilité absolue similaire pour l'administration de peptide-A à partir de microaiguilles ou en SC (88 % et 74 % pour les microaiguilles enrobées 1 (sans HPBCD) et 2 (avec HPBCD) contre 75% en SC, dose cible : 300 µg). La région	(Kapoor <i>et al.</i> , 2019)

				d'administration a une influence sur l'efficacité de libération du peptide (région du flanc). Augmentation significative de la stabilité du peptide-A dans les microaiguilles par rapport à une formulation liquide injectée en SC.	
Microaiguilles se dissolvant dans la peau	CGRP8-37	-Modèle <i>In vivo</i> de douleur neuropathique chez le rat (Sprague-Dawley) -Souris (C57BL/6)	Douleurs dans le cas de neuropathies périphériques	Effets analgésiques du CGRP-8 (sélectif, préférentiellement anti-hyperalgésie) administré par microaiguilles (dose cible : 1,4 µg) contre la douleur aussi efficaces qu'une injection SC de lidocaïne (dose clinique) et supérieurs à un traitement IP de gabapentine (100 g / kg).	(Xie <i>et al.</i> , 2017)
Microaiguilles se dissolvant dans la peau	- Polypeptide d'arginine / lysine - Acétyl octapeptide-3 - Palmitoyl tripeptide-5	Étude clinique : Femmes européennes en santé	Vieillessement de la peau	Cicatrisation rapide (2-6 h) après traitement par microaiguilles de peptides associés à l'adénosine et à des extraits d'algues. Augmentation de l'hydratation de la peau avec l'acide hyaluronique. Les sujets ont montré une réduction globale de la profondeur des rides de 26 % et une augmentation globale de l'épaisseur de la peau (épiderme et derme ~ 5,9%).	(Avcil <i>et al.</i> , 2020)
Microaiguilles enrobées de médicament	- BDC2.5 - EBVP1 - Pro-insuline B9-23 - WE14 - m31	Modèle <i>in vivo</i> de diabète de type 1 (souris NOD transgéniques) <i>Ex vivo</i> peau humaine ou de souris NOD	Diabète de type 1	Rétention prolongée des peptides hydrophobes dans la peau suite à l'administration de peptides par microaiguilles et meilleure présentation de l'antigène par rapport à l'administration intradermique de peptides aux mêmes doses. Diminution significative de la prolifération des lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques pancréatiques lors de l'administration à faible dose de WE14 (2 doses séparées de 3 semaines) par microaiguilles seulement. L'administration de microaiguilles et l'efficacité de traitement n'ont pas été affectées suite à l'hydratation de la peau ou une thérapie stéroïdienne topique (crème de bétaméthasone). Amélioration de l'efficacité d'administration par microaiguilles suite au polissage électrolytique et lors d'un revêtement plus fin.	(Zhao <i>et al.</i> , 2016; Zhao <i>et al.</i> , 2017)

*CGRP : Calcitonin gene-related peptide, HPBCD: (2-hydroxy)propyl- β-cyclodextrin, BDC2.5 : peptide mimotope, EBVP1: Epstein – Barr virus peptide, WE14: peptide de chromogranine A, m31: peptide mimotope, CRRP8-37 : peptides antagonistes des récepteurs CGRP, SC : administration sous-cutanée, IP: administration intrapéritonéale, PK : pharmacocinétique, NOD : non-obese diabetic.

1.2.2. Les défis des systèmes d'administration par voies transdermique et parentérale

1.2.2.1. Les avantages et inconvénients des systèmes administrables par voies transdermique et parentérale : le cas des microaiguilles et des implants se formant *in situ*

Au cours des dernières décennies, de nouveaux systèmes administrables par voies transdermique et parentérale ont été développés en raison de la possibilité de s'affranchir du *stratum corneum* et de contrôler la diffusion des substances actives, améliorant ainsi leur biodisponibilité. Ce contrôle est directement lié à la modulation des propriétés physicochimiques et / ou mécaniques de ces systèmes. De plus, ces nouvelles stratégies ont permis d'améliorer l'observance thérapeutique chez les patients en proposant des systèmes auto-administrables et minimalement invasifs (microaiguilles) ou en permettant de libérer la substance active sur des périodes prolongées allant de quelques semaines à plusieurs mois (implant se formant *in situ*). Une comparaison entre les différents avantages et inconvénients de ces systèmes est présentée dans le tableau 1.3.

Tableau 1.3 Avantages et inconvénients des systèmes d'administration par microaiguilles et des implants se formant *in situ*

Type de système	Avantages	Inconvénients	Références
Microaiguilles	<ul style="list-style-type: none"> Administration indolore, peu ou pas invasive Auto-administration, facile d'application Évite le métabolisme de premier passage hépatique Administration de petites molécules hydrophiles ou hydrophobes et macromolécules à dose plus élevée Réduction de la fréquence d'administration si libération prolongée Fermeture de la peau rapide comparée aux systèmes à injection parentérale diminuant l'infiltration de microbes Diminution des effets secondaires grâce à la libération contrôlée (prolongée/instantanée) et / ou le ciblage cutané Bonne tolérance cutanée générale sans œdèmes ou érythèmes à long terme <p>Cas particulier des microaiguilles se dissolvant dans la peau :</p> <ul style="list-style-type: none"> Fabrication peu coûteuse, facile et production à température ambiante Profil de libération contrôlée de la substance active basé sur le mécanisme de dissolution du polymère Application en une étape Évite l'élimination des objets tranchants générés par les microaiguilles solides 	<ul style="list-style-type: none"> Cassure des microaiguilles dans la peau, ce qui peut induire des réponses inflammatoires à cause de résidus de matériaux non-biocompatibles Élasticité de la peau s'oppose à l'insertion des microaiguilles Administration répétée peut conduire à des réactions immunologiques Occlusion des sites post-administration de microaiguilles entraîne un ralentissement de la fermeture de la peau pouvant aller de quelques heures à plusieurs heures Propriétés biomécaniques de la peau dépendantes de l'épaisseur de la peau, l'âge, les maladies, les prédispositions génétiques et les facteurs environnementaux (ex : hydratation) et pouvant faire varier la pénétration des aiguilles et l'absorption de substance active <p>Cas particulier des microaiguilles se dissolvant dans la peau :</p> <ul style="list-style-type: none"> Faible résistance mécanique (déformation, rupture, dureté, module élastique) Limitation au niveau de la dose encapsulée et par conséquent libérée dans la peau Déposition de polymères dans la peau, ce qui peut induire des érythèmes ou une accumulation hépatique / lymphatique 	(Ita, 2015; Jung and Jin, 2021; Kirkby <i>et al.</i> , 2020; Makvandi <i>et al.</i> , 2021; Ramadon <i>et al.</i> , 2021)
Implants se formant <i>in situ</i>	<ul style="list-style-type: none"> Fabrication simple, facilement stérilisable, économique et en une seule étape Moins invasif et douloureux que les implants solides, les systèmes oléagineux (sauf système organogel) et les microsphères parentérales 	<ul style="list-style-type: none"> Effet de libération en rafale initial « <i>burst effect</i> » pendant la solidification de l'implant (transition sol-gel) 	(Kanwar and Sinha, 2019; Kempe and Mäder, 2012)

	<ul style="list-style-type: none"> • Amélioration de l'observance thérapeutique par réduction de la fréquence d'administration • Réduction des effets secondaires par diminution de la dose et libération prolongée et / ou au site spécifique (effet local) • Pas d'intervention chirurgicale requise pour le retrait de l'implant (aspect biodégradable) • Solubilisation de substances actives hydrophiles, hydrophobes (systèmes organogel et implants <i>in situ</i> formés par inversion de phase), macromolécules, médicaments labiles • Stabilité augmentée en phase liquide par l'utilisation de peu d'excipients par rapport à d'autres systèmes à libération contrôlée (ex : injection de microparticules <i>in situ</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxicité potentielle en cas de monomères n'ayant pas réagi (système photo-induit), agents de réticulation (système chimiquement réticulé) • Problème d'injectabilité (solution / suspension oléagineuse et / ou polymérique) • Inconsistance de la forme formée, qui peut être due à la vitesse d'injection et qui entraîne une libération irrégulière du médicament • Stabilité mécanique faible du gel (systèmes de gélification induite par le pH et réticulation physique) • Pureté et stabilité des huiles et des cires (système organogel) • Modification potentielle du médicament (systèmes photo-initiés et chimiquement réticulés) • Biocompatibilité des polymères et produits de dégradation <p>Cas particulier des implants <i>in situ</i> formés par inversion de phase :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Toxicité potentielle due aux solvants organiques employés • « <i>Burst effect</i> » élevé • Stabilité altérée pour certains polymères à des températures élevées et en présence d'eau • Instabilité de certaines substances actives dans les solvants organiques 	
--	---	--	--

1.2.2.2. Applications, études cliniques et commercialisation

Ces dernières années, les systèmes administrés par voies transdermique et parentérale se sont centrés particulièrement sur les implants *in situ* formés par inversion de phase (disponibles dans le commerce) et les systèmes de microaiguilles (présentement en essais cliniques) (tableau 1.4). Malgré que le marché de l'administration par la voie cutanée soit en croissance constante, ces nouveaux systèmes doivent faire face à de nombreux défis pour atteindre leur plein potentiel et / ou leur future commercialisation (microaiguilles). Les principaux questionnements réglementaires qui doivent être adressés pour leur établissement en tant que système d'administration à part entière sont les suivants (Kanwar and Sinha, 2019; Kirkby *et al.*, 2020) :

1. **Compliance / adhérence (participation active) au traitement par les patients.** L'atteinte des résultats souhaités suite à la prise du traitement médical fait partie intégrante des objectifs de la gestion des pathologies. Dans le cas de microaiguilles, *l'auto-administration* par le patient doit être optimale (facile, sans douleur, application / insertion correcte) et standardisée afin d'éviter les variations de dose administrée. Bien que l'injection des implants se formant *in situ* est plus douloureuse, la viscosité doit être la plus faible possible pour assurer une bonne *injectabilité* et augmenter leur acceptabilité par les patients.
2. **Aspects de fabrication.** Les procédés de laboratoire sont quelquefois difficiles à être appliqués à une *fabrication à l'échelle industrielle* et posent des problèmes liés à la rentabilité de fabrication en série et des délais d'exécution (selon les lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication, d'assurance et de contrôle qualité). Les étapes de fabrication doivent donc être simples et courtes, idéalement sans utiliser de haute température, ni de solvants organiques pour solubiliser la substance active. *L'uniformité de contenu* doit être respectée avant injection des systèmes dans leur ensemble ou au niveau de régions spécifiques (ex : par aiguille). La *stérilisation* de la forme galénique peut être requise pour les microaiguilles pour éviter une éventuelle contamination microbienne. Néanmoins, celle-ci peut être non requise en cas de faible charge biologique avec un système possédant une activité antimicrobienne intrinsèque et prouvée. Finalement, pour

assurer *la stabilité* du système, le maintien de la chaîne de froid pour les excipients ou la substance active sensible à la température peut être indispensable.

3. **Profil d'innocuité à long terme.** Afin de diminuer l'apparition de potentielles réactions inflammatoires lors d'application unique ou multiples, l'utilisation *d'excipients biodégradables et biocompatibles* doit être favorisée à faible concentration. De plus, cela pourrait potentiellement être atténué en changeant le site d'application. Pour les implants se formant *in situ*, l'effet de « *burst release* » doit être contrôlé surtout dans le cas de substances actives possédant des fenêtres thérapeutiques étroites.
4. **Élimination sécuritaire des objets tranchants.** Pour les aiguilles et les microaiguilles non solubles ou biodégradables, les aspects environnementaux d'élimination de ces dispositifs doivent être pris en compte, et ceci de manière sécuritaire, car ils peuvent être réinsérés.

Tableau 1.4 Implants *in situ* formés par inversion de phase et timbre de microaiguilles commercialisés ou en développement clinique (de phase II ou supérieure pour les microaiguilles)

Type de système d'administration	Nom du produit / Composition	Substance active	Indication thérapeutique	Administration	Compagnie / Sponsor	Statut
Implants <i>in situ</i> formés par inversion de phase	Eligard® / technologie Atrigel®, seringue A : PLGA dans NMP et seringue B : médicament en poudre, reconstitué avant injection	Acétate de leuprolide	Cancer de la prostate avancé	SC ou IM	Sanofi Aventis	Commercialisé
	Atridox® (technologie Atrigel®)	Hyclate de doxycycline	Maladie parodontale chez l'adulte	Locale dans la poche parodontale	Tolmar	Commercialisé
	Sublocade™ (technologie Atrigel®)	Buprénorphine	Dépendance modérée à sévère aux opioïdes	SC	Individior Inc.	Commercialisé
	Perseris® (technologie Atrigel®)	Risperidone	Schizophrénie et trouble bipolaire	SC	HLS Therapeutics	Commercialisé
	Atrisorb D® / PDLLA dans NMP	Hyclate de doxycycline	Maladie parodontale / Barrière bioabsorbable pour la régénération tissulaire guidée	Locale dans la poche parodontale	Atrix Laboratories Inc.	Commercialisé
	Posimir™ (SABER™ technology) / SAIB dans alcool benzylique	Bupivacaïne	Douleur postopératoire	Sur le site chirurgical avant la fermeture de la plaie	Durect	Approuvé par la FDA (02/2021)
	Relday™ (SABER™ technology), / SAIB, PLA dans éthanol	Rispéridone	Schizophrénie et trouble bipolaire	SC	Durect	Phase I NCT02411526**
Implant <i>in situ</i> thermiquement induit	Oncogel® (ReGel® technology), polymère tribloc PLGA-PEG-PLGA dans l'eau	Paclitaxel	Thérapie anticancéreuse	Injection intratumorale	BTG International	Phase clinique II arrêtée. Aucun effet sur la réponse globale de la tumeur NCT00573131**

Microaiguilles creuses	Verre borosilicaté	Insulin Lispro	Diabète de type I	Abdomen du patient	Emory University	Phase 2 Phase 3 NCT00837512**
Microaiguilles enrobées de médicament / Macroflux®	C213 ou M207 / Microprojections de Titanium		Maux de tête sévère		Zosano Pharma Corporation	Phase 2 NCT04066023**
		Zolmitriptan	Migraine	Haut du bras		Phase 3 NCT03282227**
		Teriparatide	Ostéoporose	Abdomen du patient		Phase 2 / complété NCT00489918**
Microaiguilles creuses	Verre borosilicaté	Acétonide de triamcinolone (Triesence®)	Uvéite, uvéite intermédiaire, uvéite postérieure, panuvéite, uvéite non infectieuse	Espace suprachoroïdien	Clearside Biomedical, Inc.	Phase 1 Phase 2 CT01789320**
Soluvia™	Intanza® / dispositif de microinjection une aiguille de 1,5 mm de calibre 30	Virus de la grippe (inactivé, fractionné)	Grippe saisonnière	De préférence le muscle du haut du bras	Assistance Publique - Hôpitaux de Paris	Phase 1 Phase 2 NCT01707602**
Microaiguilles enrobées de médicament / sMTS	microaiguilles solides	Abaloparatide	Ostéoporose postménopausique	Cuisse	Radius Health, Inc.	Phase 3 NCT04064411**
Microaiguilles creuses / MicroJet 600	Quatre aiguilles creuses en silicone	Dose fractionnée du vaccin antipoliomyélitique inactivé	Poliomyélite	Haut du bras	Centers for Disease Control and Prevention	Phase 3 NCT01813604**
		Dose de rappel du vaccin antipoliomyélitique inactivé			Eastern Virginia Medical School	Phase 2 NCT01686503**
Microaiguilles se dissolvant dans la peau	Saccharose, thréonine et carboxyméthylcellulose	Vaccin contre la rougeole et la rubéole	Rougeole et la rubéole	Haut du bras	Micron Biomedical, Inc	Phase 1 Phase 2 NCT04394689**
Microaiguilles creuses / MicroJet 600	Quatre aiguilles creuses en silicone	Adalimumab	Arthrite rhumatoïde	Estomac ou haut de cuisse	Centre for Human Drug Research	Phase 1 Phase 2 NCT03607903**

*PDLLA : poly(D,L-lactic acid), NMP : N-méthyl-2-pyrrolidone, PLGA : poly(lactic-co-glycolic acid), SAIB: sucrose acetate isobutyrate, SC : injection sous-cutanée et IM: injection intramusculaire, sMTS : solid microstructured transdermal system, ** Identifiant Clinicaltrials.go

Chapitre 2 : HYPOTHÈSES, OBJECTIFS DE RECHERCHE ET MÉTHODOLOGIE

Les implants *in situ* formés par inversion de phase et les systèmes d'administration par microaiguilles ont fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières décennies. Ces recherches sont axées particulièrement pour l'encapsulation de substances actives hydrophobes, pour augmenter la perméabilité de la peau à un grand nombre de médicaments / produits de biothérapeutiques et surtout pour contrôler l'absorption de substance active à travers la peau pour atteindre une libération prolongée ou instantanée. Cependant, la conception de tels systèmes nécessite une bonne connaissance des paramètres de formulation selon les molécules modèles choisies pour permettre leur perméation dans la peau et leur application thérapeutique ciblée. À l'heure actuelle, les implants d'organogel *in situ* formés par inversion de phase et les microaiguilles se dissolvant dans la peau demeurent au stade exploratoire. En effet, leur succès en clinique est limité à des questions relatives à l'innocuité, l'efficacité et l'acceptation de ce type de systèmes par les patients. Si bien que seulement un type de microaiguilles se dissolvant dans la peau pour une application vaccinale est en phase I/II d'essai clinique (Tableau 1.4). Afin de permettre une translation clinique efficace, il est important de comprendre d'une part les caractéristiques physico-chimiques et les propriétés mécaniques modulant les mécanismes de diffusion dans la peau, et d'autre part l'innocuité de certains de ces systèmes vis-à-vis de cellules, peu étudiée à ce jour.

La plupart des implants *in situ* formés par inversion de phase qui ont été étudiés, à ce jour, traitent de systèmes basés sur les polyesters aliphatiques, « polymères hydrophobes », et notamment le PLGA. En effet, ce type de système a été fortement expérimenté au niveau des paramètres physicochimiques influençant la dégradation du PLGA et la libération de substance active. Néanmoins, ce type d'implant comporte divers problèmes notamment liés à la stabilité des polymères de PLGA qui nécessite leur conservation à 4 °C, l'autocatalyse du système par la génération de produits de dégradation acides ou encore un effet de libération en rafale accentué pour les substances actives hydrophiles (solubilisées dans l'implant et diffusion vers le milieu externe aqueux) (Islam, 2011). De plus, il existe peu d'études systématiques explorant l'importance des paramètres de composition du système (nature des polymères / solvants, pourcentage massique en polymère) sur les propriétés de relargage en substance(s) active(s) pour les organogels se formant *in situ* (Bastiat and Leroux, 2009; Bastiat *et al.*, 2010; Plourde *et al.*, 2005; Vintiloiu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014). Dans ce contexte, Bastiat *et al.* ont montré que la pharmacocinétique de la rivastigmine lors d'une étude *in vivo* chez le rat était influencée par la composition de la

formulation, la dose et le volume de l'implant liquide injecté. Tel que montré dans cette étude, l'effet de « burst release » a pu être minimisé grâce aux propriétés de gélification du système basé sur des dérivés de L-tyrosine en diminuant ainsi le Cmax pour réduire ainsi les effets indésirables. De plus, l'augmentation de la dose (de 15 à 25 mg/mL) et du volume de l'implant (de 300 à 500 µL) ont permis de soutenir les niveaux plasmatiques 11 jours de plus (Bastiat *et al.*, 2010). Dans une autre étude de Wang *et al.*, les auteurs ont étudié quatre acides gras (acides palmitique, stéarique, myristique et arachidique) solubilisés dans l'huile de soja et injectés à 50 °C pour administrer la palipéridone (anxiolytique/ schizophrénie) (Wang *et al.*, 2014). Malgré la capacité de l'implant à libérer la substance active sous 7 jours et se dégrader sous 9 jours par un mécanisme d'érosion en surface, l'injection d'une solution à haute température a provoqué l'apparition d'un petit tubercule au site d'injection. Ceci est le signe de l'inflammation du derme bien qu'au niveau de l'implant aucune inflammation ou encore de tissus nécrosés entourant l'implant n'ont été détectés. Ce type d'injection à haute température provoquant des douleurs à l'injection ne peut donc pas être considéré pour les patients. En outre, sachant que la peau possède un système immunitaire très actif, l'interaction de ces gels contenant des solvants organiques / huiles avec la peau pourrait potentiellement induire des effets indésirables (réactions toxiques, inflammatoires ou immunitaires). Bien que des études de biocompatibilité ont été rapportées sur des implants d'organogel *in situ* via des analyses histologiques sur les tissus entourant l'implant pendant plusieurs semaines, la toxicité à l'échelle cellulaire est manquante (Bastiat *et al.*, 2010; Motulsky *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2014). La conception d'implants biocompatibles et biodégradables nécessite donc d'établir la meilleure balance entre l'innocuité et l'efficacité.

D'autre part, le développement de microaiguilles pour l'administration de peptides est une avenue intéressante pour pallier aux limitations des nanovecteurs en termes de stabilité et de pénétration à travers la barrière du *stratum corneum*. Cependant, il existe très peu de publication sur les microaiguilles se dissolvant dans la peau pour transporter des peptides (tableau 1.2). De plus, l'administration par microaiguilles est sujette à une compréhension adéquate du rôle des caractéristiques géométriques des microaiguilles sur leur insertion efficace dans la peau. En effet, il est bien établi que celles-ci influencent à la fois les propriétés mécaniques gouvernant l'insertion de microaiguilles et la libération en substance active. Toutefois, parmi les rares études rapportées sur les microaiguilles se dissolvant dans la peau axées sur l'administration de peptide, seuls

quelques auteurs ont encapsulé leur peptide modèle dans la moitié supérieure de la pointe des aiguilles (Fukushima *et al.*, 2011, Liu *et al.*, 2016, Chu *et al.*, 2010). Ce critère pris en compte était subséquent à l'incapacité de toutes les aiguilles à être insérées dans la peau lorsque l'application dure quelques minutes à cause de la cinétique de diffusion du liquide interstitiel (Fukushima *et al.*, 2011). Pour obtenir un dispositif d'administration cliniquement acceptable, une administration efficace de ce nouveau système capable de vaincre l'élasticité de la peau est de toute première importance. L'influence de la hauteur des microaiguilles sur l'efficacité de diffusion d'un hexapeptide modèle (poids moléculaire > 500 kDa) à partir du dispositif mérite donc d'être étudiée, et ce de façon approfondie, car ce paramètre module *in fine* l'absorption du peptide.

2.1. Hypothèse de recherche

Puisque la composition des systèmes d'implants formés *in situ* à base de PLGA affecte : (i) leur mécanisme de formation, (ii) la structure de l'implant et (iii) le mécanisme de relargage de la substance active encapsulée, il est probable que les paramètres de formulation influencent également au même niveau les organogels se formant *in situ*.

En conséquence, nous avons émis l'hypothèse 1 suivante :

Le contrôle des paramètres de composition pour les organogels se formant *in situ*, à savoir le pourcentage massique en organogélifiant et l'ajout de tensioactif, permet de mieux contrôler la cinétique de relargage de substances actives immobilisées dans les implants gélifiés et leur cytotoxicité.

L'objectif principal de cette recherche étant de :

- Développer un organogel injectable formant un implant *in situ* pour déterminer l'effet de la composition de ce système (pourcentage massique en organogélifiant, ajout de tensioactif) sur la libération de substances actives hydrophile et lipophile, ainsi que sur la viabilité des fibroblastes de prépuce humain.

Étant donné que les propriétés biomécaniques de la peau s'opposent à l'administration de microaiguilles, une variation de la libération de substance active est attendue à deux niveaux pour

les microaiguilles se dissolvant dans la peau : (i) au niveau de l'efficacité d'insertion des microaiguilles dans la peau et (ii) de la cinétique de dissolution de celles-ci.

Nous avons donc émis l'hypothèse 2 suivante :

Lorsque des substances actives sont encapsulées dans des systèmes d'administration transdermique tels que les microaiguilles pyramidales se dissolvant dans la peau, l'ajustement de la hauteur des aiguilles permet de mieux contrôler la cinétique de libération de ces substances actives et donc, *in fine*, leurs biodisponibilités associées.

L'objectif principal de cette recherche étant de :

- Concevoir des timbres de microaiguilles hydrosolubles pour évaluer l'effet de la hauteur des aiguilles sur l'administration de peptide à travers la peau.

2.2. Objectifs de recherche et méthodologies

Les principaux objectifs avaient pour but de répondre aux questions spécifiques suivantes :

Implants d'organogel *in situ*

- Quel est le rôle de la composition des implants d'organogel se formant *in situ* (organogélifiant, tensioactif) sur (i) les transitions sol / gel et gel / sol, (ii) les propriétés rhéologiques (thixotropie, résistance mécanique, viscoélasticité, écoulement), (iii) leur aptitude à l'injectabilité et (iv) leur gonflement / dégradation ?
- Comment les propriétés physicochimiques des substances actives influencent-elles leurs mécanismes de libération au sein de la formulation ?
- Comment le choix du type de modèle dans la conception des expérimentations *in vitro* conditionne-t-il les résultats de profil de libération de la substance active ou le pourcentage de viabilité cellulaire ?
- Quel rôle la composition de la formulation a-t-elle dans l'apparition d'un effet cytotoxique au niveau des cellules (fibroblastes) ?

Microaiguilles se dissolvant dans la peau

- Est-ce que les caractéristiques des microaiguilles, à savoir, leurs morphologies, la dimension des aiguilles (hauteur, largeur) et la résistance mécanique à la compression affectent leur capacité d'insertion lors de l'administration ?
- Quel est le rôle de la hauteur des aiguilles dans l'efficacité de libération de la substance active ?
- Comment la complexité de la matrice étudiée influence-t-elle la quantification de peptide par UHPLC /MS-MS ?

Afin de tester notre hypothèse de recherche, les objectifs de recherche spécifiques suivants ont été déterminés.

- **Objectif spécifique 1 : Développer deux nouveaux systèmes de délivrance de médicament**

- 1. Les systèmes d'organogels se formant in situ*

Bien que les acides gras à longue chaîne ont reçu un intérêt considérable dans de nombreux systèmes pharmaceutiques commercialisés, leur étude en tant qu'organogélifiant potentiel pour former des implants in situ est quasiment inexistante. En effet, seule l'étude de Wang a fait l'objet d'une publication pour former des implants in situ pour l'administration de substance active lipophile (Wang *et al.*, 2014). Une amélioration de ce système semble toutefois nécessaire en ayant recours à un solvant soluble dans l'eau tel que la NMP pour éviter l'injection de solution à haute température. De plus, l'utilisation de celui-ci comme co-solvant dans la phase huileuse rend son utilisation plus attractive limitant ainsi les quantités de NMP administrées.

Le premier objectif porte d'une part sur la préparation de formulation d'organogels injectable à base d'acide 12-hydroxystéarique (12-HSA). Cet organogélifiant de faible poids moléculaire est un dérivé de l'acide ricinoléique, l'acide gras le plus abondant de l'huile de ricin. Le 12-HSA, possédant de nombreuses propriétés thermomécaniques (réversibilité thermique, thixotropie, résistance mécanique), a été choisi, car il a montré son large potentiel comme structurant des huiles (Co and Marangoni, 2012; Siraj *et al.*, 2015). Une emphase particulière a été accordée à une mise à jour des différents systèmes d'organogels à base de 12-HSA pour applications pharmaceutiques, cosmétiques et agroalimentaires. De plus, ces organogels constituent une alternative possible au PLGA (stockage, effet de « burst-release », produits de

dégradation acides). La NMP a été sélectionnée pour ses habilités de solvation / miscibilité dans l'eau et comme solvant organique le plus utilisé au niveau des implants se formant *in situ* commercialisé surtout en association avec le PLGA.

2. Les microaiguilles se dissolvant dans la peau

D'autre part, les microaiguilles ont été fabriquées à l'aide de PVA et de PVP, deux polymères solubles dans l'eau approuvés par la FDA. La méthode de coulée en deux étapes en utilisant le vide, classiquement utilisée, a été retenue pour surmonter les contraintes de tension superficielle et de viscosité des solutions de polymères utilisées. Selon les études ultérieures rapportées sur la balance entre l'efficacité de libération de molécule modèle et la capacité d'insertion de ces systèmes, le rapport massique PVA : PVP 1 : 1 a été choisi. Une sonde fluorescente, la cyanine5 (Cy5) a été utilisée comme molécule modèle pour évaluer les capacités d'insertion des microaiguilles dans la peau et de libération en substance active.

○ **Objectif spécifique 2 : Caractérisation des systèmes au niveau mécanique, morphologique, physicochimique ou rhéologique**

Le second objectif concernant les implants d'organogel *in situ* consistait à évaluer l'effet de la composition du système (pourcentage en organogélifiant, ajout de tensioactif) sur (i) les transitions de phase gel / sol et sol / gel, (ii) les propriétés rhéologiques (thixotropie, résistance mécanique, viscoélasticité, écoulement), (iii) leur aptitude à l'injectabilité et (iv) leur gonflement / dégradation. Ceci nous a permis de mieux appréhender les phénomènes physicochimiques impliqués dans le mécanisme de relargage des substances actives.

Les microaiguilles ont été caractérisées au niveau de leurs morphologies, leurs dimensions d'aiguille (hauteur, largeur, longueur) et leur résistance mécanique à la compression qui affectent leur capacité d'insertion dans la peau. De plus, un accent a été mis sur la préparation de microaiguilles contenant le Cy5 pour permettre de déterminer la localisation de la substance active pendant le procédé de fabrication.

- **Objectif spécifique 3 : Évaluation des profils de libération de substances actives modèles : études *in vitro* et *ex vivo***

Le troisième objectif de ce travail était d'évaluer la performance des organogels à libérer deux substances actives modèles hydrophile (acyclovir) et lipophile (clotrimazole) lors d'une étude comparative de diffusion *in vitro* et de perméation *ex vivo*. Les formulations d'organogels ont été comparées à une formulation de substance active correspondante en solution et sans polymère ni tensioactif. Le choix de médicament utilisé dans le cas d'infection bactérienne (clotrimazole) ou virale (acyclovir) s'est fait en raison de leur faible coût, leur stabilité thermique et leur faible absorption orale. Ces études *in vitro* et *in vivo* ont permis de comparer l'utilisation de différents modèles comme l'utilisation d'une membrane artificielle inerte de cellulose régénérée (organogels) ou de tissus excisés de peau de porc (organogels, microaiguilles). De plus, le comportement du tissu sous-cutané comme tissu « réservoir » a été évalué pour déterminer son rôle dans l'absorption de médicament de type hydrophile / hydrophobe.

Du côté des microaiguilles, l'efficacité d'insertion des microaiguilles dans la peau a été tout d'abord évaluée *via* la pénétration et la libération de la sonde Cy5 encapsulée. L'administration de microaiguilles contenant un peptide modèle, le *growth hormone-releasing peptide-6* (GHRP-6), dans la peau nous a permis de mettre en évidence le rôle de la hauteur des aiguilles dans le cas d'une libération transdermique de peptides par microaiguilles. À cet égard, une méthode d'analyse analytique par spectrométrie de masse en tandem par chromatographie liquide ultra-haute performance a été développée pour quantifier le GHRP-6 dans différentes matrices biologiques (peau, plasma) et dans les microaiguilles. Celle-ci a été applicable pour des études *ex vivo* et permettra de faciliter les études futures *in vivo*. Ce peptide a été sélectionné notamment pour son potentiel cardioprotecteur et cytoprotecteur. De plus, les dérivés d'azapeptides de GHRP-6 sont présentement à l'étude par notre laboratoire et leurs collaborateurs.

- **Objectif spécifique 4 : Étude de la cytotoxicité des implants d'organogel : test de biocompatibilité primaire**

Le potentiel cytotoxique des organogels de 12-HSA avec ou sans tensioactif a été évalué sur des modèles de monocouche de cellules en deux dimensions (2D) (conventionnels) ou en trois dimensions (3D). Ces études ont permis d'évaluer la viabilité cellulaire des fibroblastes en contact avec les produits relâchés par les systèmes d'implant *in situ*.

La revue de la littérature centrée sur les organogels de 12-HSA et ses différentes applications (pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire), intitulée : « **Organogels, promising drug delivery systems : an update of the state-of-art and recent applications** », se situe dans le chapitre 3.1. Les objectifs 1, 2, 3 et 4 concernant les organogels ont été traités dans l'article « **Preparation and characterization of 12-HSA-based organogels as injectable implants for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic therapeutic agents** » (chapitre 3.2). Finalement, les objectifs 1, 2 et 3 pour les microaiguilles ont été traités dans l'annexe 1 du chapitre 3.3. Au sein de ce chapitre, l'article « **A quantitative UPLC-MS/MS method for the growth hormone-releasing-peptide-6 determination in complex biological matrices and transdermal formulations** » répond à l'objectif 3.

Chapitre 3 : RÉSULTATS

3.1 Première étude: Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications

Article publié dans *J Control Release* 271:1-20 (2017)

Cloé L. Esposito^a, Plamen Kirilov^{b,*} and V. Gaëlle Roullin^{a,*}

^aLaboratoire de Nanotechnologies Pharmaceutiques, faculté de pharmacie, Université de Montréal, CP6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada ;

^bUniversité de Lyon (UCBL), Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique UMR 5305 et Vecteurs Colloïdaux et Transport Tissulaire, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon, Cedex 08, France.

*Correspondence to Plamen Kirilov, PhD or Valérie Gaëlle Roullin, PhD, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

E-mail : plamen.kirilov@univ-lyon1.fr or vg.roullin@umontreal.ca

Contribution des auteurs

Cloé L. Esposito

Rédaction de la revue – préparation du brouillon original, rédaction-révision et édition.

V. Gaëlle Roullin

Rédaction – révision et édition.

Plamen Kirilov

Rédaction – révision et édition.

RÉSUMÉ

Les organogels sont des systèmes semi-solides comprenant une phase liquide organique immobilisée par un réseau tridimensionnel composé de fibres d'organogélifiants auto-assemblées, réticulées ou enchevêtrées. Les applications des organogels sont diverses, notamment dans les domaines de la chimie, pharmaceutiques, cosmétiques, des biotechnologies et de l'agroalimentaire. En pharmacologie, ils sont utilisés comme plateformes d'administration de médicaments et de vaccins pour les substances actives *via* diverses voies telles que les voies transdermique, orale et parentérale.

Dans un passé proche, leurs utilisations comme systèmes d'administration de médicaments ont malheureusement été entravées par la toxicité des solvants organiques sélectionnés. Plus récemment, la synthèse d'organogels plus biocompatibles a renforcé leur développement au niveau de plusieurs applications biomédicales et pharmaceutiques.

Cette revue fournit une vue d'ensemble sur les organogels au niveau de leur nature physicochimique, leurs synthèses, leurs caractérisations ainsi que leurs propriétés. L'accent est mis sur les technologies les plus récentes utilisées dans la conception d'organogels comme systèmes à libération contrôlée de médicament. Une attention particulière est apportée à leurs nouvelles applications thérapeutiques.

Mots-clés : Organogel, bigel, organogélifiant, administration de médicaments, caractérisation, forme pharmaceutique semi-solide

ABSTRACT

Organogels are semi-solid systems with an organic liquid phase immobilized by a three-dimensional network composed of self-assembled, crosslinked or entangled gelator fibers.

Organogel applications are various, including chemistry, pharmaceuticals, cosmetics, biotechnologies and food technology. In pharmacology, they are used as drug and vaccine delivery platforms for active ingredients via diverse routes such as transdermal, oral and parenteral. In a close past, their uses as drug delivery systems have been unfortunately hampered by the toxicity of the selected organic solvents. More recently, the synthesis of more biocompatible organogels has strengthened the development of several biomedical and pharmaceutical applications.

This review provides a global view of organogels, such as nature, syntheses, characterizations and properties. An emphasis is placed on the most recent technologies used in the design of organogels as potential controlled delivery systems. A particular attention is provided to their newest therapeutic applications.

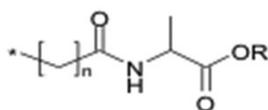
1. Context

Although organogels (or oleogels) have been known for decades, their industrial applications are more recent. They are now used in various fields such as paints and cleaning materials [1,2], dermocosmetics and personal care products [3–5], nutraceuticals and food processing [6,7].

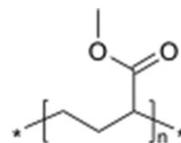
1.1. Definition

A gel can be defined as a semi-solid material in which a solid compound, the so-called gelator, is used at low concentrations ($< 15\%$ w/v) to immobilize a solvent in an elastic or viscoelastic crosslinked network. It is stabilized by physical interactions such as hydrogen bonding, π - π stacking, van der Waals forces or chemical interactions as covalent links [8]. Depending on the nature of the involved solvent, gels can be classified as either hydrogels or organogels. Hydrogels contain hydrophilic solvents while organogels possess an organic solvent as their continuous phase. Up to now, pharmaceutical hydrogels have been extensively studied due to their nature and characteristics, i.e. dispersible (as colloids), water-soluble and also providing a good biocompatibility [9–12].

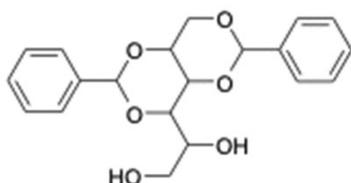
Biomedical interest for organogels is newer. These viscoelastic systems are constituted by a continuous liquid phase, typically an organic solvent, a mineral or vegetable oil, immobilized in a three-dimensional network. This network is composed of either Low Molecular Mass Organic Gelators (LMOGs) or polymeric structures self-assembled into fibers [13]. The wide functionality of organogels has been studied especially as drug and vaccine delivery platforms via various routes such as transdermal, oral, ophthalmic and parenteral administrations.



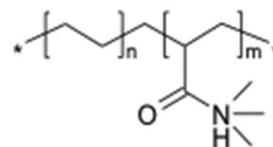
L-alanine amino acid derivatives



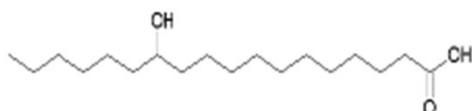
Poly(methyl methacrylate) (PMMA)



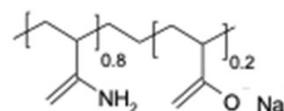
Dibenzylidene sorbitol (DBS)



Polyacrylic acid copolymers



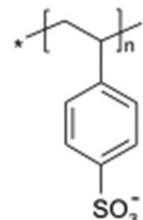
12-hydroxystearic acid (HSA)



Poly acrylamide-co-acrylic acid)



Sorbitan monostearate (SMS)



Polystyrene sulfonate

Fig. 1. Chemical structures of organogelators commonly used in organogel formulations. Organogelator molecules can either be monomers (left panel) or polymers (right panel).

Unfortunately, despite well-recognized performances, success of translation into actual clinical products was hampered by a lack of biocompatibility for these formulations; most of the used organic solvents were found to be significantly toxic [14]. However, more recently these organogel systems have undergone major advances. The use of more biocompatible, biodegradable organic solvents and organogelators (as those derived from the bile or insect blood) proved more pharmaceutically-acceptable and environmental-friendly.

1.2 *Materials used to assemble organogels*

1.2.1 Organogelators

As previously mentioned, organogels are bi-continuous systems composed of gelator molecules at low concentrations (< 15% w/v) immobilizing an organic solvent. Organogelators may be organized in two groups based on the molecular weight range of the gelling molecules: polymeric organic gelators (POGs) or Low-Molecular Weight Organogelators (LMOGs). The chemical structures of the most common organogelators used in organogel formulations for current applications in both cosmetic and pharmaceutical fields, amongst others, are presented in Fig. 1.

LMOGs correspond to low molecular weight compounds (generally < 1 kDa) such as fatty acids and n-alkanes able of gelling organic liquids by forming a supramolecular three-dimensional network. Those organogel networks can either be qualified as strong or weak, depending on their rheological properties. Strong physical gels are characterized by long-lasting 3-D networks, presenting reticular micro-domains which confer them similar physicochemical properties with solids. Weak organogels, on the contrary, are three-dimensional networks presenting liquid-like viscoelastic behavior [3]. A brief overview of those organogelators is given thereafter.

(a) Synthetic molecules

Low molecular-weight organogelators (LMOGs)

LMOGs inducing strong organogels include low molecular weight molecules such as L-alanine derivatives [15–17], 1,3:2,4-di-O-benzylidene-D-sorbitol (DBS) [18,19] or 12-hydroxystearic acid (12-HSA) [4,20]. Typically, this group includes sorbitan monostearate and sorbitan monopalmitate, i.e. Span 60 and Span 40, respectively and glyceryl fatty acid esters [21]. They have been used for long in pharmaceutical and food applications due to their approval by Health authorities.

Polymeric organogelators (POGs)

POGs are versatile, high molecular-weight gelators (> 2kDa). They present good gelation ability

with many types of organic solvents at low concentrations. The gelling process follows conformational changes in the polymeric backbone by addition of crosslinking agents, LMOGs or self-assembly of gelation-causing segments [3]. Those POG-based organogels are either defined as chemical organogels, when the network is maintained by actual chemical bounds, or physical organogels, when the network is induced by weaker, non-covalent bounds [3]. Therefore, these gels generally present specific organogelation properties, such as lower sol-to-gel transition temperature (T_{gel}) and higher gel strength leading to the formation of supramolecular crosslinking gelation points [22].

Physical and chemical organogels based on poly(ethylene) as Plastibase® [23], poly(methyl methacrylate) [24] as Eudragit® [25], copolymers of acrylic acid [26] and sodium allyl sulfonate [27], sodium styrene sulfonate [27] or N-Tertiary Butyl Acrylamide-Acrylic Acid [28] have been thoroughly studied during the last decade.

(b) Biomolecules

Lecithin is a generic term used to designate a group of phospholipids, the most abundant one found in biological systems and major component of soybean and egg yolks [29]. Lecithin is extensively used as an organogelator: its high biocompatibility and amphiphilic nature facilitates drug dissolution. Moreover, lecithin ability to enhance skin permeation naturally promotes its use in topical formulations [30]. For instance, lecithin organogels were successfully used as vehicles of TAPP-Br (*in vitro* growth inhibitor of cancerous cell lines) for the treatment of skin tumours [31] or for the controlled release of drugs intended for transdermal administration [32,33].

Other natural molecules can present organogelling properties, such as sugars or sugar derivatives [17,34,35]; vitamin derivatives [36]; phytosterols [37]; lipid derivatives [38,39]; carbohydrate derivatives [40,41]; peptide derivatives [13,17,42–50]; bile salts [51] or waxes [52,53].

1.2.2. Solvents

In the early years of organogel formulations, commonly-reported organic solvents were often alkanes (carbon number > 5) such as hexane, cyclohexane, alkene squalene, but also mineral and

vegetal oils. Those tend to prevail in more recent pharmaceutical formulations, such as sunflower oil or soybean oil, or more biocompatible solvents such as isopropyl myristate, medium-chain triglycerides or AOT (sodium bis-2-ethylhexyl-sulfosuccinate) [39,54,55].

Polar solvents such as water, ethanol or even butanol, polyethylene glycol, propylene glycol or hydroxyethyl-lactamide can also be part of a solvent mixture leading to organogels, acting as cosolvents [56]. This possibility is of particular interest for pharmaceutical applications since it widens the range of drugs which can be entrapped within an organogel.

1.3. Structures

Because of surface tension between organogelator and solvent molecules, supramolecular structures are generated to entrap solvent molecules with reduced mobility property. A variety of organogelator self-assemblies tends to form structures at various state-scales, which are reported in the subsequent paragraphs (Fig. 2).

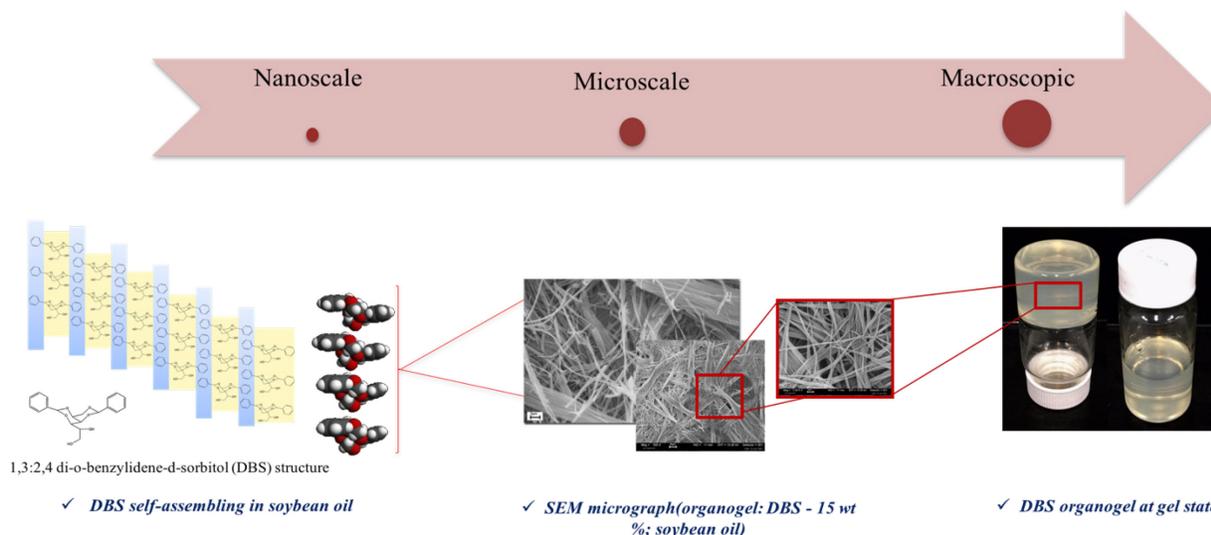


Fig. 2. Multiscale characterization of DBS organogels. Owing to its aromatic group, DBS can undergo pi-pi stacking of the backbone polymeric chains (nanoscale), generating highly-organized fibrillary structures (as seen in electron microscopy, microscale). The fibrillar diameter is tunable with solvent polarity. The resulting organogel presents a slightly opaque, dense macroscopic structure (macroscale).

1.3.1. Macroscale – organoleptic aspects

At the macroscale, organogels consist in different aspects such as an opaque consistency observed in l-alanine fatty acid derivatives organogels [17], fatty acid-derived organogels [5] and pluronic lecithin organogels (PLOs) [57]. Indeed, after cooling at room temperature, organogels act as colloidal supramolecular matrices with high viscosity properties visualized by a semi-solid texture [15]. Furthermore, organogels can display different colors: yellow in PLO and hybrid gold nanoparticle-based organogels, turning into blue / purple with the addition of a tetraoctylammonium borohydride solution (reducing agent) injected on the top of the gel [51], white in bigels with creamy homogenous smooth appearance [55] and even more transparent in micro-emulsion-based gels [58].

1.3.2. Microscale – architectural constructs

Many microstructures derived from micro-aggregates have been reported since increasing numbers and types of organogelators have been used. Globular structures have been observed in fluid-filled organogels [59,60], unlike fibrillary-interconnected structures, which were found in various types of organogels (Table 1). Microaggregates can occur from nucleation sites to form crosslinking junction points in the network structure; thus, they act as transient junction points visualized by spherical aggregates forming fused structures in dipeptide organogels [43], fibers and colloidal interrelated microaggregates in bile acid alkylamide derivatives organogels [61] and wrinkle-like or lamella-like aggregates in aromatic-derived organogels [62]. Additionally, an unconventional right-handed helical twist morphology was also observed in 1,8-naphthalimide derivative organogels [63]. Microemulsion-based organogels can form rigid rods of hydrated gelatin surrounded by w/o microdroplets, in which gelatin dehydrates the microemulsion [64,65].

1.3.3. Nanoscale – supramolecular assemblies

At the nanoscale, a large panel of structural nanoconfigurations can be observed from nanosheets exposing nanofibrils on their surface to gel nanofibers in hybrid organogel networks incorporating graphene [42]. More generally, these structures are generated by fibers, wrinkles and lamella, all depending on weak physical interactions involved in the organogel formation. Typically, they are

based on nanoaggregates sufficiently long to overlap each other in order to form a multi-level belt or fiber-like nanoaggregations [62]. For instance, nanofiber aggregates in *o*-dichlorobenzene were observed to form a meshed structure evolving into microscale structures [45]. Hydrogen bonds were found involved in stable, stacked nanoribbon-like structures through NH(1)–N(7) and NH(2)–O(6) interactions in lipophilic guanosine-derivative organogels [17]. Interestingly, other CN-based organogels showed vesicular nanostructures at high concentrations of CN in highly polar solvents. Those nanovesicles were involved in an aggregation–fusion process supported by weak interactions to build up superstructures of branched nanochannels [66]. Nanoemulsioned structures are known to confer an excellent stability against creaming and sedimentation to organogel matrices, such as those used in food processing [67].

Table 1 Examples of 3-D supramolecular structures obtained from various organogelator / solvent couples.

Type	Sub-type	Organogelator(s)	Solvent(s)	Refs
Globular	Spherical	Span 80/tween 80	Palm oil/DI water	[59]
Fibrillary	Solid fibers	<i>N</i> -terminally pyrene conjugated tripeptide	Sunflower oil	[60]
	Rod-like fibers	Urea-based aromatic derivatives	<i>o</i> -Dichlorobenzene	[42]
	Bundled fibers	Urea-based aromatics derivatives	<i>n</i> -Butanol	[233]
	Curve flexible fibers	T-shaped π -conjugated bisphenazine derivatives	<i>n</i> -decanol	[233]
	Stubbly fibers forming a micron-sized core-shell structure	Cyclo(L-Lys-L-Glu) derivatives	Ethyl acetate	[164]
	Separated fibers	Phe-Phe dipeptides.	<i>n</i> -butanol	[45]
	Ribbon-like fibers	Cyclo(L-Lys-L-Glu) derivatives organogels	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol/chloroform	[44]
		Cholesterol-polyoxometalate-cholesterol organogel	<i>n</i> -hexanol	[45]
		Methyl cinnamate derivatives	Toluene/DMF	[234]
		Building block = naphthalene-1,8-dicarboximide + a cholesterol moiety	CH ₃ OH/CHCl ₃ DMF	[159]
Aggregates	Twisted fibers		DCM	[66]
	Entangled short fibers	Pyrene-based moieties	Hexane	
	Fused/spherical aggregates	Two pyrene based organogelators	<i>o</i> -dichlorobenzene	[43]
	Colloidal microaggregates: Spherical and rod-like aggregates	Bile acid alkylamide derivatives organogels	CH ₃ CN	[43]
	Wrinkle-like or lamella-like aggregates	3,4,5-tris(alkyloxy)benzoic amide compound with phenyl substituent headgroup TC16-Ben xerogels	Anisole chlorobenzene	[61]
Twisted	Right-handed helical	1,8-naphthalimide derivative	Aniline; petroleum ether; <i>n</i> -hexane; ethanol; <i>n</i> -propanol; isopropanol; <i>n</i> -butanol; <i>n</i> -pentanol; isopentanol.	[62]
Micro-emulsioned	Rigid rods/w/o microdroplets	Gelatin	Acetone	[63]
			Lecithin (surfactant), decaglycerol monocaprylate/caprate, PEG-6-caprylic/capric glycerides (hydrophilic linkers), sorbitan monooleate (SMO, lipophilic linker), isopropyl myristate (IPM), sodium chloride and water AOT, isooctane, water	[65]
				[64]

1.4. Properties

Physicochemical characterization enables to detect many qualities in organogels, which in turn can be exploited in food delivery [7,68], cosmetics [3,4,69] and drug encapsulation [5,70,71]. These

physicochemical properties are listed in the following section.

1.4.1. Thermoreversibility

As organogels might be heated up above their T_{gel} temperature, the characteristic structure of the low-energy thermostable 3D matrix undergoes a physical disruption of interactions between gelator molecules. This is due to increased thermal energy in the global network. When the systems are cooled down, the physical cohesive interactions between organogelator molecules reverse back to their stable thermodynamic, solid-like structures (Fig. 3). Ghosh and co-workers reported that the incorporation of alcohol in organogels led to disrupt partially the interactions between gelator molecules maintaining the formulation in a sol state. The diffusion of ethanol out of the gel allowed gelator molecules to self-assembling, creating a 3-D gelling network [8].

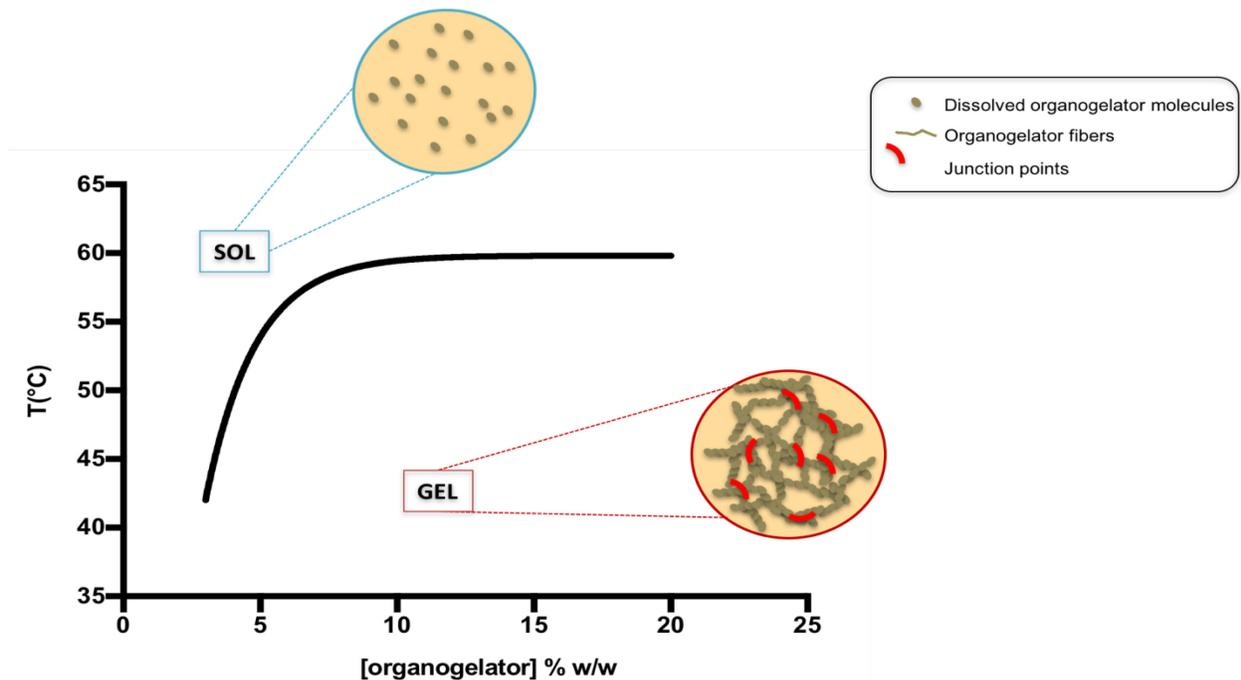


Fig. 3. Typical behavior of T_{melt} evolution as a function of organogelator concentration, along with a schematic representation of the SOL and GEL structures of the organogel. T_{melt} (melting temperature, corresponding to the gel-sol transition) typically increases with the organogelator concentration. The organogel results from the organization of organogelator molecules into supramolecular, 3-D networks at temperatures below T_{melt} . Junctional points (red blocks) can appear to reinforce this dynamic network.

1.4.2. Internal structures and rheological properties

Organogels present viscoelastic properties generally following the Maxwell model of viscoelasticity. At lower shear rates, organogels behave like solid-like formulations and present physical crosslinked junctions below the gelator solubility limit [49,72]. At this point, organogelator molecules begin their self-assembly to form solid aggregates trapped into the three-dimensional network. These systems depend on consolidating inter-molecular physical interactions to stabilize the whole structure. In recent years, the field of tissue engineering has developed useful artificial matrices combining micro-porous-structured biopolymeric organogels. These gels are made from bio-based resources, mixing organogelators, such as cyclodextrins and 12-HSA, with sodium chloride or sucrose (micropore-forming components) and a biocompatible solvent like soybean oil [73–75]. Microporous organogels were also used to capture fluids by adsorption and / or to control their release after solubilisation [76]. The adsorption mechanism of microporous organogels is based on the property of solid or gelled surfaces to fix molecules of gas or liquid in a reversible manner; large driving forces such as van der Waals interactions are involved. Fluids adsorbed onto the surface can be dissolved from the gelled matrix and released in a controlled manner by simple solubilization of the organogel. Mechanisms that are involved in controlled drug release are related to the oil / water or oil / air partition coefficients but also to the internal structure of the fibrous gelled network [77]. Thus, microporous organogels have a great potential in various fields because they present a low density (lower than water) resulting in a buoyant capacity to capture fluids and gases.

1.4.3. Biocompatibility / biodegradability

Pharmaceutically-oriented organogels are biodegradable in nature, especially the most recent formulations based on biomolecules and or biocompatible solvents, such as lecithin, 12-HSA, N-stearoyl-L-alanine methyl ester and benzyl benzoate [78–80]. Therefore, products of their degradation can be easily cleared from the body. The degradation rate can be up-regulated by carefully adapting the concentration of biocompatible components and the used of advanced formulation technologies. In the presence of lipases for instance, the degradation rate of the global organogel structure is accelerated, as well as the degradation of the organogelator itself [81]. As various biocompatible constituents such as vegetable oils, cocoa butter, mango butter [82] were –

and still are – investigated; this opens up a new way for organogels as matrices for pharmaceutical and biomedical purposes.

1.1.4. Chirality properties

The use of chiral organogelators influences the growth into solid, molecular arrangements, the reversibility kinetics and the thermostability of the solid-fiber networks [83]. The presence of chiral centers plays an important role in the organization of fiber growth in solid matrices, whereas fluid-filled ones are far less impacted by chiral organogelators. Besides, supramolecular gelators form chiral aggregates by self-assembly through various non-covalent interactions, which are independent of the organogelator chirality [84,85].

2. Classification of organogels

Generally, organogels are classified according to the organogelator nature (see [86] and [3] for instance). Although highly practical from an experimental point of view, this classification divides organogelator based on organogelator molecular weight. In this review, we propose a novel organogel classification according to the type of intermolecular interactions (chemical, physical) based on organogelator properties, solvent used and preparation methods employed (Fig. 4).

2.1. *Physical crosslinking*

Many organogels can be obtained through the non-covalent interactions of organogelator molecules or organogelator and physical crosslinking molecules, which cause the apparition of crosslinking junction points. At the atomic level, conformational changes in the organogelator architecture or the addition of crosslinking agents cause the molecules to bind [87]. These junctions are formed by relatively strong supramolecular physical non-covalent interactions such as hydrogen bonding, π - π stacking, van der Waals interactions or even solvophobic forces [88].

LMOGs form the principal class of organogelators used to produce physical organogels. The self-assembly of LMOGs through non-covalent interactions allow gelation reversibility and confer

remarkable thixotropic behavior to these gels [89].

2.1.1. Solid-matrix organogels

Solid-fiber matrices are composed by LMOG aggregates self-assembled by physical intermolecular interactions. Solid aggregates are visualized by relatively large, fibrous junction points forming pseudo-crystalline microdomains at concentrations below the gelator solubility limit. Hence stability is improved for these robust gels, resistant to deformation. The physical crosslinking influences the gel state, according several rheological studies, which point out their high viscosity [90,91]. Due to this rigidity, solid-matrix organogels are often found aligned in bundles [90]. Molecular and supramolecular chirality controls the formation and stability of the solid fibers [92].

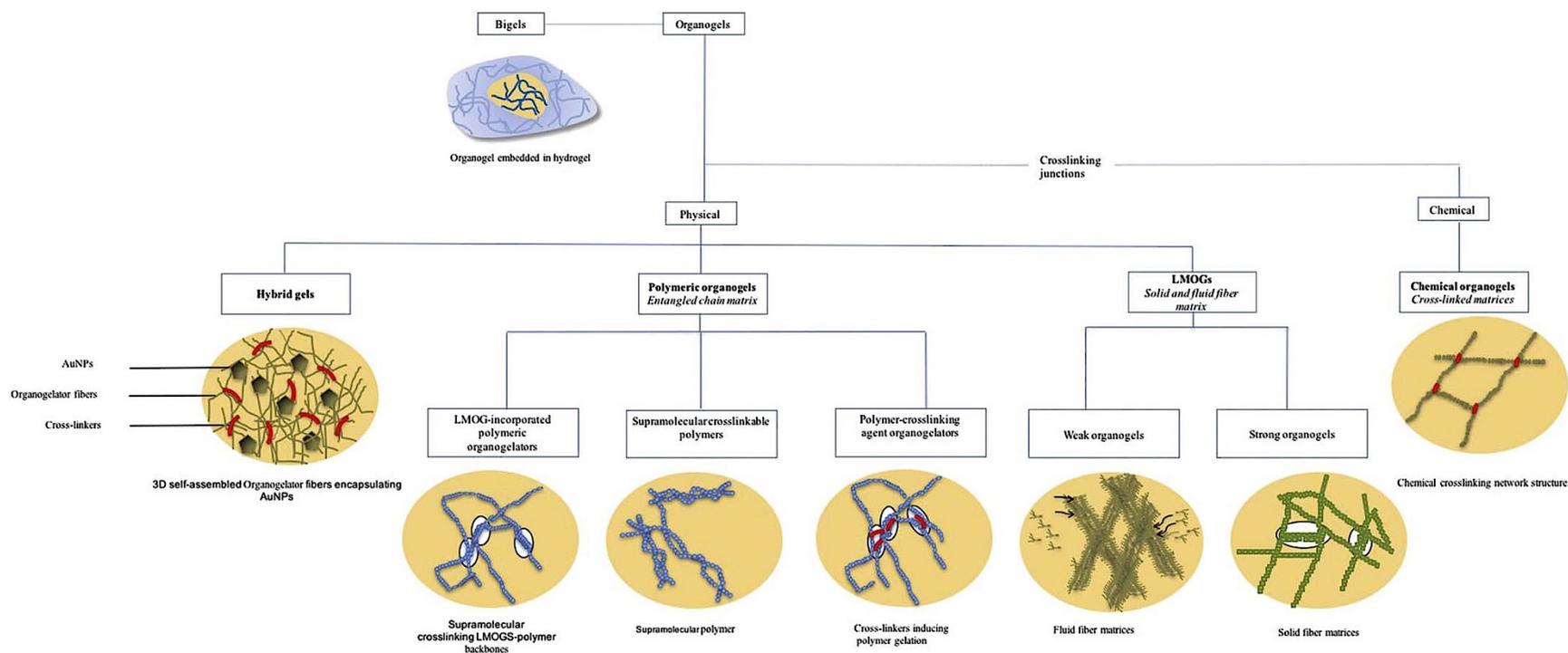


Fig. 4. Organogel classification based on organogelator nature, interactions and preparation methods. The proposed classification rests first on crosslinking nature, i.e. chemical (permanent grafting) or physical (dynamic, transient crosslinking) then on gelator nature (low molecular-based vs polymeric vs hybrid). Typical supramolecular arrangements are sketched to provide an insight into the generated macrostructures.

Generally, LMOG aggregates are assembled into one-dimensional fibers such as rods and tubes with a certain length-to-width (10 μm –100 nm) ratios. These unidimensional structures eventually branch, forming the second three-dimensional network named SAFIN (Self-Assembled Fibrillar Network). Another aggregated structure, less common, is based on hexatriacontane, a 36-carbon n-alkane organogelator. Its aggregation leads to the formation of microplatelet arrangements displaying two-dimensional growth patterns. These aggregates are often crystalline in nature and their arrangements can be either homogeneous [93] or heterogeneous [94]. Another example of stable solid matrix organogels are those derived from functionalized triazines with chiral α -amino acid derivatives, in which aromatic rings stabilize the gel system by π - π stacking between aromatic residues throughout the gel network [95]. Similarly, others have also reported that ALS organogels composed of an aromatic (A) unit connected to steroidal (S) group via a linker (L) are stable gels due to π - π interactions between aromatic components [96].

2.1.2. Fluid-matrix organogels

Fluid-matrix organogels are formed by addition of polar solvents (such as water) into an organic solution of surfactants, leading to the surfactant molecular reorganization into monolayer or bilayer cylindrical aggregates. These conformational changes trap solvent molecules as the consequence of increased surface tension. Furthermore, they withstand dynamic exchanges with the bulk organic liquid in a highly viscous gel state. Fluid-matrix gels display noncovalent transient networks in which junction points are simple chain entanglements. Consistent with their physical properties, these organogels are categorized “worm-like” or “polymer-like” networks. From an organoleptic point of view, they are thermoreversible gels, transparent or even opaque. Two principal fluid-matrix organogels, namely lecithin organogels [97] and sorbitan monostearate organogels [60] have been extensively studied, both with a wide range of pharmaceutical applications. Recently, Vierros and coworkers have reported new organogel systems based on phosphatidylcholine lipid–water–cyclohexane micelles forming dynamic transient micellar cores influenced by water bridges at the phospholipid-water interfaces. Based on a single all-atom molecular dynamics simulation, they thus showed that hydrogen-bond lifetimes were directly connected with residual water density surrounding lipid-derived functions [98].

POGs are versatile high molecular-mass gelators, exhibiting good organogelation ability in many

types of solvents at low concentration. POG-based organogels have been used for a long time as ointment bases. Such gels have generally specific organogelation properties such as lower T_{gel} and higher gel strength leading to the formation of more stable and rigid organogels. Suzuki *et al.* demonstrated that interactions in L-lysine derivative-based POGs were generated through hydrogen bonding between L-lysine segments and poly(dimethylsiloxane) soft segments [99]. Furthermore, Tsaki-Handa and coworkers showed that crystalline domains of cyclohexane based-polymeric organogels act as crosslinking junctions into the gel while the non-crystalline parts contribute to absorb cyclohexane in a gel state [100]. Recently, Peng *et al.* have designed new dendritic gelators based on peripheral methyl-functionalized poly(benzyl ether). They demonstrated their ability to induce supramolecular self-assembled architectures based on multivalent C–H / π cooperative interactions [101]. LMOGs introduced into polymer structures act as gelation-causing segments; they trigger the self-assembly of supramolecular polymer chains while the polymeric backbone contributes to inhibit gelator crystallization and even to supply large areas for the immobilization of solvents [72].

2.1.3. Hybrid organogels

In the last few years, hybrid organogels have emerged as new platforms consisting of nanomaterials embedded into physical organogels. These hybrid organogels have found numerous applications, for instance as optoelectronic and magnetic devices, in tissue engineering and chemical sensors [102–106]. LMOG-based organogels were successfully used to entrap gold nanoparticles (AuNPs) into fibrous networks [51]. The resulting high stability of these hybrid organogels was also observed in the case of multi-walled carbon nanotubes, with an excellent reported longevity [104]. POG-based gelled matrices were also used to entrap inorganic nanoparticles, such as surface-modified Fe₃O₄ nanoparticles, by charge-induced assembly. These hybrid organogels were converted into a magnetic porous material after solvent expulsion, with prospective applications in oil and water extractions [107]. Akkarachaneeyakorn *et al.* created a mini-emulsion-based viscous organogel system composed of polyolefin-derived triblock copolymer (P123) and amorphous calcium phosphate nanofilaments / spherical particles confined in water microdroplets. These inorganic–organic hybrid supramolecular structures were consolidated by Ca²⁺ / oxygen atoms from polymeric bridges of P123 micelles dispersed in the continuous oil phase. After solvent evaporation, porous calcium phosphate-containing organogels were formed [108].

2.2. Chemical crosslinking

Chemical organogels are formed by chemical, crosslinked organogelators in a swollen state in the organic solvent. The 3-D network is irreversibly consolidated via covalent bonds. The resulting organogels cannot generally turn into the liquid phase by simple dilution or temperature changes. Indeed, they constitute more robust and resistant matrices, often due to helical polymer conformations [72]. The formation of supramolecular chemical crosslinking junctions involves crosslinkers such as Cu(I)-catalyzed azide-alkyne derivatives causing cycloadditions. They form peculiar entanglements stabilizing the non-covalent physical networks [109], N,N'-methylene bisacrylamide [28] or polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) [27]. Besides, chemical group activations, like dative and covalent bonds, induce gel formation by orthogonal interactions [110]. Fox *et al* classified covalent crosslink junctions into two main categories: i) dynamic covalent crosslink junctions and ii) supramolecular interactions by the combination of both physical non-covalent, and covalent crosslinks, conferring flexibility and high creep resistance to the resulting material [111].

Covalent crosslink bonds can be triggered by temperature, pH changes, addition of specific salts or even light. Otherwise, supramolecular junctions can be modulated by crosslinker concentration, temperature and equilibrium phase of the system [111]. Higaki *et al* described a novel covalent crosslinked thermodynamic system based on alkoxyamine polymer units. This kinetically-driven system followed radical exchange reactions [112]. On the other hand, Bera *et al.* observed that swelling of organogels based on N,N'-methylene bisacrylamide as the crosslinker decreased with increased crosslinker concentrations, regardless of the nature of solvents involved in their study [28]. In addition, increasing the crosslink density contributed to increase T_{gel} by blocking chain movements [27]. Recently, Yang *et al.* developed a porous chemical organogel based on crosslinking poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) (PVDF-HFP) and tetraethylammonium tetrafluoroborate-acetonitrile electrolytes acting like a promising supercapacitor device displaying high ionic electro-conductivity [113].

2.3. Bigels

Bigels have been reported first by Almeida *et al.* by the mixture of various polyacrylic acid hydrogels dispersed in organogels constituting a bi-continuous system [114]. Among many definitions, bigels can be defined as moisturizing and spreadable semi-solid formulations, forming heterogeneous colloidal systems, classified in three main kinds: i) organogel dispersed into hydrogel system (O/W); ii) hydrogel dispersed into organogel system (W/O) and iii) bi-continuous system [115]. Recently studied for cosmetics, food [116] biomedical [117] and pharmaceutical applications [116,118], bigels possess many advantages over other semi-solid networks. These include shear thinning, firmness, thermal stability with increased organogelator concentrations and electric isolation for hydrogels entrapped in isolating organogel matrices. In fact, they were used to control the delivery of both lipophilic and hydrophilic drugs; those systems followed Higuchi release kinetics due to synergetic effects of both gels [119]. Also, due to their nature, they were able to improve drug permeation through the stratum corneum thanks to their emollient properties. As reported, hydrogels were prepared by various hydrogelators such as guar gum [116,118], gelatin [117], agar [117], carbopol 934 [117], potato starch [115] maltodextrin [116] or sodium alginate [116]. On the other side, used organogelators were sorbitan-monostearate [117], fumed silica [120], monoglycerides of fatty acids [115] or even lecithin / pluronics [55]. Thus, Lupi *et al.* prepared bigel cosmetic formulations and observed matrix-in-matrix bigels formed by phase inversion, where unstructured oil droplets were dispersed in a bicontinuous-phase gelled network [121]. Finally, Behera *et al.*, reported mechanistic properties underpinning the bigel matrix organization, like a highly viscous layer of sodium alginate and carboxymethylcellulose hydrogelators surrounding oil droplets, which contributed to control the diffusion of aqueous media in the system [116].

3. Preparation of organogels

In a general way, formulation of organogels is easily achieved by dissolving an organogelator into a hot, apolar phase followed by a cooling step resulting in gelation. The following preparation methods are used to produce organogels, according to their intrinsic nature (Fig. 5).

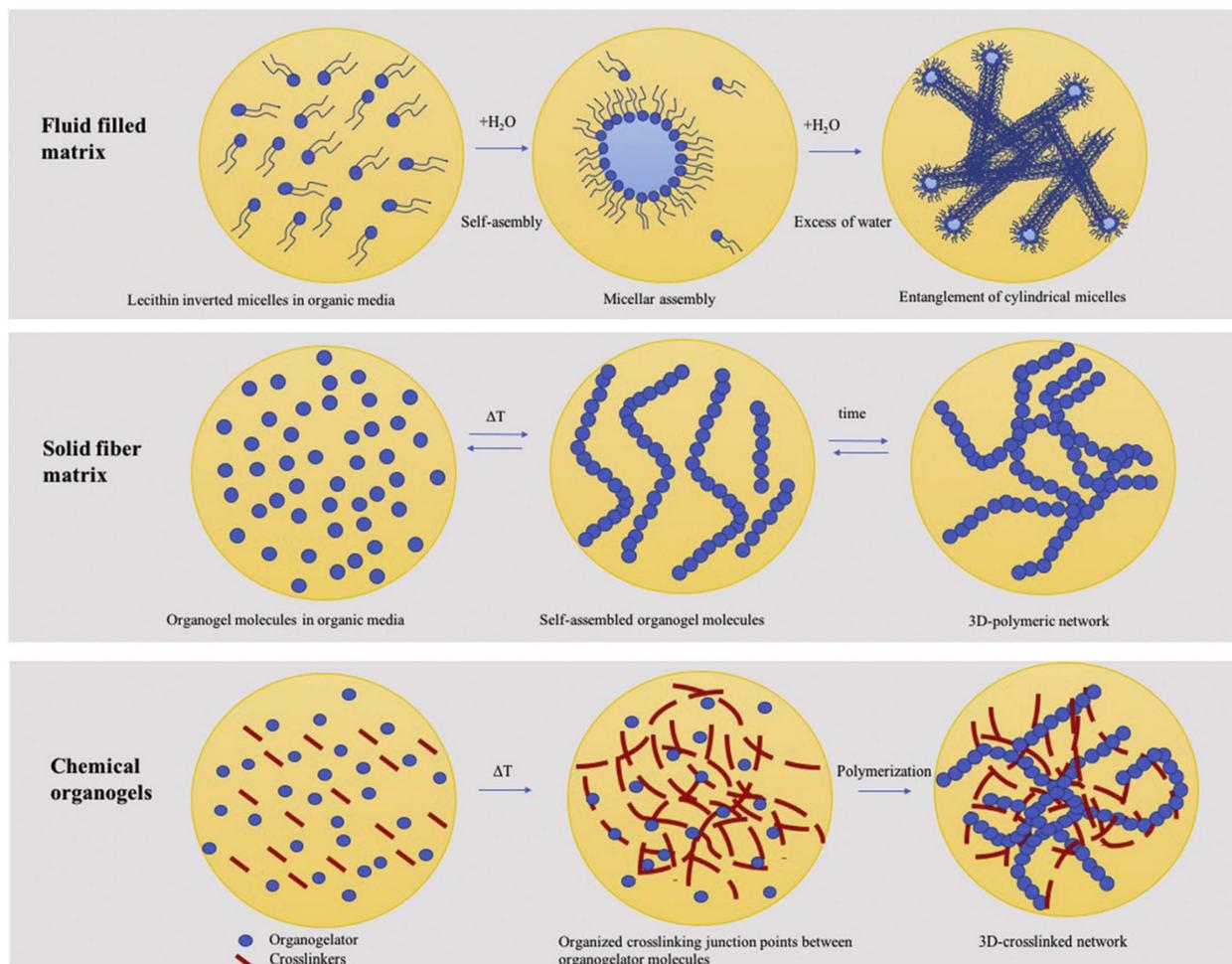


Fig. 5. Preparation methods influencing organogel structures. Top panel: example of a fluid-filled matrix. Amphiphilic lecithin molecules arrange into inverted micelles in an organic solvent. As their concentration increases, cylindrical micelles appear and become entangled into a more complex 3-D network. Water molecules remain entrapped in the cores of the cylindrical micelles. Middle panel: example of a solid-fiber matrix. Dissolution of organogelator molecules into an organic solvent at high temperature leads to a concentrated solution. Then, upon temperature decrease, organogelator molecules start to self-assemble into a solid-like network, shaped into fibers or bundles. This self-assembly occurs as organogelator solubility decreases, generating supramolecular, solid aggregates preventing phase separation. Bottom panel: example of a chemical organogelation. The presence of a crosslinking agent in the organogelator solution triggers a chemical bridging between solubilized molecules, leading to molecular aggregation. As a result, a 3-D network is irreversibly formed, entrapping solvent molecules in the entangled, gelled system.

3.1. Chemical organogels

Chemical processes involving copolymerization reactions are used to obtain crosslinked copolymeric organogels. Various crosslinkers such as N,N-methylene bisacrylamide [28] or polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) [27] can be used along with monomers. They establish covalent bonds between organogelator molecules, entrapping the solvent phase, under stirring at moderate temperature ($\sim 60\text{--}70^\circ\text{C}$). These conditions allow initiating polymerization reactions to obtain the gel formation at a critical gelator concentration (CGC). For example, Bera *et al.* reported that a crosslinker concentration beyond 2% w/v contributed to reduce the swelling of N-tertiary butyl acrylamide- and acrylic acid-based copolymer organogels [28]. Sometimes, a catalyst is required to initiate the gelation, as reported by Markovic and coworkers. They showed that divinylbenzene crosslinker and the copolymer needed a Pt-complex catalyst (quantity in order of ppm) to prepare their organogels [122]. The importance of the crosslinker was also reported by Baglioni *et al.* They observed that the crosslinking of methyl methacrylate (MMA) by a dimethacrylate crosslinker led to a better swelling control of the resulting organogel, conferring an appropriate texture for a better subsequent removal of the gel [1].

3.2. Physical organogels

Physical organogels are mostly prepared by the heat-cool method, as often reported [43]. In this case, gelator molecules are dissolved in the organic solvent. The resulting liquid phase is mechanically stirred (using rotor-stator homogenizers) and heated to $60\text{--}80^\circ\text{C}$, even 100°C for DBS organogels [123] until a clear solution is obtained. The hot solution is then cooled down to room temperature, sometimes under sonication, in order to obtain homogeneous dispersions within a few minutes.

Formulation information regarding specific types of physical organogels is summarized in the following sub-sections.

3.2.1. Solid-matrix organogels

Commonly, this type of gels is formulated by dissolving the chosen gelator at a concentration up

to 15% in the heated solvent [124]. Supergelators, i.e. sugar-derived gelators, have been used at concentrations as low as less than 0.1% [125,126]. When the temperature decreases, the affinity between organogelator and solvent molecules decreases. Then organogelator molecules then begin to self-assemble to form solid aggregates trapped into a three-dimensional network with increased inter-molecular, physical interactions. In order to increase organogel shelf-life, modifications have been introduced. For instance, for organogels formed from organogelators with long-chain n-alkanes (24–36 carbon atoms), the shelf-life increase was correlated with enhanced van der Waals interactions of alkane chains with lower CGCs [62,127].

3.2.2. Lecithin-fluid filled matrix organogels

Jones and Kloesel have developed, in the early 1990s, lecithin organogels by adding a small amount of water into a lecithin organic solution. Later, the very popular PLOs were synthesized by adding an aqueous solution of Pluronic F127, instead of just water, and using an oily phase consisting of lecithin and isopropyl palmitate. PLO gels were firstly synthesized by Marty Jones and Lawson Kloesel in the 1990s [128]. Sorbic acid and potassium sorbate can sometimes be used as preservative agents (~ 0.2% w/w), as well as menthol as a permeation enhancer [129]. The mixing of the two phases is often achieved by high-shear mixing [21,130,131]. Isopropyl palmitate can also be replaced by isopropyl myristate or ricinoleic acid to obtain PLO gels with better emollient and spreading properties [132]. Lecithin-based phospholipids and polymeric surfactant molecules arrange into complexes that structure the final 3D network [132]. Due to the incorporation of droplets of water into the system, these types of matrix can incorporate hydrophilic drugs in the polar phase and lead to the formation of reverse micellar-based organogel systems [133]. The highest [H₂O] / [lecithin] ratio incorporated into an microemulsioned organogel system without phase separation is about 3 [134].

3.2.3. Microporous organogels

Microporous organogels were used to capture fluids by adsorption and / or to control their release after solubilization [73,135]. These microporous organogels could be synthesized from 12-HSA and soybean oil using a particulate leaching technique [73]. First the mixture of 12-HSA and soybean oil was heated at 70°C (> T_{gel}) and then cooled to room temperature to obtain a raw

organogel. Then, different sizes of pore-forming particles (such as sucrose and sodium chloride particles) were then pasted with a small amount of distilled water. This pasty mixture was pressed into a Teflon® mold and dried at 80°C. The different sizes of agglomerated particles were then immersed into the organogel at a temperature of 70°C (> T_{gel}) and cooled at room temperature. The microporous organogels were finally obtained by dissolving the pore-forming particles whilst immersing the organogels at room temperature in distilled water daily for 7 days and then air-dried them.

3.2.4. Microemulsion-based gels

The method currently used to synthesize microemulsion-based gels (MBGs) is to dissolve gelatin (10–20% w/v) in a hot w/o reverse microemulsion formed by water, a surfactant (such as AOT, sodium bis-2-ethylhexyl-sulfosuccinate) and an organic solvent (like isooctane, 80–90% w/v) [65,136]. This microemulsion is then gelled at room temperature (RT) and gives rise to a high viscosity, electro-conducting, transparent, semisolid gel, whose T_{gel} was found to be about 34–38°C [64]. Palividis *et al.* reported later the use of more suitable, ‘green’ solvents to produce room temperature ionic liquids (ILs)-based MBGs. Novel w / ILs microemulsion-based organogels were successfully prepared from polyethylene glycol (PEG) sorbitan monolaurate (Tween 20) and the hydrophobic ionic liquid (IL), 1-butyl-3-methyl imidazolium [137].

3.2.5. Alginate microparticles encapsulating organogels

Alginate microparticles encapsulating small organogels were produced by the double-emulsion technique [52,82,138–140]. Briefly, the first emulsion consisted of a vegetable-oil based organogel dispersed in a sodium alginate solution containing calcium carbonate crystals at 50°C. This primary emulsion was cooled down on ice, increasing the thickness of the formulation. It was then emulsified into sunflower oil (second emulsion), prior a brutal acidification of the external oily phase, causing the release of calcium ions from the alginate sol layer. Finally, a calcium chloride solution was introduced to produce aggregation and stability of the alginate microparticulate systems. This methodology was successfully applied to encapsulate various drugs in organogel inclusions with high encapsulation efficiencies up to 82% [139,140].

3.2.6. Nanoemulsion-based gels

Organogel-based nanoemulsions were synthesized by mixing a water phase and an oil phase using a high-blending homogenizer (~ 24 000 rpm). This was followed by high-pressure homogenization (5–15 MPa; 1–20 cycles) to convert the coarse emulsion into a nanoemulsion dispersed in the gelled system. Zahi and colleagues have thus formulated D-limonene-based nanoemulsified organogels. Likewise, Yu and Huang reported a novel curcumin-loaded, organogel-based nanoemulsion with Span 20-saturated, medium-chain triacylglycerol (10% w/w) as the emulsifier [141] as well as Lu and colleagues for a capsaicin-loaded, organogel-derived nanoemulsion with polysorbate (Tween) 80 as the surfactant [142].

3.2.7. Organogel nanoparticles

Organogel nanoparticles dispersed in water were synthesized using either an ultrasound or a rotor-stator homogenizer [143,144]. Melting 12-HSA into paraffin oil at a temperature above the T_{gel} resulted into an organogel. This mixture was further emulsified into a poly(vinyl alcohol) (PVA) 80 / sodium hyaluronate aqueous solution at T_{gel}. Then, upon cooling the emulsion at room temperature, an aqueous dispersion of 300 nm nanoparticles was obtained (Fig. 6).

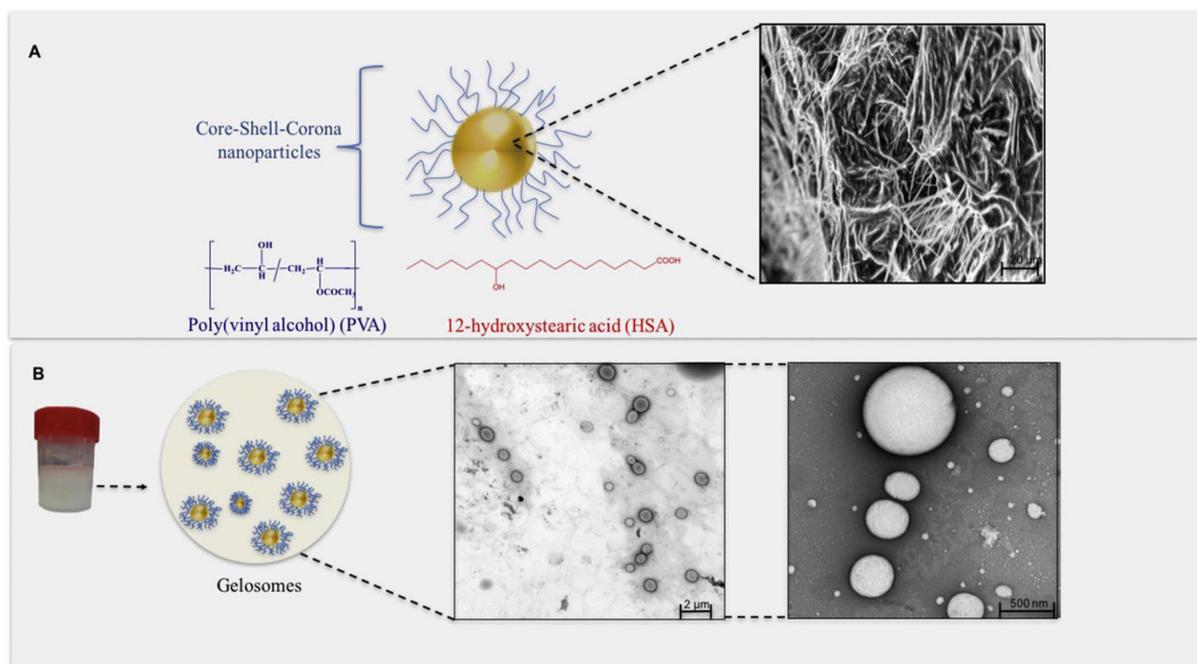


Fig. 6. Aqueous dispersion of organogel nanoparticles: A) schematic representation of gelled nanoparticles and SEM micrograph of 12-HSA nanoparticle core; B) schematic representation and TEM images of gelosomes formulated with 15.4 wt% of almond oil, 1.4 wt% of 12-HSA and dispersed in PVA 80 (Adapted from [4])

3.2.8. Hybrid organogels

Hybrid organogels could be obtained in presence of various types of nanoparticles such as gold [51], zinc oxide [145] or even metal complexes from polyoxometalate [106]. Nanoparticles (NPs) were first suspended in the organic phase followed by addition of organogelators. The suspension was then heated to a temperature above T_{gel} under vigorous agitation (sonication, vortex) and cooled down to turn into the gel phase. Chakrabarty *et al.* showed that the fibrillary network of the resulting hybrid gels led to stabilize AuNPs. These particles presented various shapes from tetrahedral to spherical structures inside of the gel fibers *in situ* [51]. Furthermore, Pelever and colleagues showed that NPs embedded in the organogel could provide an increased mechanical stability to the resulting matrix without deleterious effects on NP properties [104].

3.2.9. Bigel preparation

Bigels were recently prepared using dropwise addition of a molten organogel into an hydrogel at high temperature and shear rates ($\sim 50\text{--}70^\circ\text{C}$, 500–1200 rpm) [119,121]. The resulting system was then abruptly cooled to 25°C to obtain a homogenous mixture. Based on the [organogel] / [hydrogel] ratio, the emulsion mixture can either form a gel displaying by synergistic interactions or a flowing separated-phase system. In the case of gel formation, Patel *et al.* reported weak gel strength due to decreased hydrogels bonding sites following the incorporation of modified silanol surface groups of fumed silica [120].

3.3. *Factors influencing organogel preparation*

Numerous factors affecting organogel formation can be monitored to set optimal conditions for their preparation. Table 2 summarizes these factors and their known impacts on the resulting organogel network. Among physicochemical impacts, most of studied factors have been observed to affect the final morphology and tridimensional conformation of the gel microstructure. For instance, structural transitions from mesostable dipeptide organogels to stable microcrystals were reported by Zhu and colleagues through the use of ethanol as a polar cosolvent allowing hydrogen bonds to stabilize the system [50]. These changes also affect the network strength via phase transition diagrams, for instance from rigid, interconnected fibers to a fragile, disordered network close to the melting transition [146]. Other physicochemical factors such as organogelator molecular weight [147], charge [148], solubility [149] or concentration [150,151] were also shown to have a great impact on the gelation process.

Table 2 Factors influencing organogel formation

Organogel parameters	Factor	Impact(s)	References
Solvent	Nature	Morphology	[50,234,235]
		3-D conformation	[43]
		optical properties	[43,234,236]
Organogelator	Presence of cosolvent	Morphology; 3-D conformation	[50]
	Presence of water	3-D conformation, stability	[55,60,98,124,133,237-240]
	Molecular weight solubility	Mechanical and rheological properties; 3-D conformation	[147,149,241]
	Concentration	Mechanical and rheological properties; stability	[150,151,242,243]
	Charge	Mechanical and rheological properties; 3-D conformation	[148]
Adjuvants	Salt addition	Morphology, 3-D conformation	[87,107]
	Surfactant addition	Morphology, 3-D conformation	[239,244-247]
Formulation parameters	Agitation mode	3-D conformation	[67,156,221,232,248,249]
	Phase transition diagram	Network strength	[146]

4. Characterization

Recently-synthesized organogels are intensively characterized through various techniques and methodologies to confirm their stability and efficiency (Table 3). Indeed, as complex polymeric matrices, they should enable the fine control of active substance release in various delivery applications [3,134,152,153]. Great interest is paid to rheological studies, nuclear magnetic resonance (NMR) or microscopy and spectroscopy techniques. For instance, LMOGs-based organogels are frequently defined as bicontinuous, colloidal systems which include coexisting LMOGs and an organic liquid. A supramolecular organization leads to a 3-D network which is viscoelastic, thermoreversible and immobilizes microdomains of the liquid in a no-flowing state.

Table 3. Characterization of organogels according to appropriate analytical methods

Analytical characterization methods	Characterization parameters
Method of the inverted tube (visual assessment)	Evaluation based on gravitational flow, time, temperature and concentration of gelling agent. The thermal gelation of the organogel occurs during cooling of the formulation, when the inversion of the tube containing the organogel does not cause flow under the effect of its own weight
Rheology	Studies to access viscoelasticity properties based on viscosity (η), storage modulus (G') and loss modulus (G''); identification of the gel/sol transition temperature. Tests include oscillary strain and strain rate frequency, creep-recovery tests
Differential scanning calorimetry (DSC)	Thermal analysis depending on the physicochemical properties of organogelator molecules, nature of the organic phase as well as concentrations. Can be used to access network disruption conditions [182]
X-ray diffraction (XRD)	Non-destructive technique based on X-ray diffraction into the material. Used to assess the presence of crystalline domains. XRD organogels profiles vary due to the composition of the internal phase [172]
Small angle x-rays scattering (SARS/SAXS) and small angle neutron scattering (SANS)	Scattering techniques are used to investigate organogel structures in a wide temperature range from the gel to the sol states and the gelation process. These techniques are perfectly suitable to study physical parameters of gels, at the atomic scale [173]
IR spectroscopy	Inter- and intramolecular hydrogen bonding shown to be involved in the gelation process [63]
Atomic force microscopy (AFM)/transmission electron microscopy (TEM)	Visualization of the organization of the three-dimensional microstructures gelled network, such as fibers structures (solid fiber organogels) and globular structures (fluid filled organogels) [42]
¹ H-NMR	Valuable information about structures, dynamics of materials, molecular organization, morphology, specific interaction and internal mobility of constituents. Understanding of gelation phenomena reflected by the immobilization of solvent molecules with organogelator molecules linked by weak chemical bonds such as π - π stacking and H-bonds [167]
Stability studies	Thermocycling and freeze/thaw cycling tests to evaluate the resistance profile of samples to various cycles at low and high temperatures [179], syneresis measurement and to identify phase separation

4.1. *The inverted vessel method: verifying the gel formation*

The formation of gels can be determined using a qualitative evaluation method based on a simple inversion (upside down) of the tube / vessel containing the formulation; the gel state is determined when the formulated system does not flow anymore under the effect of its own weight (see Fig. 2) [48,61,120,140,154]. Various parameters, such as the gravitational flow, time, temperature and concentration of the gelling agent can then affect the visualization and the determination of the gel formation. Feng *et al.* observed, in their dendritic wet gels in toluene, a correlation between a high gelator concentration and the increase in gel thermostability following the tube inversion [155]. Based on gel melting temperature and visual observation, the stability and the gel state of the formulated organogels can be evaluated [22,44,62,83,156–162].

4.2. *Structural characterization*

The molecular architecture is governed by thermodynamics of gelator molecular rearrangement. Numerous techniques of microscopy (AFM, TEM) and spectroscopy (NMR, MRI, FTIR). They can be used to provide insights on the organization of the three-dimensional micro-structures, morphology, specific inter- and intramolecular interactions, as well as internal mobility of the constituents.

4.2.1. Macro- / micro-structures

Macroscopic characteristics of organogels are closely connected to their microscopic structures. Scanning or Transmission Electron Microscopy (SEM, TEM), Atomic Force Microscopy (AFM) and Fluorescence Microscopy provide important clues on the aggregate morphology [163].

TEM and Freeze Fracture-TEM (FFTEM) can thus be used to examine the morphology and the microstructure organization of gel particles [143]. For instance, novel organogels based on urea-functionalized quinacridone derivatives were characterized by Field Emission Scanning Microscopy (FESEM); images showed 1-D nanofibers forming intertwined 3-D flexible networks, modulated by solvent–gelator interactions [156]. Similarly, SEM imaging was used to elucidate the organization of hybrid diphenylalanine (Phe-Phe)-based organogels loaded with gold

nanoparticles. They presented various separated fibers with large aggregates of AuNPs in the interstitial spaces, probably due to the interactions between Phe–Phe and AuNPs [44]. Interestingly, Cyclo(L-Lysine-L-glutamic acid) (cyclo(L-Lys-L-Glu)) derivative organogels were used in TEM and SEM studies to illustrate the fact that the solvent nature influences the microstructure of the 3-D gelled networks [45]. Moreover, the effect of various hydrophobic monomers on a sorbitol derivative-based organogel was investigated using TEM and showed nanofibril structures, whatever the gel studied. Irregular microaggregate structures were also found in organogels containing MMA monomers due to hydrogen bonding between the sorbitol derivative and MMA [123]. A new rigid LMOG was synthesized by Ma and colleagues to obtain fluorescent, methyl cinnamate-derived, rigid organogels based on cooperative π – π stacking and CeO $\cdots\pi$ interactions. The morphology of the resulting organogels was investigated by SEM; the presence of flexible ribbons composed of bundles of entangled fibers in dimethylformamide (DMF) and methanol / chloroform (CH₃OH / CHCl₃) was then evidenced [159].

AFM is, on the other hand, a technique enabling to follow nucleation and elongation processes. For instance, the process involving nucleation sites was investigated using AFM. The structure of T-shaped π -conjugated bisphenazine organogels exhibiting aldehyde groups presented islands of fiber aggregates originating from nucleation sites and providing a rigid network; those structures could not be visualized in organogels composed of CN compounds [164]. Suzuki *et al.* reported the synthesis of a novel cholesterol–polyoxometalate–cholesterol organogel, in which the cholesterol moieties formed supramolecular ribbon-like self-assembled structures. As revealed by TEM and FESEM, those fibrillary structures could, in turn, form two kinds of 3-D gel networks: the first was built up via physical connections as hydrogen bonds and π – π interactions of the rigid and straight ribbons and the second was established on ribbon splitting and intertwining [22]. Similarly, the fibrous nanoaggregates structures formed by the Si-lipid multilayer structures self-assembling from a lipophilic L-glutamide-derived lipid presenting a triethoxysilyl headgroup (Si-lipid), revealed by SEM crosslinking points in the network structure [165].

The three microscopic techniques (SEM, TEM and AFM) can also be combined to disclose the intimate structuration of the organogel network. Thus organogels containing both naphthalene-1,8-dicarboximide and cholesterol moieties were characterized using these three imaging

techniques; by increasing solvent polarity, it was determined that superorganogels displaying twisted fibers were constituted of nanotoroid-terminated helices and vesicles [66].

Infrared spectroscopy has also been intensively used to reveal the presence of specific functional groups. In particular, Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy is widely used to determine the degree of hydrogen bonding. It generally is used to explain the properties and changes in the structural, dynamic systems at the micro-scale [166]. In the case of gelation processes, inter- and intramolecular hydrogen bondings and π - π stacking are known to be involved. For instance, Cao and colleagues demonstrated, through FTIR experiments, the formation of intermolecular H-bonds between their gelator molecule and tartaric acid, which generated helical supramolecular structures [63]. The FTIR spectrum of graphene-containing hybrid wet organogel uncovered that the β -sheet structure was preserved even after the incorporation of graphene into the hybrid organogel system [42]. Similarly, FTIR spectra were largely used to highlight the formation of intermolecular hydrogen bonds in organogelled network [43,47,54,156,164].

4.2.2. Nanoscopic structures

The use of Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy to characterize polymers appears to be increasingly common. Therefore, NMR-based techniques, which involve spin relaxation times, Nuclear Overhauser Enhancements (NOE) and even magnetic resonance imaging (MRI) are perfectly suited to understand molecular organization, material dynamics, morphology, specific interactions and internal mobility of constituents in organogels.

A comprehensive illustration of this suitability would be the understanding of the underlying mechanisms of gelation phenomena. Organogelation occurs when solvent molecules are immobilized by organogelator molecules linked to each other by weak chemical bonds, such as π - π stacking and hydrogen bonds (H-bonds) [167], imparting a higher viscosity to the system. As organogels may be considered as porous materials, spin-lattice relaxation (NMR) technique is suitable to study the solvent-surface interactions [168]. NMR can also provide the sol-to-gel transition temperature, thus supporting thermoreversibility data and π - π and H-bond associations [169].

Thus the elucidation of NMR spectra was successfully used to pinpoint the presence of intermolecular hydrogen bonds between neighboring groups, promoting supramolecular self-assembled structures [156,160,162,170]. Another crucial interaction revealed by NMR studies is the involvement of π - π stacking forces [156], often associated with $CeH\cdots\pi$ interactions and solvophobic interactions [155,171]. The dynamics of water molecules and their impact on organogel formation / breakdown can also be followed by NMR [111].

NMR spectroscopy approach is so far the only technique that helps to understand the influence of configuration and conformation of LMOGs on molecular packing of the gel [169]. With further development, it should be used to study diffusion of compounds and more complex gel networks.

4.3. Surface characterization

X-ray diffraction (XRD) is a non-destructive technique measuring the X-ray intensity and the 2Θ angle of X-ray beam deviation in order to obtain a diffraction pattern. Organogels produce broad peaks caused by the crystallite domains (i.e. adjacent microscopic crystals formed during the cooling phase). Furthermore, XRD profiles of organogels vary due to the composition of the internal phase [172]. Scattering techniques are used to investigate structures of organogel components in a wide temperature range from the gel to the sol state and the gelation process.

Small angle x-ray scattering (SARS) is a similar technique to XRD, except that small angles (0.1° – 10.0°) are used. The main difference between SARS and small angle neutron scattering (SANS) is the use of a neutron beam instead of a X-ray beam and the improvement of signal-to-noise ratio. These techniques are perfectly suitable to study the skeletal shape of fibrillary networks and physical parameters of gels, at the atomic scale [173].

X-ray analyses (Wide Angle X-ray Scattering and Small Angle X-ray Scattering) also provide important information about the crystalline structure [174] and molecular packing [163]. For instance, SAXS and SANS techniques allow to interpret the complex supramolecular organization of fibers in nanohybrid organogel systems, even allowing the exact determination of the constituting pattern [173,175]. XRD, on the other hand, can reveal the *in situ* formation of H-

bonded complexes [145] or the spatial and multidirectional arrangement of organogel-organizing nanostructures [156,162,176].

4.4. Mechanical characterization

Rheological studies aim to determine the dynamic shear modulus related to viscoelastic properties of gels, their sol-to-gel temperatures, their thermostability and thus their consistency, as well as viscosity (η), storage modulus (G') and loss modulus (G'') [143] (Fig. 7). Tests such as oscillatory strain and strain rate frequency, or recovery behaviour give access to the rheological characteristics of organogels [163].

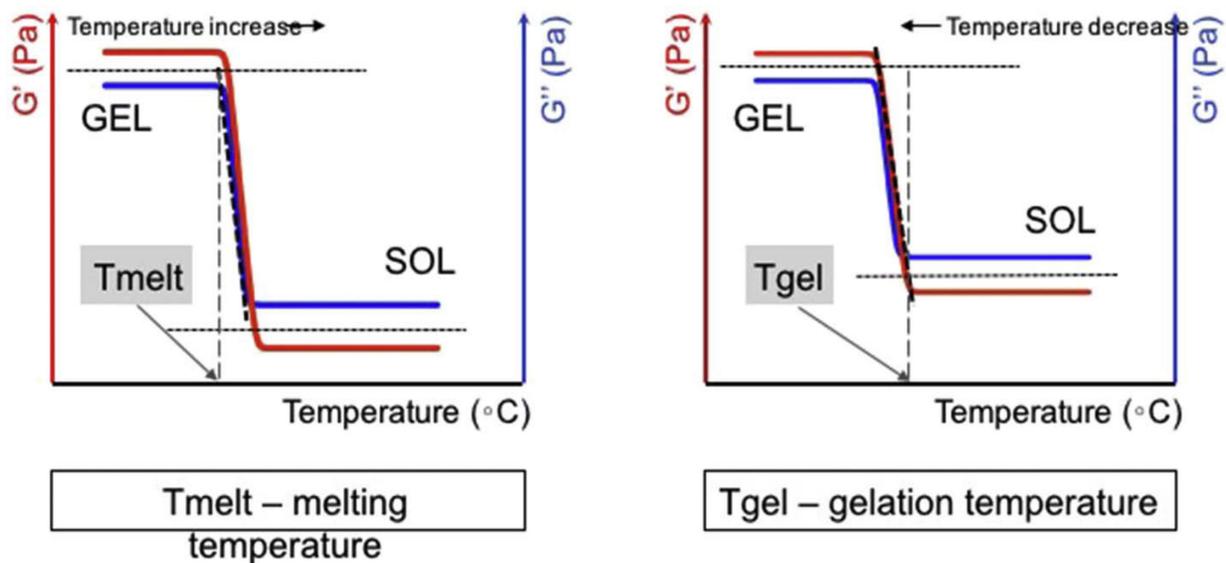


Fig. 7. Steady-state rheology: G' and G'' modulus variation vs. temperature for a typical organogel. Schematic behaviors of G' (storage modulus) and G'' (loss modulus) upon either temperature increase (left panel) or decrease (right panel). The rheological behavior of the organogel versus temperature presents two phases: the GEL phase and the SOL phase, separated by a transitional phase known as PTD (phase transition domain). The recording of G' during the gel - sol transition (liquefaction process) allows determining T_{melt} , i.e. melting temperature, whereas the recording of G' during the sol - gel transition (gel formation process) enables the calculation of T_{gel} , i.e. sol-gel transition temperature. T_{melt} , corresponding to an abrupt decrease of the viscoelastic moduli, is characteristic of the beginning of the organogel melting process. T_{gel} corresponds to a brisk increase of the viscoelastic moduli and indicates the initiation of the gelation process.

In most studies, rheological characteristics are crucial for the final application, i.e. cosmetics, food, drug delivery. Two different types of three-dimensional networks according to their viscoelastic properties can be formed in organogel networks. First, “strong” organogels, also named as gel-like systems, display a solid-like, viscoelastic behavior occurring through sol-to-gel phase transition at a specific temperature, namely T_{sg}. Secondly, ‘smoother’ materials display a liquid-like viscoelastic behavior; they are present in transient networks and also characterized as “weak” gel-like systems [177]. Based on rheological characterization, Kirilov *et al.* reported the influence of shear-thinning behaviour on the droplet deformation and the viscoelastic properties of the entire polymeric gel system [143]. Thus rheological studies allow accessing to the assembly dynamics of crystalline aggregate structures or the disassembling of instable smaller clusters at low and high shear stresses, respectively [79,120]. Another parameter, the gel melting temperature (T_{melt}), controls the arrangement of interactions between entities of the gel network. Indeed, it governs the system stability, and can be modulated by others factors such as the nature and presence of surfactant molecules [148,178]. Viscoelasticity properties play a central role in polymer chain entanglements. Polymer concentration, solvent type, and concentration of encapsulated active substance are amongst the parameters which can affect the storage modulus, the loss modulus, the dynamic viscosity, the mucoadhesion and even the disruption of the viscoelastic network [152]. Toro-Vasquez *et al.* also observed that the elasticity of stearic acid-based organogels was related to the balance between hydrogen-bonding sites, the alkyl chain length and the cooling rate [174]. Finally, as shown in NMR, the effect of polar solvents and their impact on organogel formation / breakdown can also be followed by rheological studies [111].

4.5. Thermal / thermocycling studies

Syneresis measurements, thermocycling and freeze / thaw cycling tests are used to evaluate the resistance profile of samples at low and high temperatures [179]. Syneresis, i.e. the extraction or expulsion of the solvent molecules from the gel resulting in a gel contraction. It occurs when strong interactions are established between organogelator molecules and the organic phase at a stabilized low osmotic pressure [180]. This state allows identifying phase separation in the gel and can be provoked by temperature changes.

On the other hand, differential scanning calorimetry (DSC) is a thermal analysis which measures the energy absorbed or released by the gelled system as a function of temperature. As for rheological measurements, this method depends on the physicochemical properties of organogelator molecules and encapsulated active substances, the nature of the organic phase as well as their concentrations [52,172,176]. It measures the strength of interactions between the molecules as visualized by the enthalpy variation [181]. Indeed, increasing the temperature causes network breakdown; the dissolution of the solid material, resulting in an exothermic reaction, can mask the visualization of endothermic melting events linked to the T_{gel} values of polymeric materials [182]. On the contrary, decreasing the melting enthalpy at the cooling stage causes molecular packing of organogelator molecules in the network [181]. Another example of DSC use in characterizing organogel structures is given by analyses made on sorbitol-based organogels [183] and in Si-lipid organogels [165]. When organogels are cooled down to their stability (i.e. 'gel') state, the inner structures are adopting particular organisations: the geometric confinement of fibrillary structures or the core organization of organogelators caused by intermolecular condensation reactions can be observed. These phenomena are revealed by higher melting points and sharper melting endotherms, due to a higher degree of organization in the systems. DSC analysis can also provide important clues about unconventional enthalpy behaviours. For instance, in the case of a glycerol-water solvent mixture used to prepare a gelatin-based organogel, water alone contributed to the hydration of the protein molecules [184]. At high glycerol concentrations, since glycerol and water molecules preferentially interact with each other, the affinity of water molecules for the organogelator decreased. This resulted in a stronger, 'compacter' gel characterized by increased T_{gel} values [184].

DSC analysis can also uncover thermodynamic structural information at low organogelator concentrations, such as in Christ and colleagues' study [170]. They observed a sharp exothermic peak at the first-order phase transition and a monotectic transformation, subsequent to a nucleation-growth mechanism occurring above a threshold concentration at low temperature. Palui *et al.* also observed the thermoreversible first-order phase transition characterized by exothermal behaviours during the cooling phase, and endothermic peaks during the heating one, caused by various generations of dendrimeric chains [48].

4.6. *In vitro* drug release, organogel degradability and *ex vivo* studies

As in any matrix system, drug release from organogels is intrinsically related to their microstructure. Chemical organogels, formed by covalent bounds reinforcing the organogel network, generally display a quite linear *in vitro* release profile, typical of apparent zero-order release kinetics. For instance, Kawata and colleagues followed both drug (salicylic acid) and organogelator (Eudragit L) releases *in vitro*, in a 7.4 phosphate buffer [25]. They showed a linear correlation between the two released compounds, typical of a surface erosion mechanism as expected in this type of structures. On the contrary, physical organogels rely on both diffusion and erosion mechanisms to release entrapped drugs [7,185–187]. The resulting *in vitro* release profiles are biphasic, as erosion necessitates more time than diffusion to impact the release pattern. Release periods can cover from a few hours [7] to almost a week [187], depending on organogel viscosity or organogelator concentration. For bigel structures, the drug release profiles are generally a combination of release patterns from hydro- and organogels, and largely driven by water diffusion rate. As a result, they can be quite straightforwardly deciphered. For instance, the w/o bigels prepared by Behara and coworkers exhibited Higuchi release kinetics characterized by predominant diffusion-mediated transport of the drug from the bigels [119]. Similar patterns were reported by Ibrahim *et al.* who demonstrated the modulation of drug release according to the interactions between organogel structures and the diffusion of water molecules [55].

Organogel degradation, related to *in vivo* stability, contributes to drug release kinetics, structure disappearance and hence biocompatibility. It is therefore essential to get access to the degradability rate and its causal mechanisms. *In vitro*, degradation studies are performed by different means: measuring the dry weight loss, analyzing the gel mechanical properties at different time points and evaluating the thermodynamic behaviour of gels by DSC analysis. These experiments are generally complemented by *ex vivo* experiments. Indeed, *ex vivo* models using animal tissues may impart with the understanding of mechanisms underlying drug transport, using an isolated tissue which retains its barrier integrity. These models provide a more realistic correlation with *in vivo* results than *in vitro* studies. They are usually carried out in Franz diffusion cells or derivative systems [188].

Molecular interactions between polymers and solvent immersed in various hydrolysis media affect the degradation process of gel networks. For instance, Lupi *et al.* performed dialysis tubing experiments to evaluate the bioavailability and the release profile of ferulic acid from different organogel matrices. They showed that, at low organogelator concentrations, policosanol molecules create a strong network that delays the active substance release from the organogel matrix [7].

Another crucial factor impacting the drug release kinetics and, by extension, the organogel degradability, is the drug solubility in the various compartments. The drug solubility in the formulated gel is closely correlated to the drug release rate from the polymeric matrix. Lipophilic drug molecules are released from the network, only by diffusion in the organogel, whereas hydrophilic drug molecules also need to be dissolved before diffusing out of organogels [186]. Moreover, the release of poorly soluble drugs can also be favored by larger interfacial areas in emulsions [185]. More complexly, Glowka *et al.* reported that the release of lipophilic drugs from polymeric nanoparticles embedded in an organogel was slowly processed in water; it occurred by drug diffusion, polymer hydrolysis and particle erosion [189].

Other factors may also affect drug release kinetics and the organogel biofate. For instance, Wang *et al.* observed that L-alanine derivative organogels were hydrolytically degraded. During long immersion periods, their weight loss significantly increased, causing the leaching of oil, which was also dependent on the amount of incorporated organogelator [17]. Similarly, Pereira *et al.* conducted *in vitro* studies to quantify release kinetics and erosion on cylindrical-shaped organogels. They concluded that factors influencing efavirenz release were organogel erosion, drug diffusion within the organogel matrix, gelator concentration and Tgel [181].

According to the Fick's law, *in vitro* release directly depends on drug diffusion, in turn directly impacted by the vehicle viscosity. Contrary to that common law, a non-linear correlation between *in vitro* release and viscoelastic properties was observed for drosperidone organogels being partially destroyed upon injection (mechanical stress) resulting in a slower recovery rate due to higher viscosity [187].

5. Organogels in drug delivery and new therapeutic applications

Due to their incredibly entangled fibrous nano / microstructures, organogels allow entrapping a vast variety of therapeutic compounds, which makes them useful as drug delivery platforms. To be considered for pharmaceutical applications, organogels need to be biocompatible. Organogels have recently regained interest following many reports on their *in vitro* and *in vivo* applications, at various development stages.

5.1. Dermal and transdermal applications

Drugs can be delivered into the skin layers with cutaneous or dermal delivery routes and beyond the skin with percutaneous or transdermal delivery routes. These routes of administration achieve systemic effects and avoid first pass metabolism. The bioavailability of a molecule administered through the skin depends on its liposolubility and can vary according to the nature of the delivery vehicle. The stratum corneum represents the main barrier due to its lipophilic composition and its thickness.

Therefore, thanks to their intrinsic nature, organogels represent a promising category of vehicles with excellent characteristics for cutaneous administration. They are lipophilic, non-irritating, easy-to-use and favor a rapid absorption. Consequently, these gels have been largely developed and studied for the topical administration of pharmaceutical molecules in the treatment of various diseases, such as neuropathy [190], hormone-dependent cancer [57], and diabetes [132] (Table 4).

Table 4 Examples of dermal organogel formulations tested in *ex vivo* or *in vivo* investigations, for topical or systemic applications

Gel type, encapsulated active	Type of study	Comparison with commercial product/conventional forms	Intended indications	Refs
Lecithin organogels loaded with sumatriptan succinate	<i>In vivo</i> on albino mice	-	Migraines with gastric stasis	[250]
Lecithin organogels loaded with fenretinide	<i>Ex vivo</i> on synthetic nylon system	Conventional ointment o/w emulsion	Chemoprevention and treatment of cancers	[134]
Lecithin organogels loaded with crocin	Healthy volunteers	Ethosomes	Oxidation-related pathologies	[191]
Lecithin organogel-based nanoemulsion loaded with metoprolol	<i>Ex vivo</i> on hairless skin of male Wistar rats	-	Angina and Hypertension	[251]
PLO organogels loaded with a combination of baclofen/amitriptyline/ketamine	Double-blind randomized placebo-controlled trial, on patients receiving neurotoxic chemotherapy	-	Chemotherapy-induced peripheral neuropathy	[190]
PLO organogels loaded with cyclobenzaprine	<i>Ex vivo</i> on porcine skin	Lipoderm	Chronic pain (arthritis, neuropathic pain, migraine)	[252]
PLO organogels loaded with fluorescein	<i>In vivo</i> on male syrian hamsters	Lipobase	Medical imaging	[253]
PLO organogels loaded with various drugs (quetiapine, venlafaxine, trazodone, buspirone, escitalopram, lorazepam)	<i>Ex vivo</i> on porcine skin	Lipoderm	Psychiatric medications	[254]
PLO gels loaded with melatonin	24 geriatric patients presenting psychiatric and dementia symptoms	-		
	<i>Ex vivo</i> on human skin & porcine buccal mucosa	Orabase® Montanov® 68 NaCMC gel Carbopol® 940 gel	Oxidation-related pathologies	[185]
PLO organogels loaded with mefenamic acid	<i>In vivo</i> on albino rats	Volini® gel	Pain and inflammation	[129]
PLO organogels loaded with silymarin	<i>Ex vivo</i> on rabbit skin	-	Atopic dermatitis (AD)	[71]
	<i>In vivo</i> on patients suffering of \times degrees of AD			
PLO + sorbitan organogels + bigels loaded with diltiazem hydrochloride	<i>In vivo</i> on albinos male rats	HPMC hydrogels	Hypertension and angina	[55]
LMOG organogel loaded with enrofloxacin	<i>Ex vivo</i> on pig ear skin	PentraVan® cream	Infectious treatment in cattle and pets	[255]
PLO organogel loaded with antiemetic agents	<i>Ex vivo</i> on pig ear skin	PentraVan®, PentraVan® Plus, Phytobase®, Lipovan®	chemotherapy-induced nausea	[256]

Since lecithin shows low acute local skin irritation and promotes the disorganization of skin lipids, which increases drug permeation, it has been largely used as a biocompatible penetration enhancer instead of conventional ones [129,133]. PLO gels have been used as drug delivery systems solubilizing a wide range and large amounts of molecules as well as avoiding drug crystal formation in micellar structures [153]. PLO gels can be either applied topically or transdermally, for local or systemic action respectively, depending on the system composition [30]. Thus, Flo and coworkers compared the permeation efficiency of melatonin through the porcine buccal mucosal samples, using two gels, one based on sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) and a PLO one. They found that, owing to strong hydrogen bonding interactions with mucin, NaCMC gels allowed the systemic delivery of melatonin with effective pharmacokinetic levels. On the contrary, PLO gels were more efficient for a local action while ensuring a photoprotective effect [185]. The presence of an external aqueous phase in PLO gels, as well as in bigels, contributes to enhance the transdermal delivery of hydrophilic drugs, such as diltiazem hydrochloride [55]. Furthermore, PLO gels also demonstrated a number of beneficial responses to topical administrations, such as hydration, warmth and moisturizing effect. They improved pathological symptoms in about 60% of patients suffering from

atopic dermatitis [71]. In addition, these authors showed that the viscosity of the resulting PLO organogels was inversely proportional to the release of encapsulated silymarin. It generated a prolonged release profile [71]. A comparative study conducted by Esposito *et al.* interestingly reported that micellar organogels composed of soybean lecithin, isopropyl palmitate and water were more suitable than an ethosome system to control i) the degradation of the antioxidant crocin and ii) the drug release by strong interactions of soybean lecithin and lipids of the stratum corneum. Indeed, high concentrations of crocin were found in the vascularized system for an optimal anti-inflammatory activity on the long term [191]. Similarly, lecithin organogels containing fenretinide, a highly degradable retinoid derivative, have been evaluated in terms of stability and shelf-life; 90% of fenretinide was maintained in the lecithin-based organostructure for up to 4 months [134].

Nonetheless, despite numerous reports on their many advantages, PLO formulations are not always able to improve permeation more efficiently than other dermal formulations. For instance, a simple suspension of roxithromycin-loaded, PCL-based NPs showed better follicular targeting of the hair bulb than ROX-loaded PLO gels. The semi-solid lipophilic micellar structure may be an advantage to promote penetration of roxithromycin through hair follicles; however, the high viscosity may impact the transport of ROX to reach the hair bulb via the dermal papilla [189]. For a deep insight in PLO organogels, patents related to PLO and their drug delivery applications in various study models, one can refer to the recent review by Alsaab and coworkers [132].

Other organogels have been evaluated for increased dermal delivery, such as sorbitan-based ones [192], lanolin-based ones [193] or 12-HSA-based ones [4]. Kamal *et al.* showed that, in the case of sorbitan ester organogel formulations, a combination of high amounts of solvents and surfactant positively impacted the permeation rate of sumatripan, which was inversely proportional to the drug concentration [192]. On the other hand, sorbitan organogels containing metronidazole displayed a concentration-independent, diffusion-based release profile, due to the low solubility of the antimicrobial drug in sesame oil [5,194,195].

5.2. Parenteral *in situ* forming implants

Organogels have also been used for the preparation of *in situ* forming systems. When injected in

the body, they undergo a sol-gel transition caused by the temperature decrease [196] or partial desolvation [40]. Active ingredients, initially present in a dissolved state in the organosol, are rapidly entrapped in the new organogel structure. The drug release kinetics is then governed by several physicochemical and biochemical mechanisms, such as diffusion, solubilization and degradation by endogenous lipases. *In situ* gel formation may also be due to one or multiple triggered stimuli like pH change, temperature modulation, mechanical stress, metal anions and solvent exchange [197,198]. Phase-inverting implants require the presence of highly water-miscible solvents, such as N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) [199] or dimethyl sulfoxide [40,200].

Owing to many advantages related to parenteral administration (high bioavailability, no first pass metabolism and rapid action), *in situ* forming organogels have been studied for the *in situ* administration of pharmaceutical molecules in the parenteral treatment of various diseases such as tumors [40,201–204] or schizophrenia [196]. Additional advantages over other existing systems are that they can easily be removed and may contribute to reduce the ‘burst’ release common with microsystems [15].

The diffusion of the water-miscible solvent can be traced by an electrical conductivity-based method [17]. Thus, adjusting the N-Stearoyl L-alanine methyl ester (SAM) organogelator concentration and the amount of water-miscible solvent (NMP) led to a strengthened network by higher H-bond levels while reducing the drug burst rate. SAM organogel implants were able to release leucopride *in vivo* up to 4 weeks due to lower enzymatic degradation and slow erosion. These SAM organogels represented an improved sustained system compared to the commercial PLGA-based injectable implant [200].

Superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPIONs)-loaded organogels have been used to formulate *in situ* implants dedicated to the minimally invasive treatment of cancer lesions by inducing local hyperthermia at cytotoxic levels for cancer cells [40]. This magnetically-induced heating formulation was based on the commercially-available polymer Onyx® and proved to be a most suitable implant in terms of tumor targeting and heat transmission. In fact, implant formation was induced through organic solvent exchange with water molecules of surrounding tissues, resulting in the entanglement of collapsing organogelator chain network. The use of cosolvents allowed increasing the magnetic particles loading and promoted a reduction of porosity, toxicity

and centered tumor implantation *in vivo*. Furthermore, the use of hydrophilic cosolvents (polyethylene glycol, propylene glycol or hydroxyethyl-lactamide) enabled limiting the induction of heat shock proteins, thus reducing systemic toxicity. However, such formulations also presented a more limited syringeability due to their high viscosity compared than single-solvent formulations. These organogels could be employed to embolize large abnormal vascular structures in synergy with chemotherapy [205]. The use of a liquid crystalline system was reported by Borgheti *et al.* as a protective system for the local delivery of siRNA in a mouse tumor xenograft model. Indeed, this precursor fluid formulation was able to promote the cellular uptake of siRNA thanks to the “proton sponge effect” as well as to limit its degradation by maintaining its structure for at least 14 days [204].

Another interesting example of *situ* gelation application is the use of paliperidone-loaded organogels [196]. This antipsychotic drug is an ideal candidate for sustained & controlled delivery. Consequently, organogels were prepared from soybean oil and various fatty acid-derived organogelators. The optimized organogel formulation acted as an *in-situ* drug depot by generating a seven-day steady drug release slow profile, based on both drug diffusion and frame erosion. Moreover, *in vivo* fluorescence imaging demonstrated the complete implant resorption in nine days. This thermo-sensitive *in situ* forming organogel system proved to be a low cost effective and non-irritant substitute for the sustained release of pharmaceutical active compounds [196]. Similarly, Nippe and General investigated injectable drospidone-loaded organogels in comparison to non-stabilized drospidone microspheres in terms of stability, relative viscosity and drug release based on viscoelastic properties. Silica organogels were able to reduce aggregation due to their high viscosity, and significantly increase drug release over microspheres [187].

In addition, Bastiat *et al.* found that the pharmacokinetics parameters of tyrosine-based, rivastigmine-loaded organogels were related to the gel composition, injected dose and volume of the implant. A sustained release of the acetylcholinesterase inhibitor was observed for more than 4 weeks *in vivo*, while inducing a significant pharmacological effect in the hypothalamus for at least 14 days [70]. Recently, Hu *et al.* demonstrated that a new phenylboronic acid-based, doxorubicine-loaded organogel was able to rapidly gel *in vivo* while inducing a localized growth

inhibition of a solid tumor for more than 8 days [202].

5.3. Oral formulations

The oral route is the safest, most common, economical, convenient way of drug administration. Nevertheless, it also suffers inconveniences such as first-pass metabolism and drug destruction by digestive enzymes. Some organogels were designed to deliver hydrophilic as well as lipophilic active ingredients via the oral route, with wide applications ranging from viral treatment [34,181,206] to rheumatoid arthritis [207]. Generally, two main advantages are considered, i.e. increasing the bioavailability of poorly-soluble drug and protecting the drug against degradation.

A noteworthy example of bioavailability enhancement is given in the work of Yu and colleagues, who created a novel organogel-based nanoemulsion for the oral delivery of curcumin, a natural bioactive compound with low oral bioavailability [141]. Permeation experiments on Caco-2 cell monolayers showed that the major absorption mechanism of curcumin-loaded nanoemulsions was a combination of lipase digestion and drug diffusion, which occurred more quickly in the nanoemulsion form rather than the organogels. In mice, the oral bioavailability of curcumin in nanoemulsions showed a 9-fold improvement compared to the free, crystalline drug. However, the authors did not provide any comparison data with the curcumin-loaded organogel. Fan and colleagues used a similar strategy to enhance β -caroten bioavailability with strikingly close success (12-time improvement) [208]. Iwanaga and colleagues used a similar approach to improve the oral bioavailability of several drugs, either hydrophilic (theophylline, ofloxacin) or lipophilic (ibuprofen and antipyrine) [186,209]. They explored organogels prepared from 12-HSA and modulated the drug release rates *in vitro* in simulated intestinal fluid. Indeed, they found that release rates were significantly slower for hydrophilic drugs (about 21–29%, in 6 hours) compared to lipophilic ones (72–77%), owing to the different drug dispersion state in the organogel matrix. Lipophilic drug molecules, completely dissolved in the organogels, were released according to a diffusion process in organogels; on the contrary, hydrophilic drug molecules needed to be dissolved before their diffusion in the organogel and then their subsequent release. Drug-loaded organogels, intraduodenally administered to rats, and compared to drug aqueous suspensions, were able to generate sustained release (10 h) and significantly increased plasma concentration.

Bigel capsules were prepared by the prilling technology to encapsulate a lipophilic active ingredient, efavirenz, an antiretroviral drug used to treat HIV / AIDS [181]. These spherical capsules (2500–3000 μm) were composed of an organogel core combining sunflower oil and 12-HSA, surrounded by a protective, calcium alginate hydrogel corona. The efavirenz release profile from bigel capsules was essentially related to the amount of organogelator in the capsule core, the presence and physical state of the alginate wall (hydrated or dried). Depending on the intestinal pH, erosion and / or diffusion mechanisms (modelled by Peppas-Korsmeyer equations) regulated drug release according to the organogelator concentration. In a later work, Pereira Camelo *et al.* showed the elaboration of two solid-like systems based on 12-HSA organogels, i) organogel beads by the prilling-assisted method and ii) cylindrical conventional organogels. The degradation kinetic of the organogels promoted by pH changes could be modulated by higher process temperatures and organogelator concentrations. efavirenz release from the different shapes of organogels involved different mechanisms. A slow drug release reaching 80% after 4h at intestinal pH was observed for organogel beads, highlighting a sure advantage over conventional solid dosage forms [206]. Nonetheless, this *in vitro* proof-of-concept needs to be backed up with *in vivo* data, in order to ascertain an improved bioavailability.

In another context, an interesting veterinarian study was conducted on the oral vaccination of Aboacre chickens using organogel-transformed food. In this study, the author coated raw rice with novel organogels containing a Newcastle disease vaccine (strain I-2) [34]. Organogels were formed from trehalose and a vegetable oil. Trehalose acted as a stabilizer against the thermal inactivation of I-2 ND virus, without the need for an additional preservative. Despite its lack of physicochemical characterization, this study provided significant data, such as stability at room temperature for prolonged periods (12 weeks) and an increased antibody response produced in 28 days, allowing a protective vaccination. Such a study demonstrates the numerous advantages of organogels, i.e. the simplicity of production, the use of natural biodegradable materials, the flexibility of storage conditions and the accessibility of vaccine production at low cost, via a simple administration route (food).

Finally, poly (acrylic acid)-based organogels have been developed for the local treatment of the

oral cavity due to their suitable adhesion properties. Furthermore, adjusting the polymer concentration caused an improved resistance to deformation and a molecular packing reorganization, positively influencing the mucoadhesive properties [152]

5.4. Ocular drug delivery

Ocular drug delivery is hampered by many anatomical factors, including the nature of the corneal epithelium, the blood-aqueous and the blood-retinal barriers. A wide range of hydrogel materials has been commercialized to date, with various successes and efficiencies [210–215]. Organogels still stand as promising materials to improve the long term release of both hydrophilic and amphiphilic drugs, biocompatibility and drug permeability. For instance, sterol-based organogels, used as transparent and rigid implants for intravitreal dexamethasone delivery, were studied [39]. Depending on the pharmaceutical-grade oil used, dexamethasone could be released from 2 months to 5.5 months *in vitro*. These preliminary results compared very well with the commercialized dexamethasone-loaded implant Ozurdex® (Allergan, USA) characterized by a 2-month drug release. Owing to their sustained release profiles, organogels are emerging as new delivery systems which might broadly improve hydrophobic drug delivery to the eye.

5.5. Nasal drug delivery systems

To date, nasal route is of considerable and growing importance since it is a more suitable, richly vascularized, highly permeable and easily accessible route of administration [216]. However, it is still scarcely investigated for organogel-based drug delivery. Pisal *et al.* investigated sorbitan monostearate-based organogels incorporating propranolol hydrochloride for sustained transnasal delivery purpose. Organogels provided an efficient gelified matrix for propranolol diffusion and allowed a sustained drug release for 8 h [217].

6. Advantages and limitations

6.1. Advantages

Thanks to their several advantages, organogels are frequently used in various applications such as food, cosmetics and pharmaceuticals.

Biodegradable and biocompatible organogels can be safe enough for a very long time and do not provoke immunogenic reactions. These particularities allow them to not be removed from the body after their administration [133,197,218]. In fact, the regulatory requirements for organogels established security protection rules against possible toxic side effects of solvent or organogelator molecules, as Epikuron (Cargill; Deutschland) and Capcithin (Cargill; Deutschland) for lecithin, Lipoid S (Lipoid kosmetik; Switzerland) and Casid (Vertellus, USA) for 12-HSA [133]. The safety of numerous organogels has been thoroughly established for various types of food and drug matrices such as Phlojel Ultra™ (JAR Pharmaceuticals; USA), Duragesic® (Johnson & Johnson; USA), PLO kits (Transderma Pharmaceuticals; Canada), Diffusimax 10 (Maxima Pharmaceuticals; Canada), PLO Gel Mediflo (Medisca; Australia) and even in cosmetics like Lancôme® Color Fever Dewy Shine lipsticks (Lancôme, France) [219]. Moreover, granted the nature of their organic phase, they also exhibit strong antimicrobial, antifungal and even antiviral activities, which allow them to be used for the treatment of wounds and burns without any eventual contamination [220,221].

Depending on their mechanical structure, organogels can absorb and encapsulate a large rate and type of drugs based on their solubility, molecular weight and chemical nature. So either hydrophilic or hydrophobic drugs can be incorporated into organogels to control their release [186]. Another particularity of organogels is their simple, topical administration able to overcome the systemic first-pass effect. Besides, lecithin organogels have been reported to increase skin partitioning and thus bioavailability of active substances [30].

As far as their physicochemical properties are concerned, they exhibit useful characteristics like thermoreversibility and thermostability. These assets enable them to maintain their supramolecular

structures for numerous temperature cycles and over long time periods [222]. They are also great light-emitting materials using energy transfer processes [223]. Photoresponsive organogels are as well promising components of microdevices, as amorphous and photoelectric systems taking advantage of the sol-gel transition triggered by stimuli such as light and temperature [17,159,224]. Compared to other systems in light-emitting technologies, they are also low cost and easy to produce [223].

6.2. *Limitations*

Despite so many advantages, organogels also present some inconveniences which impair their pharmaceutical performances and their residual architecture stability. In this context, solutions to these drawbacks are currently explored to better address the following problems.

The purity of components constituting organogels is very important. Any contamination can affect the gelation properties of organogels. In particular, the solvent contamination directly affects the organogel network stability through impaired physicochemical interactions [225]. Moreover, despite numerous established production processes, the gelation tendency between gelator and solvent molecules remains unpredictable so far, depending on the exact production conditions [80]. Control over the formation of interconnected structures is essential to structure the resulting organogel and can be modulated by factors such as steric hindrance [226], organogelator chirality [227], rigidity [5] or fluidity of the gelled system [228] and also the solvent polarity [18]. Additionally, solvent polarity is a major factor controlling aggregation or even swelling which can alter the structural stability, limiting organogel applications [229].

The decrease in gel opacity can take place when environmental conditions change and implicate a restructuration of the initially-opaque gel. It generally involves the syneresis phenomenon. Indeed, aggregation causes reorganization of organogelator molecules into fibers and, at large scale, bundles in the resulting structures. These aggregations might affect both gel strength and solvent weak interactions with the organogelator leading to the expulsion of liquid organic phase from the gel [230]. They are directly correlated to the organogelator concentration and nature, as well as storage time and temperature [231]. An interesting solution can be the use of bio-based porous

organogels that can become rapidly water-saturated on the surface, limiting the trapping of biological fluids in high proportions [76,77]. Unfortunately, they remain difficult to obtain at low cost because they need special storage conditions and are problematical to recycle without generating additional costs [76].

For a long time up to now, organogels were difficult to produce in large quantities. Henceforth, novel methods for organogel preparations using high-speed homogenization and micro-irradiations were developed, enhancing potential for large scale production [232].

7. Conclusion

In this review, we have documented recent advances in terms of organogel preparation, characterization and applications. As amply demonstrated in the literature, physicochemical properties of organogels play a central role in their formation and stabilization. They present unique characteristics including their thermodynamic behavior, viscoelasticity and versatility. These characteristics can easily be tuned by simple formulation adjustments, resulting in highly-structured architectures. Their hybridization with other materials also allows for customizing their potential as drug delivery systems. Actually, their characteristics make these structures excellent matrices with the ability to deliver an efficient drug concentration over a long period of time, thus increasing the chances for patients' adherence to the therapeutic regimen.

Despite the recent improvements, especially in terms of biocompatibility, organogels still remain largely understudied compared to other gel systems. Future perspectives should include innovations in the design of bio-based organogelators able to work with a wider range of biocompatible solvents. Biomolecules, such as peptides, proteins or immunoglobulins, should benefit from organogel *in situ* forming matrices for very prolonged releases. However, more in-depth studies of solvent and electrolyte diffusion, as well as matrix degradation and by-product elimination are needed, to better promote these innovative drug delivery systems.

Abbreviations

AFM, Atomic Force Microscopy; AOT, sodium bis-2-ethylhexyl-sulfosuccinate; AuNPs, gold nanoparticles; CGC, critical gelator concentration; CH₃OH, Methanol; chloroform, CHCl₃; Cyclo(L-Lys-L-Glu), Cyclo(L-Lysine-L-glutamic acid); DBS, 1,3:2,4-di-O-benzylidene-D-sorbitol; DMF, dimethylformamide; DSC, Differential Scanning Calorimetry; FESEM, Field Emission Scanning Microscopy; FFTEM, Freeze Fracture TEM; FTIR, Fourier-transform infrared; 12-HSA, 12-hydroxystearic acid; H-bonds, hydrogen bonds; IL, ionic liquid; MBGs, microemulsion-based gels; LMOGs, Low Molecular Weight Organogelators; MMA, methyl methacrylate; MRI, Magnetic Resonance Imaging; NaCMC, carboxymethylcellulose sodium; NP, nanoparticles; NMP, N-methyl-2-pyrrolidone; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, Nuclear Overhauser Enhancements; PEG, polyethylene glycol; PEGDA, polyethylene glycol diacrylate; Phe-Phe, phenylalanine; PLO, pluronic-lecithin organogel; POGs, polymeric organic gelators; PVA, poly(vinyl alcohol); PVDF-HFP, poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene); RT, room temperature; SAFIN, Self-Assembled Fibrillar Network; SEM, Scanning Electron Microscopy; SAM, N-Stearoyl L-alanine methyl ester; SANS, small angle neutron scattering; SARS / SAXS, Small angle x-ray scattering; Si-lipids, organoalkoxysilane-based lipids; SPION, Superparamagnetic iron oxide nanoparticle; TEM, Transmission Electron Microscopy; Tgel, sol-to-gel transition temperature; Tmelt, gel-to-sol transition temperature; Tsg, sol-to-gel phase transition; Tween, polysorbate; XRD, X-ray diffraction.

Fundings

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. Authors declare hereby no competitive interest.

Acknowledgements

C.L.E wishes to thank the Faculté de pharmacie, Université de Montréal, for her recruiting scholarship.

References

- [1] P. Baglioni, N. Bonelli, D. Chelazzi, A. Chevalier, L.G. Dei, J. Domingues, E. Fratini, R. Giorgi, M. Martin, Organogel formulations for the cleaning of easel paintings, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process* 121 (2015) 857–868.
- [2] E. Carretti, L. Dei, A. Macherelli, R.G. Weiss, Rheoreversible polymeric organogels: the art of science for art conservation, *Langmuir* 20 (2004) 8414–8418.
- [3] P. Kirilov, K. Le cong Anh, A. Denis, H. Rabehe, S. Rum, C. Villa, M. Haftek, F. Pirot, Organogels for cosmetic and dermo-cosmetic applications - classification, preparation and characterization of organogel formulations - part I, *Household Pers. Care Today* vol. 10, (2015) 15–19.
- [4] P. Kirilov, S. Rum, E. Gilbert, L. Roussel, D. Salmon, R. Abdayem, C. Serre, C. Villa, M. Haftek, F. Falson, F. Pirot, Aqueous dispersions of organogel nanoparticles - potential systems for cosmetic and dermo-cosmetic applications, *Int. J. Cosmet. Sci.* 36 (2014) 336–346.
- [5] V.K. Singh, K. Pramanik, S.S. Ray, K. Pal, Development and characterization of sorbitan monostearate and sesame oil-based organogels for topical delivery of antimicrobials, *AAPS PharmSciTech* 16 (2015) 293–305.
- [6] N. Garti, D.J. McClements, *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, 2012 Elsevier Science <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12059>.
- [7] F.R. Lupi, D. Gabriele, N. Baldino, P. Mijovic, O.I. Parisi, F. Puoci, Olive oil / policosanol organogels for nutraceutical and drug delivery purposes, *Food Funct.* 4 (2013) 1512–1520.
- [8] S. Ghosh, R.D. Mahapatra, J. Dey, Thermoreversible as well as thermoirreversible organogel formation by L-cysteine-based amphiphiles with poly(ethylene glycol) tail, *Langmuir* 30 (2014) 1677–1685.
- [9] X. Ma, X. Sun, D. Hargrove, J. Chen, D. Song, Q. Dong, X. Lu, T.-H. Fan, Y. Fu, Y. Lei, A biocompatible and biodegradable protein hydrogel with green and red autofluorescence: preparation, characterization and *in vivo* biodegradation tracking and modeling, *Sci. Rep.* 6 (2016) 19370.
- [10] A. Datar, P. Joshi, M.-Y. Lee, Biocompatible hydrogels for microarray cell printing and encapsulation, *BIOS* 5 (2015) 647–663.
- [11] E.R. Aurand, J. Wagner, C. Lanning, K.B. Bjugstad, Building biocompatible hydrogels for tissue engineering of the brain and spinal cord, *J. Funct. Biomater.* 3 (2012) 839–863.
- [12] K. Peng, I. Tomatsu, A. Kros, Light controlled protein release from a supramolecular hydrogel, *Chem. Commun.* 46 (2010) 4094–4096.
- [13] J. Zou, F. Zhang, Y. Chen, J.E. Raymond, S. Zhang, J. Fan, J. Zhu, A. Li, K. Seetho, X. He, D.J. Pochan, K.L. Wooley, Responsive organogels formed by supramolecular self assembly of PEG-block-allyl-functionalized racemic polypeptides into [small beta]-sheet-driven polymeric ribbons, *Soft Matter* 9 (2013) 5951–5958.
- [14] G. Vanitha, D. Subhashis, B.P. Hima, B.M. Niranjan, Applications of organogels in drug delivery, *Indian J. Res. Pharm. Biotechnol.* 2 (2014) 976–981.
- [15] A. Motulsky, M. Lafleur, A.C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, F. Boury, J.P. Benoit, J.C. Leroux, Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants, *Biomaterials* 26 (2005) 6242–6253.

- [16] A.C. Couffin-Hoarau, A. Motulsky, P. Delmas, J.C. Leroux, *In situ*-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives, *Pharm. Res.* 21 (2004) 454–457.
- [17] K. Wang, Q. Jia, F. Han, H. Liu, S. Li, Self-assembled L-alanine derivative organogel as *in situ* drug delivery implant: characterization, biodegradability, and biocompatibility, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36 (2010) 1511–1521.
- [18] S. Liu, W. Yu, C. Zhou, Solvents effects in the formation and viscoelasticity of DBS organogels, *Soft Matter* 9 (2013) 864–874.
- [19] G.R. Mitchell, A. Tojeira, *Controlling the Morphology of Polymers: Multiple Scales of Structure and Processing*, Springer International Publishing, 2016, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-39322-3>.
- [20] M.A. Rogers, V. Kontogiorgos, Temperature dependence of relaxation spectra for self-assembled fibrillar networks of 12-hydroxystearic acid in canola oil organogels, *Food Biophys.* 7 (2012) 132–137.
- [21] S. Murdan, Organogels in drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 489–505.
- [22] M. Suzuki, C. Setoguchi, H. Shirai, K. Hanabusa, Organogelation by polymer organogelators with a L-lysine derivative: formation of a three-dimensional network consisting of supramolecular and conventional polymers, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 13 (2007) 8193–8200.
- [23] A.K. Bajaj, S.C. Gupta, A.K. Chatterjee, Plastibase: a new base for patch testing of metal antigens, *Int. J. Dermatol.* 29 (1990) 73.
- [24] N. Pircher, S. Veigel, N. Aigner, J.M. Nedelec, T. Rosenau, F. Liebner, Reinforcement of bacterial cellulose aerogels with biocompatible polymers, *Carbohydr. Polym.* 111 (2014) 505–513.
- [25] M. Kawata, T. Suzuki, N.S. Kim, T. Ito, A. Kurita, Y. Miyagoe, S. Goto, Preparation and evaluation of Eudragit gels. II: *in vitro* release of salicylic acid, sodium salicylate, and ketoprofen from Eudragit L and S organogels, *J. Pharm. Sci.* 80 (1991) 1072–1074.
- [26] V.R.A.-C. Rivas-Orta, José Luis Rivera-Armenta, *et al.*, Synthesis and characterization of organogel from poly(acrylic acid) with cellulose acetate, *E-Polymers* 10 (2013) 1613–1621.
- [27] K. Kabiri, A. Azizi, M.J. Zohuriaan-Mehr, G.B. Marandi, H. Bouhendi, Alcohophilic gels: polymeric organogels composing carboxylic and sulfonic acid groups, *J. Appl. Polym. Sci.* 120 (2011) 3350–3356.
- [28] R. Bera, A. Dey, D. Chakrabarty, Studies on gelling characteristics of N-tertiary butyl acrylamide-acrylic acid copolymer, *Adv. Polym. Technol.* 33 (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/adv.21387>.
- [29] B.F. Szuhaj, *Lecithins: Sources, Manufacture & Uses*, American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, 1989, <http://dx.doi.org/10.1002/food.19900340429>.
- [30] R. Kumar, O.P. Katare, Lecithin organogels as a potential phospholipid-structured system for topical drug delivery: a review, *AAPS PharmSciTech* 6 (2005) E298–310.
- [31] C. Nastruzzi, R. Gambari, Antitumor activity of (trans)dermally delivered aromatic tetra-amidines, *J. Control. Release* 29 (1994) 53–62.
- [32] Z.H. Gao, W.R. Crowley, A.J. Shukla, J.R. Johnson, J.F. Reger, Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations: *in vivo* evaluation, *Pharm. Res.* 12 (1995) 864–868.
- [33] T. Péntzes, G. Blazsó, Z. Aigner, G. Falkay, I. Erős, Topical absorption of piroxicam from organogels—*in vitro* and *in vivo* correlations, *Int. J. Pharm.* 298 (2005) 47–54.

- [34] P.N. Wambura, Vaccination of chickens using raw rice coated with novel trehalose nano-organogels containing Newcastle disease (strain I-2) vaccine, *Trop. Anim. Health Prod.* 41 (2009) 797–802.
- [35] J. Cui, Y. Zheng, Z. Shen, X. Wan, Alkoxy tail length dependence of gelation ability and supramolecular chirality of sugar-appended organogelators, *Langmuir* 26 (2010) 15508–15515.
- [36] E. Tempestini, M. Bucci, V. Mastromartino, M. Gori, D. Tanini, M. Ambrosi, E. Fratini, A. Capperucci, P. Lo Nostro, Organogels from double-chained vitamin C amphiphilic derivatives, *Chemphyschem* 18 (2017) 1400–1406.
- [37] A.B. Matheson, V. Koutsos, G. Dalkas, S. Euston, P. Clegg, Microstructure of beta-sitosterol:gamma-oryzanol edible organogels, *Langmuir* 33 (2017) 4537–4542.
- [38] H. Rosemeyer, E.-M. Stürenberg, P. Herdewijn, Nucleolipids as potential organogelators, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 26 (2007) 995–999.
- [39] O. Chung, Sterol-based organogel drug delivery systems, *Chemical Engineering and Applied Chemistry*, University of Toronto, 2013, <http://dx.doi.org/10.1039/C2FD20020A>.
- [40] P.E. Le Renard, O. Jordan, A. Faes, A. Petri-Fink, H. Hofmann, D. Rufenacht, F. Bosman, F. Buchegger, E. Doelker, The *in vivo* performance of magnetic particle-loaded injectable, *in situ* gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia, *Biomaterials* 31 (2010) 691–705.
- [41] N. Teramoto, M. Shibata, Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents, *Carbohydr. Polym.* 63 (2006) 476–481.
- [42] B. Adhikari, J. Nanda, A. Banerjee, Pyrene-containing peptide-based fluorescent organogels: inclusion of graphene into the organogel, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 17 (2011) 11488–11496.
- [43] S. Bartocci, I. Morbioli, M. Maggini, M. Mba, Solvent-tunable morphology and emission of pyrene-dipeptide organogels, *J. Pept. Sci.* 21 (2015) 871–878.
- [44] H. Erdogan, H. Sakalak, M.S. Yavuz, G. Demirel, Laser-triggered degelation control of gold nanoparticle embedded peptide organogels, *Langmuir* 29 (2013) 6975–6982.
- [45] H. Geng, L. Ye, A.Y. Zhang, J. Li, Z.G. Feng, Low-molecular-weight organo- and hydrogelators based on cyclo(l-Lys-l-Glu), *Langmuir* 32 (2016) 4586–4594.
- [46] X. Liu, J. Fei, A. Wang, W. Cui, P. Zhu, J. Li, Transformation of dipeptide-based organogels into chiral crystals by cryogenic treatment, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56 (2017) 2660–2663.
- [47] Y. Liu, Y. Wang, L. Jin, T. Chen, B. Yin, MPTTF-containing tripeptide-based organogels: receptor for 2,4,6-trinitrophenol and multiple stimuli-responsive properties, *Soft Matter* 12 (2016) 934–945.
- [48] G. Palui, A. Garai, J. Nanda, A.K. Nandi, A. Banerjee, Organogels from different self-assembling new dendritic peptides: morphology, rheology, and structural investigations, *J. Phys. Chem. B* 114 (2010) 1249–1256.
- [49] C. Tomasini, N. Zanna, Oxazolidinone-containing pseudopeptides: supramolecular materials, fibers, crystals, and gels, *Biopolymers* 108 (2017), <http://dx.doi.org/10.1002/bip.22898>.
- [50] P. Zhu, X. Yan, Y. Su, Y. Yang, J. Li, Solvent-induced structural transition of self-assembled dipeptide: from organogels to microcrystals, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 3176–3183.

- [51] A. Chakrabarty, U. Maitra, Organogels from dimeric bile acid esters: *in situ* formation of gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 8039–8046.
- [52] S.S. Sagiri, K. Pal, P. Basak, Encapsulation of animal wax-based organogels in alginate microparticles, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/app.40910>.
- [53] A.J. Martins, M.A. Cerqueira, L.H. Fasolin, R.L. Cunha, A.A. Vicente, Beeswax organogels: influence of gelator concentration and oil type in the gelation process, *Food Res. Int.* 84 (2016) 170–179.
- [54] M. Dandapat, D. Mandal, Local viscosity and solvent relaxation experienced by rod-like fluorophores in AOT/4-chlorophenol/m-xylene organogels, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 170 (2017) 150–156.
- [55] M.M. Ibrahim, S.A. Hafez, M.M. Mahdy, Organogels, hydrogels and bigels as transdermal delivery systems for diltiazem hydrochloride, *Asian J. Pharm. Sci.* 8 (2013) 48–57.
- [56] J.M. Guenet, *Organogels: Thermodynamics, Structure, Solvent Role, and Properties*, Springer International Publishing, 2016, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-33178-2>.
- [57] H. Almeida, M.H. Amaral, P. Lobao, J.M. Lobo, Pluronic(R) F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 15 (2012) 592–605.
- [58] K. Trickett, H. Brice, O. Myakonkaya, J. Eastoe, S.E. Rogers, R.K. Heenan, I. Grillo, Microemulsion-based organogels containing inorganic nanoparticles, *Soft Matter* 6 (2010) 1291–1296.
- [59] S. Pradhan, S.S. Sagiri, V.K. Singh, K. Pal, S.S. Ray, D.K. Pradhan, Palm oil-based organogels and microemulsions for delivery of antimicrobial drugs, *J. Appl. Polym. Sci.* 131 (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/app.39979>.
- [60] C. Bhattacharya, N. Kumar, S.S. Sagiri, K. Pal, S.S. Ray, Development of span 80 - tween 80 based fluid-filled organogels as a matrix for drug delivery, *J. Pharm. Bioallied Sci.* 4 (2012) 155–163.
- [61] M. Löfman, J. Koivukorpi, V. Noponen, H. Salo, E. Sievänen, Bile acid alkylamide derivatives as low molecular weight organogelators: systematic gelation studies and qualitative structural analysis of the systems, *J. Colloid Interface Sci.* 360 (2011) 633–644.
- [62] L. Zhang, T. Jiao, K. Ma, R. Xing, Y. Liu, Y. Xiao, J. Zhou, Q. Zhang, Q. Peng, Self-assembly and drug release capacities of organogels via some amide compounds with aromatic substituent headgroups, *Materials* 9 (2016) 541.
- [63] X. Cao, M. Zhang, K. Liu, Y. Mao, H. Lan, B. Liu, T. Yi, Formation and regulation of supramolecular chirality in organogel via addition of tartaric acid, *Chin. Sci. Bull.* 57 (2012) 4272–4277.
- [64] G. Haering, A. Pessina, F. Meusdoerffer, S. Hochkoeppler, P.L. Luisi, Solubilization of bacterial cells in organic solvents via reverse micelles and microemulsions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 506 (1987) 337–344.
- [65] X.Y. Xuan, Y.L. Cheng, E. Acosta, Lecithin-linker microemulsion gelatin gels for extended drug delivery, *Pharmaceutics* 4 (2012) 104–129.
- [66] P. Xing, H. Chen, L. Bai, A. Hao, Y. Zhao, Superstructure formation and topological evolution achieved by self-organization of a highly adaptive dynamer, *ACS Nano* 10 (2016) 2716–2727.

- [67] M.R. Zahi, P. Wan, H. Liang, Q. Yuan, Formation and stability of D-limonene organogel-based nanoemulsion prepared by a high-pressure homogenizer, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 12563–12569.
- [68] H. Yu, K. Shi, D. Liu, Q. Huang, Development of a food-grade organogel with high bioaccessibility and loading of curcuminoids, *Food Chem.* 131 (2012) 48–54.
- [69] M.E. Morales, V. Gallardo, B. Clares, M.B. Garcia, M.A. Ruiz, Study and description of hydrogels and organogels as vehicles for cosmetic active ingredients, *J. Cosmet. Sci.* 60 (2009) 627–636.
- [70] G. Bastiat, F. Plourde, A. Motulsky, A. Furtos, Y. Dumont, R. Quirion, G. Fuhrmann, J.C. Leroux, Tyrosine-based rivastigmine-loaded organogels in the treatment of Alzheimer's disease, *Biomaterials* 31 (2010) 6031–6038.
- [71] F.M. Mady, H. Essa, T. El-Ammawi, H. Abdelkader, A.K. Hussein, Formulation and clinical evaluation of silymarin pluronic-lecithin organogels for treatment of atopic dermatitis, *Drug Des. Dev. Ther.* 10 (2016) 1101–1110.
- [72] M. Suzuki, K. Hanabusa, Polymer organogelators that make supramolecular organogels through physical cross-linking and self-assembly, *Chem. Soc. Rev.* 39 (2010) 455–463.
- [73] L. Lukyanova, S. Franceschi-Messant, P. Vicendo, E. Perez, I. Rico-Lattes, R. Weinkamer, Preparation and evaluation of microporous organogel scaffolds for cell viability and proliferation, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 79 (2010) 105–112.
- [74] L. Lukyanova, R. Castangia, S. Franceschi-Messant, E. Perez, I. Rico-Lattes, Soft microporous green materials from natural soybean oil, *ChemSusChem* 1 (2008) 514–518.
- [75] Y. Marui, A. Kikuzawa, T. Kida, M. Akashi, Unique organogel formation with macroporous materials constructed by the freeze-drying of aqueous cyclodextrin solutions, *Langmuir* 26 (2010) 11441–11445.
- [76] E. Perez, S. Franceschi-Messant, I. Rico-Lattes, J.C. Garrigues, Microporous Organogel Absorbing / Solubilising Materials, in US patent 9475045 B2 (2014).
- [77] E. Perez, S. Franceschi-Messant, I. Rico-Lattes, J.C. Garrigues, Absorbent / Solubilizing Materials Based on Microporous Organogels, in US patent 9421539 B2 (2015).
- [78] J.L. Li, R.Y. Wang, X.Y. Liu, H.H. Pan, Nanoengineering of a biocompatible organogel by thermal processing, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 5011–5015.
- [79] M. Khuphe, B. Mukonoweshuro, A. Kazlauciuonas, P.D. Thornton, A vegetable oil-based organogel for use in pH-mediated drug delivery, *Soft Matter* 11 (2015) 9160–9167.
- [80] R. Angelico, A. Ceglie, G. Colafemmina, F. Lopez, S. Murgia, U. Olsson, G. Palazzo, Biocompatible lecithin organogels: structure and phase equilibria, *Langmuir* 21 (2005) 140–148.
- [81] Z. Li, J. Cao, B. Hu, H. Li, H. Liu, F. Han, Z. Liu, C. Tong, S. Li, Studies on the *in vitro* and *in vivo* degradation behavior of amino acid derivative-based organogels, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42 (2016) 1732–1741.
- [82] S.S. Sagiri, J. Sethy, K. Pal, I. Banerjee, K. Pramanik, T.K. Maiti, Encapsulation of vegetable organogels for controlled delivery applications, *Designed Monomers Polym.* 16 (2013) 366–376.
- [83] R.K. Das, R. Kandanelli, J. Linnanto, K. Bose, U. Maitra, Supramolecular chirality in organogels: a detailed spectroscopic, morphological, and rheological investigation of gels (and xerogels) derived from alkyl pyrenyl urethanes, *Langmuir* 26 (2010) 16141–16149.
- [84] S. Maity, P. Das, M. Reches, Inversion of supramolecular chirality by sonication-induced organogelation, *Sci. Rep.* 5 (2015) 16365.

- [85] P. Duan, H. Cao, L. Zhang, M. Liu, Gelation induced supramolecular chirality: chirality transfer, amplification and application, *Soft Matter* 10 (2014) 5428–5448.
- [86] A. Vintiloiu, J.-C. Leroux, Organogels and their use in drug delivery — A review, *J. Control. Release* 125 (2008) 179–192.
- [87] S. Gao, S. Wang, J. Ma, Y. Wu, X. Fu, R.K. Marella, K. Liu, Y. Fang, Salt tunable rheology of thixotropic supramolecular organogels and their applications for crystallization of organic semiconductors, *Langmuir* 32 (2016) 12805–12813.
- [88] G. Yu, X. Yan, C. Han, F. Huang, Characterization of supramolecular gels, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6697–6722.
- [89] E.R. Draper, D.J. Adams, Photoresponsive gelators, *Chem. Commun.* 52 (2016) 8196–8206.
- [90] J.H. Fuhrhop, W. Helfrich, Fluid and solid fibers made of lipid molecular bilayers, *Chem. Rev.* 93 (1993) 1565–1582.
- [91] P. Terech, R.G. Weiss, Low molecular mass gelators of organic liquids and the properties of their gels, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3133–3160.
- [92] A. Brizard, R. Oda, I. Huc, Chirality effects in self-assembled fibrillar networks, *Low Molecular Mass Gelator*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2005, pp. 167–218.
- [93] D.J. Abdallah, S.A. Sirchio, R.G. Weiss, Hexatriacontane organogels. The first determination of the conformation and molecular packing of a low-molecular-mass organogelator in its gelled state, *Langmuir* 16 (2000) 7558–7561.
- [94] M. Laupheimer, T. Sottmann, R. Schweins, C. Stubenrauch, Studying orthogonal self-assembled systems: microstructure of gelled bicontinuous microemulsions, *Soft Matter* 10 (2014) 8744–8757.
- [95] R. Maffezzoni, M. Zanda, Stable organogels derived from triazines functionalized with chiral α -amino acid derivatives, *Tetrahedron Lett.* 49 (2008) 5129–5132.
- [96] K.E. Geckeler, H. Nishide, *Front Matter in Advanced Nanomaterials*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2009, <http://dx.doi.org/10.1002/9783527628940.fmatter>.
- [97] N.M. Murashova, E.V. Yurtov, Lecithin organogels as prospective functional nanomaterial, *Nanotechnologies in Russia* 10 (2015) 511–522.
- [98] S. Vierros, M. Sammalkorpi, Role of hydration in phosphatidylcholine reverse micelle structure and gelation in cyclohexane: a molecular dynamics study, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17 (2015) 14951–14960.
- [99] M. Suzuki, S. Owa, H. Shirai, K. Hanabusa, Poly(dimethylsiloxane)-based polymer organogelators with L-lysine derivatives as a organogelation-causing segment, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 44 (2006) 3817–3824.
- [100] Y. Tasaki-Handa, Y. Abe, K. Ooi, Fabrication of a monolithic cryogel from the cyclohexane organogel of a coordination polymer based on a phosphoester, *RSC Adv.* 6 (2016) 71404–71408.
- [101] Y. Peng, Y. Feng, G.-J. Deng, Y.-M. He, Q.-H. Fan, From weakness to strength: C–H/ π -interaction-guided self-assembly and gelation of poly(benzyl ether) dendrimers, *Langmuir* 32 (2016) 9313–9320.
- [102] P.D. Wadhavane, M.A. Izquierdo, F. Galindo, M.I. Burguete, S.V. Luis, Organogel-quantum dots hybrid materials displaying fluorescence sensitivity and structural stability towards nitric oxide, *Soft Matter* 8 (2012) 4373–4381.

- [103] X. Huiyun, P. Junxia, L. Kaiqiang, L. Chen, F. Yu, Preparation and gas sensing properties of novel CdS-supramolecular organogel hybrid films, *J. Phys. D. Appl. Phys.* 41 (2008) 105405.
- [104] W.J. Peveler, J.C. Bear, P. Southern, I.P. Parkin, Organic-inorganic hybrid materials: nanoparticle containing organogels with myriad applications, *Chem. Commun.* 50 (2014) 14418–14420.
- [105] Y.-T. Shen, C.-H. Li, K.-C. Chang, S.-Y. Chin, H.-A. Lin, Y.-M. Liu, C.-Y. Hung, H.-F. Hsu, S.-S. Sun, Synthesis, optical, and mesomorphic properties of self-assembled organogels featuring phenylethynyl framework with elaborated long-chain pyridine-2,6-dicarboxamides, *Langmuir* 25 (2009) 8714–8722.
- [106] T. Zhang, Q. Guo, Polyoxometalate-based hybrid organogels prepared from a triblock copolymer via charge-driven assembly, *RSC Adv.* 4 (2014) 35055–35058.
- [107] T. Zhang, Y. Wu, Z. Xu, Q. Guo, Hybrid high internal phase emulsion (HIPE) organogels with oil separation properties, *Chem. Commun.* 50 (2014) 13821–13824.
- [108] K. Akkarachaneeyakorn, M. Li, J. Harris, S.A. Davis, S. Mann, Bioactive hybrid organogels based on miniemulsion synthesis of morphologically complex polymer / surfactant / calcium phosphate nanostructures, *Chem. Mater.* 26 (2014) 5965–5972.
- [109] D.D. Diaz, J.J. Cid, P. Vazquez, T. Torres, Strength enhancement of nanostructured organogels through inclusion of phthalocyanine-containing complementary organogelator structures and *in situ* cross-linking by click chemistry, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 14 (2008) 9261–9273.
- [110] N. Luisier, K. Schenk, K. Severin, A four-component organogel based on orthogonal chemical interactions, *Chem. Commun.* 50 (2014) 10233–10236.
- [111] C.H. Fox, G.M. ter Hurne, R.J. Wojtecki, G.O. Jones, H.W. Horn, E.W. Meijer, C.W. Frank, J.L. Hedrick, J.M. García, Supramolecular motifs in dynamic covalent PEG-hemiaminal organogels, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7417.
- [112] Y. Higaki, H. Otsuka, A. Takahara, A thermodynamic polymer cross-linking system based on radically exchangeable covalent bonds, *Macromolecules* 39 (2006) 2121–2125.
- [113] C. Yang, M. Sun, X. Wang, G. Wang, A novel flexible supercapacitor based on cross-linked PVDF-HFP porous organogel electrolyte and carbon nanotube paper@ π -conjugated polymer film electrodes, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 3 (2015) 2067–2076.
- [114] I.F. Almeida, A.R. Fernandes, L. Fernandes, M.R. Pena Ferreira, P.C. Costa, M.F. Bahia, Moisturizing effect of oleogel/hydrogel mixtures, *Pharm. Dev. Technol.* 13 (2008) 487–494.
- [115] F.R. Lupi, L. Gentile, D. Gabriele, S. Mazzulla, N. Baldino, B. de Cindio, Olive oil and hyperthermal water bigels for cosmetic uses, *J. Colloid Interface Sci.* 459 (2015) 70–78.
- [116] B. Behera, S.S. Sagiri, V.K. Singh, K. Pal, A. Anis, Mechanical properties and delivery of drug / probiotics from starch and non-starch based novel bigels: a comparative study, *Starch-Starke* 66 (2014) 865–879.
- [117] V.K. Singh, A. Anis, I. Banerjee, K. Pramanik, M.K. Bhattacharya, K. Pal, Preparation and characterization of novel carbopol based bigels for topical delivery of metronidazole for the treatment of bacterial vaginosis, *Mater. Sci. Eng. C* 44 (2014) 151–158.
- [118] V.K. Singh, I. Banerjee, T. Agarwal, K. Pramanik, M.K. Bhattacharya, K. Pal, Guar gum and sesame oil based novel bigels for controlled drug delivery, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 123 (2014) 582–592.

- [119] B. Behera, S.S. Sagiri, K. Pal, K. Pramanik, U.A. Rana, I. Shakir, A. Anis, Sunflower oil and protein-based novel bigels as matrices for drug delivery applications- characterization and *in vitro* antimicrobial efficiency, *Polym.-Plast. Technol. Eng.* 54 (2015) 837–850.
- [120] A.R. Patel, B. Mankoc, M.D. Bin Sintang, A. Lesaffer, K. Dewettinck, Fumed silica-based organogels and 'aqueous-organic' bigels, *RSC Adv.* 5 (2015) 9703–9708.
- [121] F.R. Lupi, V. Greco, N. Baldino, B. de Cindio, P. Fischer, D. Gabriele, The effects of intermolecular interactions on the physical properties of organogels in edible oils, *J. Colloid Interface Sci.* 483 (2016) 154–164.
- [122] N. Marković, M. Ginić-Marković, N.K. Dutta, Benzene physical and chemical organogels: effect of network scaffolding on the thermodynamic behavior of entrapped solvent molecules, *J. Appl. Polym. Sci.* 94 (2004) 1253–1264.
- [123] W.-C. Lai, S.-J. Tseng, Y.-S. Chao, Effect of hydrophobicity of monomers on the structures and properties of 1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol organogels and polymers prepared by templating the gels, *Langmuir* 27 (2011) 12630–12635.
- [124] S. Sahoo, N. Kumar, C. Bhattacharya, S.S. Sagiri, K. Jain, K. Pal, S.S. Ray, B. Nayak, Organogels: properties and applications in drug delivery, *Designed Monomers Polym.* 14 (2011) 95–108.
- [125] R. Luboradzki, O. Gronwald, A. Ikeda, S. Shinkai, Sugar-integrated “Supergelators” which can form organogels with 0.03–0.05 % [g·mL⁻¹], *Chem. Lett.* 29 (2000) 1148–1149.
- [126] O. Gronwald, S. Shinkai, Sugar-integrated gelators of organic solvents, *Chemistry* 7 (2001) 4328–4334.
- [127] K. Leivo, Gelation and Gel Properties of Two- and Three-component Pyrene Based Low Molecular Weight Organogelators, Department of Chemistry, in University of Jyväskylä, 2011.
- [128] L. Allen, The history of pluronic lecithin organogel: an interview with Marty Jones, *Int. J. Pharm. Compound.* 7 (2003) 180–182.
- [129] V. Jhawat, S. Gupta, V. Saini, Formulation and evaluation of novel controlled release of topical pluronic lecithin organogel of mefenamic acid, *Drug Deliv.* 23 (2016) 3573–3581.
- [130] P. Jain, R.B. Umamaheswari, N.K. Jain, Hydrogel – a novel drug delivery systems, *Indian Drugs* 39 (2002) 243–256.
- [131] M. Pandey, V. Belgamwar, S. Gattani, S. Surana, A. Tekade, Pluronic lecithin organogel as a topical drug delivery system, *Drug Deliv.* 17 (2010) 38–47.
- [132] H. Alsaab, S.P. Bonam, D. Bahl, P. Chowdhury, K. Alexander, S.H. Boddu, Organogels in drug delivery: a special emphasis on pluronic lecithin organogels, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 19 (2016) 252–273.
- [133] S. Raut, S.S. Bhadoriya, V. Uplanchiwar, V. Mishra, A. Gahane, S.K. Jain, Lecithin organogel: a unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging, *Acta Pharm. Sin. B* 2 (2012) 8–15.
- [134] E. Esposito, E. Menegatti, R. Cortesi, Design and characterization of fenretinide containing organogels, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 383–389.
- [135] E. Perez, S. Franceschi-Messant, I. Rico-Lattes, J.C. Guarrigues, Microporous organogel absorbing / solubilising materials, in US patent 9475045 B2 (2016).
- [136] W.W. Zhang, N. Wang, L. Zhang, W.X. Wu, C.L. Hu, X.Q. Yu, Effects of additives on lipase immobilization in microemulsion-based organogels, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172 (2014) 3128–3140.

- [137] I.V. Pavlidis, K. Tzafestas, H. Stamatis, Water-in-ionic liquid microemulsion-based organogels as novel matrices for enzyme immobilization, *Biotechnol. J.* 5 (2010) 805–812.
- [138] S.S. Sagiri, A. Anis, K. Pal, Review on encapsulation of vegetable oils: strategies, preparation methods, and applications, *Polym.-Plast. Technol. Eng.* 55 (2016) 291–311.
- [139] S.S. Sagiri, K. Pal, P. Basak, U.A. Rana, I. Shakir, A. Anis, Encapsulation of sorbitan ester-based organogels in alginate microparticles, *AAPS PharmSciTech* 15 (2014) 1197–1208.
- [140] S.S. Sagiri, V.K. Singh, I. Banerjee, K. Pramanik, P. Basak, K. Pal, Core-shell-type organogel-alginate hybrid microparticles: a controlled delivery vehicle, *Chem. Eng. J.* 264 (2015) 134–145.
- [141] H. Yu, Q. Huang, Improving the oral bioavailability of curcumin using novel organogel-based nanoemulsions, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 5373–5379.
- [142] M. Lu, Y. Cao, C.-T. Ho, Q. Huang, Development of organogel-derived capsaicin nanoemulsion with improved bioaccessibility and reduced gastric mucosa irritation, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 4735–4741.
- [143] P. Kirilov, F. Gauffre, S. Franceschi-Messant, E. Perez, I. Rico-Lattes, Rheological characterization of a new type of colloidal dispersion based on nanoparticles of gelled oil, *J. Phys. Chem. B* 113 (2009) 11101–11108.
- [144] B. Martin, F. Brouillet, S. Franceschi, E. Perez, Evaluation of organogel nanoparticles as drug delivery system for lipophilic compounds, *AAPS PharmSciTech* 18 (2016) 1261–1269.
- [145] A. Kotal, T.K. Paira, S. Banerjee, T.K. Mandal, Ultrasound-induced *in situ* formation of coordination organogels from isobutyric acids and zinc oxide nanoparticles, *Langmuir* 26 (2010) 6576–6582.
- [146] P. Terech, D. Pasquier, V. Bordas, C. Rossat, Rheological properties and structural correlations in molecular organogels, *Langmuir* 16 (2000) 4485–4494.
- [147] K. Hanabusa, M. Suzuki, Development of low-molecular-weight gelators and polymer-based gelators, *Polym. J.* 46 (2014) 776–782.
- [148] R. Kandaneli, U. Maitra, Charge-transfer interaction mediated organogels from bile acid appended anthracenes: rheological and microscopic studies, *Photochem. Photobiol. Sci.* 11 (2012) 1724–1729.
- [149] J. Bonnet, G. Suissa, M. Raynal, L. Bouteiller, Organogel formation rationalized by Hansen solubility parameters: dos and don'ts, *Soft Matter* 10 (2014) 3154–3160.
- [150] C.V. Nikiforidis, E.P. Gilbert, E. Scholten, Organogel formation via supramolecular assembly of oleic acid and sodium oleate, *RSC Adv.* 5 (2015) 47466–47475.
- [151] X. Ran, L. Shi, K. Zhang, J. Lou, B. Liu, L. Guo, The gelation ability and morphology study of organogel system based on calamitic hydrazide derivatives, *J. Nanomater.* 2015 (2015), <http://dx.doi.org/10.1155/2015/357875>.
- [152] D.S. Jones, B.C. Muldoon, A.D. Woolfson, F.D. Sanderson, An examination of the rheological and mucoadhesive properties of poly(acrylic acid) organogels designed as platforms for local drug delivery to the oral cavity, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 2632–2646.
- [153] T. Osmatek, B. Milanowski, A. Froelich, S. Górska, W. Białas, M. Szybowicz, M. Kapela, Novel organogels for topical delivery of naproxen: design, physicochemical characteristics and *in vitro* drug permeation, *Pharm. Dev. Technol.* 22 (2017) 521–536.

- [154] V.A. Mallia, P. Terech, R.G. Weiss, Correlations of properties and structures at different length scales of hydro- and organogels based on N-Alkyl-(R)-12-hydroxyoctadecylammonium chlorides, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 12401–12414.
- [155] Y. Feng, Y.M. He, Q.H. Fan, Supramolecular organogels based on dendrons and dendrimers, *Chem. Asian. J.* 9 (2014) 1724–1750.
- [156] C. Dou, C. Wang, H. Zhang, H. Gao, Y. Wang, Novel urea-functionalized quinacridone derivatives: ultrasound and thermo effects on supramolecular organogels, *Chem. Eur. J.* 16 (2010) 10744–10751.
- [157] P. Fei, S.J. Wood, Y. Chen, K.A. Cavicchi, Maximum bubble pressure rheology of low molecular mass organogels, *Langmuir* 31 (2015) 492–498.
- [158] X. Luo, Z. Li, W. Xiao, Q. Wang, J. Zhong, Self-assembled organogels formed by monochain derivatives of ethylenediamine, *J. Colloid Interface Sci.* 336 (2009) 803–807.
- [159] Y. Ma, H. Ma, Z. Yang, J. Ma, Y. Su, W. Li, Z. Lei, Methyl cinnamate-derived fluorescent rigid organogels based on cooperative π - π stacking and C]O \cdots π interactions instead of H-bonding and alkyl chains, *Langmuir* 31 (2015) 4916–4923.
- [160] T. Nakamura, X. Chu, T. Shimasaki, M. Shibata, Organogelation behavior and thermal properties of supramolecular polymer network composed of carboxy- and pyridyl-terminated 4-arm star-shaped epsilon-caprolactone oligomers, *J. Colloid Interface Sci.* 404 (2013) 8–15.
- [161] M.R. Rao, S.-S. Sun, Supramolecular assemblies of amide-derived organogels featuring rigid π -conjugated phenylethynyl frameworks, *Langmuir* 29 (2013) 15146–15158.
- [162] S. Seo, J. Park, J. Chang, Organogels based on 1H-imidazolecarboxamide amphiphiles, *Langmuir* 25 (2009) 8439–8441.
- [163] J.L. Li, X.Y. Liu, *Soft Fibrillar Materials: Fabrication and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2013, <http://dx.doi.org/10.1002/9783527648047>.
- [164] K. Jang, A.D. Ranasinghe, C. Heske, D.-C. Lee, Organogels from functionalized T-shaped π -conjugated bisphenazines, *Langmuir* 26 (2010) 13630–13636.
- [165] M. Takafuji, N. Azuma, K. Miyamoto, S. Maeda, H. Ihara, Polycondensation and stabilization of chirally ordered molecular organogels derived from alkoxyethyl group-containing L-glutamide lipid, *Langmuir* 25 (2009) 8428–8433.
- [166] A.M. Pierce, P.J. Maslanka, A.J. Carr, K.S. McCain, Using fourier transform infrared spectroscopy to examine structure in bisurea organogels, *Appl. Spectrosc.* 61 (2007) 379–387.
- [167] D. Capitani, A.L. Segre, R. Sparapani, M. Giustini, R. Scartazzini, P.L. Luisi, Lecithin microemulsion gels: a NMR study of molecular mobility based on line widths, *Langmuir* 7 (1991) 250–253.
- [168] M. Bielejewski, J. Tritt-Goc, Evidence of solvent-gelator interaction in sugar-based organogel studied by field-cycling NMR relaxometry, *Langmuir* 26 (2010) 17459–17464.
- [169] Y.E. Shapiro, Structure and dynamics of hydrogels and organogels: an NMR spectroscopy approach, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 1184–1253.
- [170] E. Christ, C. Blanc, A. Al Ouahabi, D. Maurin, R. Le Parc, J.-L. Bantignies, J.-M. Guenet, D. Collin, P.J. Mésini, Origin of invariant gel melting temperatures in the c–T phase diagram of an organogel, *Langmuir* 32 (2016) 4975–4982.
- [171] X. Shen, T. Jiao, Q. Zhang, H. Guo, Y. Lv, J. Zhou, F. Gao, Nanostructures and self-assembly of organogels via benzimidazole / benzothiazole imide derivatives with different

- alkyl substituent chains, *J. Nanomater.* 2013 (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/409087>.
- [172] S.S. Sagiri, U. Kumar, B. Champaty, V.K. Singh, K. Pal, Thermal, electrical, and mechanical properties of tween 80 / span 80-based organogels and its application in iontophoretic drug delivery, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2015), <http://dx.doi.org/10.1002/app.41419>.
- [173] H. Takeno, A. Maehara, D. Yamaguchi, S. Koizumi, A structural study of an organogel investigated by small-angle neutron scattering and synchrotron small-angle X-ray scattering, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 7739–7745.
- [174] J.F. Toro-Vazquez, J. Morales-Rueda, A. Torres-Martínez, M.A. Charó-Alonso, V.A. Mallia, R.G. Weiss, Cooling rate effects on the microstructure, solid content, and rheological properties of organogels of amides derived from stearic and (R)-12-hydroxystearic acid in vegetable oil, *Langmuir* 29 (2013) 7642–7654.
- [175] A.N. Khan, M. Schmutz, J. Lacava, A. Al Ouahabi, T.-T.-T. Nguyen, P.J. Mesini, J.-M. Guenet, Design of nanohybrid systems from a partially fluorinated organogelator and syndiotactic polystyrene thermoreversible gel, *Langmuir* 31 (2015) 7666–7672.
- [176] L.S. Dassanayake, D.R. Kodali, S. Ueno, K. Sato, Crystallization kinetics of organogels prepared by rice bran wax and vegetable oils, *J. Oleo Sci.* 61 (2012) 1–9.
- [177] P. Kirilov, K. Le Cong Anh, A. Denis, H. Rabehi, S. Rum, C. Villa, M. Haftek, F. Pirot, Organogels for cosmetic and dermo-cosmetic applications - classification, preparation and characterization of organogel formulations - part 2, *Household Pers. Care Today* 10 (2015) 16–20.
- [178] K. Rajpoot, Acyclovir-loaded sorbitan esters-based organogel: development and rheological characterization, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 45 (2017) 551–559.
- [179] S. Elekdag-Turk, T. Turk, D. Isci, N. Ozkalayci, Thermocycling effects on shear bond strength of a self-etching primer, *Angle Orthod.* 78 (2008) 351–356.
- [180] L. Allen, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Wolters Kluwer Health, 2014.
- [181] S.R. Pereira Camelo, Encapsulation of Hydrophobic Molecules by Bi-gels Structures Managed by Prilling: Structure-properties, Chemical and Process Engineering, in *Ecole des Mines d'Albi-Carmaux, 2015 French* <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01178199>.
- [182] J.C.B. Rocha, J.D. Lopes, M.C.N. Mascarenhas, D.B. Arellano, L.M.R. Guerreiro, R.L. da Cunha, Thermal and rheological properties of organogels formed by sugarcane or candelilla wax in soybean oil, *Food Res. Int.* 50 (2013) 318–323.
- [183] W. Chen, Y. Yang, C.H. Lee, A.Q. Shen, Confinement effects on the self-assembly of 1,3:2,4-Di-p-methylbenzylidene sorbitol based organogel, *Langmuir* 24 (2008) 10432–10436.
- [184] S. Sanwlani, P. Kumar, H.B. Bohidar, Hydration of gelatin molecules in glycerol-water solvent and phase diagram of gelatin organogels, *J. Phys. Chem. B* 115 (2011) 7332–7340.
- [185] A. Flo, A.C. Calpena, L. Halbaut, E.I. Araya, F. Fernandez, B. Clares, Melatonin delivery: transdermal and transbuccal evaluation in different vehicles, *Pharm. Res.* 33 (2016) 1615–1627.
- [186] K. Iwanaga, M. Kawai, M. Miyazaki, M. Kakemi, Application of organogels as oral controlled release formulations of hydrophilic drugs, *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 869–872.
- [187] S. Nippe, S. General, Investigation of injectable drospirenone organogels with regard to their rheology and comparison to non-stabilized oil-based drospirenone suspensions, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41 (2015) 681–691.

- [188] D. Salmon, E. Gilbert, B. Gioia, M. Haftek, C. Pivot, B. Verrier, F. Pirot, New easy handling and sampling device for bioavailability screening of topical formulations, *Eur. J. Dermatol.* 25 (Suppl. 1) (2015) 23–29.
- [189] E. Glowka, H. Wosicka-Frackowiak, K. Hyla, J. Stefanowska, K. Jastrzebska, L. Klapiszewski, T. Jesionowski, K. Cal, Polymeric nanoparticles-embedded organogel for roxithromycin delivery to hair follicles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88 (2014) 75–84.
- [190] D.L. Barton, E.J. Wos, R. Qin, B.I. Mattar, N.B. Green, K.S. Lanier, J.D. Bearden III, J.W. Kugler, K.L. Hoff, P.S. Reddy, K.M. Rowland Jr., M. Riepl, B. Christensen, C.L. Loprinzi, A double-blind, placebo-controlled trial of a topical treatment for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: NCCTG trial N06CA, *Support. Care Cancer* 19 (2011) 833–841.
- [191] E. Esposito, M. Drechsler, N. Huang, G. Pavoni, R. Cortesi, D. Santonocito, C. Puglia, Ethosomes and organogels for cutaneous administration of crocin, *Biomed. Microdevices* 18 (2016) 108.
- [192] K.K. Upadhyay, C. Tiwari, A.J. Khopade, H.B. Bohidar, S.K. Jain, Sorbitan ester organogels for transdermal delivery of sumatriptan, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33 (2007) 617–625.
- [193] G. Sharma, N. Devi, K. Thakur, A. Jain, O.P. Katare, Lanolin-based organogel of salicylic acid: evidences of better dermatokinetic profile in imiquimod-induced keratolytic therapy in BALB/c mice model, *Drug Deliv. Transl. Res.* (2017) 1–16.
- [194] H. Bunzen, E. Kolehmainen, *In situ* formation of steroidal supramolecular gels designed for drug release, *Molecules* 18 (2013) 3745–3759.
- [195] P. Xue, J. Sun, Q. Xu, R. Lu, M. Takafuji, H. Ihara, Anion response of organogels: dependence on intermolecular interactions between gelators, *Org. Biomol. Chem.* 11 (2013) 1840–1847.
- [196] D. Wang, J. Zhao, X. Liu, F. Sun, Y. Zhou, L. Teng, Y. Li, Parenteral thermo-sensitive organogel for schizophrenia therapy, *in vitro* and *in vivo* evaluation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 60 (2014) 40–48.
- [197] M. Madan, A. Bajaj, S. Lewis, N. Udupa, J.A. Baig, *In situ* forming polymeric drug delivery systems, *Ind. J. Pharm. Sci.* 71 (2009) 242–251.
- [198] A. Hatefi, B. Amsden, Biodegradable injectable *in situ* forming drug delivery systems, *J. Control. Release* 80 (2002) 9–28.
- [199] Z. Li, J. Cao, H. Li, H. Liu, F. Han, Z. Liu, C. Tong, S. Li, Self-assembled drug delivery system based on low-molecular-weight bis-amide organogelator: synthesis, properties and *in vivo* evaluation, *Drug Deliv.* 23 (2016) 3168–3178.
- [200] F. Plourde, A. Motulsky, A.-C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, H. Ong, J.-C. Leroux, First report on the efficacy of L-alanine-based *in situ*-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *J. Control. Release* 108 (2005) 433–441.
- [201] W. Wu, H. Chen, F. Shan, J. Zhou, X. Sun, L. Zhang, T. Gong, A Novel Doxorubicin-Loaded *in situ* forming gel based high concentration of phospholipid for intratumoral drug delivery, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 3378–3385.
- [202] Y. Hu, L. Xu, C. Zhou, H. Wu, W. Gao, Intratumoral injectable *in situ*-forming low-molecular-weight organogels against subcutaneous tumor, *Nanomedicine* 12 (2015) 517.
- [203] L.N. Borgheti-Cardoso, L.V. Depieri, S.A.A. Kooijmans, H. Diniz, R.A.J. Calzzani, F.T.M.d.C. Vicentini, R. van der Meel, M.C.d.A. Fantini, M.M. Iyomasa, R.M. Schiffelers, M.V.L.B. Bentley, An *in situ* gelling liquid crystalline system based on

- monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 74 (2015) 103–117.
- [204] L.N. Borgheti-Cardoso, S.A.A. Kooijmans, M. Fens, R. van der Meel, F. Vicentini, M.C.A. Fantini, M. Bentley, R.M. Schiffelers, *In situ* gelling liquid crystalline system as local siRNA delivery system, *Molecular pharmaceutics* 14 (2017) 1681–1690.
- [205] P.E. Le Renard, *Injectable Formulations Forming an Implant in situ as Vehicle of Silica Microparticles Embedding Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for the Local, Magnetically Mediated Hyperthermia Treatment of Solid Tumors*, Galenic Pharmacy, in University of Geneva, (2011), French, <http://dx.doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:21604>.
- [206] S.R. Pereira Camelo, S. Franceschi, E. Perez, S. Girod Fullana, M.I. Re, Factors influencing the erosion rate and the drug release kinetics from organogels designed as matrices for oral controlled release of a hydrophobic drug, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 42 (2016) 985–997.
- [207] H. Liu, Y. Wang, F. Han, H. Yao, S. Li, Gelatin-stabilised microemulsion-based organogels facilitates percutaneous penetration of Cyclosporin A *in vitro* and dermal pharmacokinetics *in vivo*, *J. Pharm. Sci.* 96 (2007) 3000–3009.
- [208] Y. Fan, L. Gao, J. Yi, Y. Zhang, W. Yokoyama, Development of beta-Carotene-Loaded Organogel-Based Nanoemulsion with Improved *In vitro* and *In vivo* Bioaccessibility, *J. Agric. Food Chem.* 65 (2017) 6188–6194.
- [209] K. Iwanaga, T. Sumizawa, M. Miyazaki, M. Kakemi, Characterization of organogel as a novel oral controlled release formulation for lipophilic compounds, *Int. J. Pharm.* 388 (2010) 123–128.
- [210] E. Caló, V.V. Khutoryanskiy, Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products, *Eur. Polym. J.* 65 (2015) 252–267.
- [211] R. Gaudana, J. Jwala, S.H. Boddu, A.K. Mitra, Recent perspectives in ocular drug delivery, *Pharm. Res.* 26 (2009) 1197–1216.
- [212] P. Li, Y.F. Poon, W. Li, H.-Y. Zhu, S.H. Yeap, Y. Cao, X. Qi, C. Zhou, M. Lamrani, R.W. Beuerman, E.-T. Kang, Y. Mu, C.M. Li, M.W. Chang, S.S. Jan Leong, M.B. Chan-Park, A polycationic antimicrobial and biocompatible hydrogel with microbe membrane suctioning ability, *Nat. Mater.* 10 (2011) 149–156.
- [213] C. Schultz, Hydrogels used to deliver medicaments to the eye for the treatment of posterior segment diseases, in US patent 20050074497 A1 (2005).
- [214] M.V. Fedorchak, S.R. Little, J.S. Schuman, A. CUGINI, Thermoresponsive hydrogel containing polymer microparticles for noninvasive ocular drug delivery, in WO patent 2014138085 A1, (2014).
- [215] A.S. Sawhney, H.R.I.I. William, Adhesive hydrogels for ophthalmic drug delivery, in US patent 9125807 B2 (2015).
- [216] N.G. Mujawar, Sangramsinh; Navale, Sachin; Sankpal, Bhagyshree; Patil, Shitalkumar, Nasal Drug Delivery: Problem Solution and Its Application, *J. Cur. Pharm. Res.* 4 (2014) 1231–1245.
- [217] S. Pisal, V. Shelke, K. Mahadik, S. Kadam, Effect of organogel components on *in vitro* nasal delivery of propranolol hydrochloride, *AAPS PharmSciTech* 5 (2004) e63.
- [218] S.C. Gad, *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*, Wiley, 2008, <http://dx.doi.org/10.1002/9780470259818>.
- [219] J.O. Trimble, Salt stable lecithin organogel composition, in US patent 20090285869 A1 (2009).

- [220] G. Balata, H.M. El Nahas, S. Radwan, Propolis organogel as a novel topical delivery system for treating wounds, *Drug Deliv.* 21 (2014) 55–61.
- [221] M.Z.Y. Haznedaroglu, Aysu, Halil Koyu, Gorkem Yalcin, Ismail Ozturk, Evren H. Gokce, Preparation and Evaluation of a Novel Organogel Formulation of *Salvia tomentosa* Mill. Essential Oil, *Lat. Am. J. Pharm.* 32 (2013) 845–851.
- [222] M. Ahmad, *Lipids in Nanotechnology*, AOCS Press, 2012, pp. 21–24.
- [223] A. Ajayaghosh, C. Vijayakumar, V.K. Praveen, White light emitting organogel and process thereof, in US 8529790 B2 (2013).
- [224] T. Jiao, Q. Huang, Q. Zhang, D. Xiao, J. Zhou, F. Gao, Self-assembly of organogels via new luminol imide derivatives: diverse nanostructures and substituent chain effect, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 278.
- [225] S.A.K. Bhasha, Syed Abdul, S. Duraivel, Debjit Bhowmik, K.P. Samapth Kumar, Recent trends in usage of polymers in the formulation of dermatological gels, *Ind. J. Res. Pharm. Biotechnol.* 1 (2013) 161–168.
- [226] Y. Yoshii, N. Hoshino, T. Takeda, H. Moritomo, J. Kawamata, T. Nakamura, T. Akutagawa, The formation of organogels and helical nanofibers from simple organic salts, *Chem. Eur. J.* 20 (2014) 16279–16285.
- [227] L. Zhu, X. Li, S. Wu, K.T. Nguyen, H. Yan, H. Ågren, Y. Zhao, Chirality control for *in situ* preparation of gold nanoparticle superstructures directed by a coordinatable organogelator, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 9174–9180.
- [228] F. Würthner, B. Hanke, M. Lysetska, G. Lambright, G.S. Harms, Gelation of a Highly Fluorescent Urea-Functionalized Perylene Bisimide Dye, *Org. Lett.* 7 (2005) 967–970.
- [229] J.L. Hawk, Structure Activity Relationships in the Fracture of Hybrid Covalent / Metallosupramolecular Organogels, Department of Chemistry, in Duke University, 2014.
- [230] M. Mishra, *Handbook of Encapsulation and Controlled Release*, CRC Press, 2015.
- [231] K. Hanabusa, D. Inoue, M. Suzuki, M. Kimura, H. Shirai, Physical gelation of organic solvents by low molecular weight gelators and preparation of organogel electrolytes, *Polym. J.* 31 (1999) 1159–1164.
- [232] E.H. Gökçe, A. Yurdasiper, E. Korkmaz, Ö. Özer, A. Novel Preparation, Method for organogels: high-speed homogenization and micro-irradiation, *AAPS PharmSciTech* 14 (2013) 391–397.
- [233] C. Baddeley, Z. Yan, G. King, P.M. Woodward, J.D. Badjic, Structure-function studies of modular aromatics that form molecular organogels, *J. Org. Chem.* 72 (2007) 7270–7278.
- [234] M.-M. Su, H.-K. Yang, L.-J. Ren, P. Zheng, W. Wang, Solvent-mediated gel formation, hierarchical structures, and rheological properties of organogels, *Soft Matter* 11 (2015) 741–748.
- [235] M.A. Cerqueira, L.H. Fasolin, C.S.F. Picone, L.M. Pastrana, R.L. Cunha, A.A. Vicente, Structural and mechanical properties of organogels: role of oil and gelator molecular structure, *Food Res. Int. (Ottawa, Ont.)* 96 (2017) 161–170.
- [236] T. Ikeda, T. Masuda, M. Takayama, H. Adachi, T. Haino, Solvent-induced emission of organogels based on tris(phenylisoxazolyl)benzene, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 36–39.
- [237] R. Angelico, B. Balinov, A. Ceglie, U. Olsson, G. Palazzo, O. Soderman, Water diffusion in polymer-like reverse micelles. 2. composition dependence, *Langmuir* 15 (1999) 1679–1684.

- [238] N. Dragicevic, H.I. Maibach, *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, Springer, Berlin Heidelberg, 2015, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-45013-0>.
- [239] S. Murdan, B. van den Bergh, G. Gregoriadis, A.T. Florence, Water-in-sorbitan monostearate organogels (water-in-oil gels), *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 615–619.
- [240] Y.A. Shchipunov, T. Dürschmidt, H. Hoffmann, Electrorheological Effects in Lecithin Organogels with Water and Glycerol, *J. Colloid Interface Sci.* 212 (1999) 390–401.
- [241] K.K. Diehn, H. Oh, R. Hashemipour, R.G. Weiss, S.R. Raghavan, Insights into organogelation and its kinetics from Hansen solubility parameters. Toward a priori predictions of molecular gelation, *Soft Matter* 10 (2014) 2632–2640.
- [242] X. Huang, S.R. Raghavan, P. Terech, R.G. Weiss, Distinct kinetic pathways generate organogel networks with contrasting fractality and thixotropic properties, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 15341–15352.
- [243] M. Suzuki, Y. Hayakawa, K. Hanabusa, Thixotropic supramolecular gel based on l-lysine derivatives, *Gels* 1 (2015) 81–93.
- [244] Y.L. Khromova, E.V. Shumilina, Y.A. Shchipunov, Lecithin organogels containing poly(ethylene glycol) monolaurate, *Colloid J.* 63 (2001) 242–247.
- [245] S.R. Raghavan, Distinct character of surfactant gels: a smooth progression from micelles to fibrillar networks, *Langmuir* 25 (2009) 8382–8385.
- [246] Y.A. Shchipunov, Lecithin organogel: a micellar system with unique properties, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 183–185 (2001) 541–554.
- [247] C. Tang, D. Amin, P.B. Messersmith, J.E. Anthony, R.K. Prud'homme, Polymer directed self-assembly of pH-responsive antioxidant nanoparticles, *Langmuir* 31 (2015) 3612–3620.
- [248] J. Xu, Y. Wang, H. Shan, Y. Lin, Q. Chen, V.A.L. Roy, Z. Xu, Ultrasound-induced organogel formation followed by thin film fabrication via simple doctor blading technique for field-effect transistor applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8 (2016) 18991–18997.
- [249] Y. Wang, Z. Wang, Z. Xu, X. Yu, K. Zhao, Y. Li, X. Pang, Ultrasound-accelerated organogel: application for visual discrimination of Hg²⁺ from Ag⁺, *Org. Biomol. Chem.* 14 (2016) 2218–2222.
- [250] V. Agrawal, V. Gupta, S. Ramteke, P. Trivedi, Preparation and evaluation of tubular micelles of pluronic lecithin organogel for transdermal delivery of sumatriptan, *AAPS PharmSciTech* 11 (2010) 1718–1725.
- [251] J.A. Varshosaz, M. Tabbakhian, N. Ebrahimzadeh, Development of Lecithin Nanoemulsion Based Organogels for Permeation Enhancement of Metoprolol through Rat Skin, *J. Nanomater.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1155/2013/139437>.
- [252] E. Bryson, R. Hartman, J. Arnold, G. Gorman, S. Sweitzer, S. Asbill, Skin permeation and antinociception of compounded topical cyclobenzaprine hydrochloride formulations, *Int. J. Pharm. Compound.* 19 (2015) 161–166.
- [253] Q. Zhang, Y. Song, S.W. Page, S. Garg, Evaluation of Transdermal Drug Permeation as Modulated by Lipoderm and Pluronic Lecithin Organogel, *J. Pharm. Sci.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.Xphs.2017.09.008>.
- [254] C.W.M.a.H. Thomas, Suzanne M.D. Chair, Topical administration of psychotropic medications in pluronic lecithin organogel to treat patients with dementia: a retrospective observational study, *Marshall J. Med.* 1 (2015), <http://dx.doi.org/10.18590/mjm.2015.vol1.iss1.4>.

- [255] P. Kirilov, V.H. Tran, A. Ducrotte-Tassel, J.P. Salvi, S. Perrot, M. Haftek, R. Boulieu, F. Pirot, Ex-vivo percutaneous absorption of enrofloxacin: comparison of LMOG organogel vs. pentravan cream, *Int. J. Pharm.* 498 (2016) 170–177.
- [256] F. Bourdon, M. Lecoœur, L. Leconte, V. Ulte, M. Kouach, P. Odou, C. Vaccher, C. Foulon, Evaluation of Pentravan(R), Pentravan(R) Plus, Phytobase(R), Lipovan (R) and pluronic lecithin organogel for the transdermal administration of antiemetic drugs to treat chemotherapy-induced nausea and vomiting at the hospital, *Int. J. Pharm.* 515 (2016) 774–787.

3.2 Deuxième étude : Preparation and characterization of 12-HSA-based organogels as injectable implants for the controlled delivery of hydrophilic and lipophilic therapeutic agents

Article publié dans Materials Science and Engineering C 114 : 110999 (2020)

Cloé L. Esposito^a, Véronique Tardif^a, Margault Sarrazin^a Plamen Kirilov^{b,*} and V. Gaëlle Roullin^{a,*}

^aLaboratoire de Nanotechnologies Pharmaceutiques, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, CP6128, succursale Centre-ville, Montréal, QC, H3C 3J7, Canada ;

^bUniversité de Lyon (UCBL), Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique UMR 5305 et Vecteurs Colloïdaux et Transport Tissulaire, Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 8 avenue Rockefeller, 69373 Lyon, Cedex 08, France.

*Correspondence to Plamen Kirilov, PhD or Valérie Gaëlle Roullin, PhD, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Qc, Canada, H3C 3J7.

E-mail : plamen.kirilov@univ-lyon1.fr or vg.roullin@umontreal.ca

Contribution des auteurs

Cloé L. Esposito

Méthodologie, validation des résultats, analyse formelle, partie expérimentale, rédaction – préparation du brouillon original, rédaction – révision et édition.

Véronique Tardif

Partie expérimentale.

Margault Sarrazin

Partie expérimentale.

Plamen Kirilov

Conceptualisation du projet, , rédaction – préparation du brouillon original, rédaction – révision et édition, supervision.

V. Gaëlle Roullin

Conceptualisation du projet, , rédaction – révision et édition, supervision, gestion du projet, ressources.

RÉSUMÉ

Les organogels préparés avec des organogélifiants de bas poids moléculaire pour structurer les huiles liquides représentent d'excellentes matrices pour l'administration contrôlée d'une grande variété de molécules médicamenteuses. Bien que des études sur les systèmes d'organogel sont rapportées dans la littérature, relativement peu d'entre elles étudient leur potentiel en tant que gels formés *in situ* pour la libération de substances actives.

Cette étude rapporte le développement d'organogels administrables par injection sous-cutanée d'acide 12-hydroxystéarique (12-HSA) pour l'administration de médicaments lipophiles et hydrophiles. La caractérisation rhéologique (écoulement, mesures dynamiques de rampe de température et de cisaillement oscillatoire), les propriétés physico-chimiques (seringabilité, études de gonflement et de dégradation), ainsi que la perméabilité et la cytotoxicité ont été analysées pour obtenir des informations sur l'influence de la composition du gel (ajout de tensioactif, pourcentage massique en organogélifiant) sur le processus de gélification et les propriétés des organogels. Les températures de transition de phase sol-gel (T_{gel}) et gel-sol (T_{melt}) ont été déterminées par la méthode du tube inversé et des études de rhéologie complémentaires.

Une augmentation du pourcentage massique de 12-HSA a entraîné une augmentation de la résistance du gel et des valeurs de modules de stockage (G') et de perte (G''), mettant en évidence l'auto-assemblage de la structure cristalline du gélifiant piégeant la phase huileuse dans une structure de réseau tridimensionnelle (3D). L'ajout de molécules de tensioactif polysorbate 80 (Tween 80, T80) dans le système a causé une structure semblable à un gel de faible résistance, avec un débit d'écoulement plus faible pendant les tests de seringabilité, malgré une plus faible valeur de viscosité apparente par rapport à celles des organogels 12-HSA.

De plus, les études de gonflement des organogels de 12-HSA et de 12-HSA avec T80 dans une solution de tampon phosphate salin (PBS) en fonction du temps a révélé que les taux d'érosion étaient modulés par les différentes compositions d'organogels.

La perméabilité de l'acyclovir (ACV) et du clotrimazole (CTM), médicaments modèles

hydrophiles et lipophiles, respectivement, chargés dans les organogels à base de 12-HSA, a été évaluée à partir des cellules de diffusion de Franz. Les médicaments chargés dans les organogels présentaient des taux de libération *in vitro* et des perméabilités médicamenteuses *ex vivo* inférieurs par rapport aux solutions médicamenteuses correspondantes. De plus, l'organogel 12-HSA T80 pourrait ralentir la libération d'ACV par un facteur d'environ 2,6 fois, jusqu'à 6 h, par rapport aux organogels 12-HSA chargés de CTM.

Enfin, la cytotoxicité d'organogels à base de 12-HSA a été évaluée par des tests de viabilité cellulaire *in vitro* au niveau des fibroblastes de prépuce humain. Un pourcentage en organogélifiant accrue de 12-HSA a entraîné un effet cytotoxique plus élevé, avec une sensibilité de test plus élevée observée pour le modèle de culture cellulaire en trois dimensions (3D) par rapport à la culture cellulaire en deux dimensions (2D). Nos résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle les organogels à base de 12-HSA sont des systèmes prometteurs pour l'administration contrôlée de médicaments en tant qu'implants se formant *in situ*.

Mots clés: Organogels de 12-HSA, implants pour l'administration de médicaments, libération de médicaments, perméabilité aux médicaments, cellule de diffusion de Franz, caractérisation rhéologique, cytotoxicité.

ABSTRACT

Organogels prepared with low molecular weight organogelators to structure liquid oils represent excellent matrices for the controlled delivery of a wide variety of drug molecules. Although studies on organogel systems are reported in the literature, relatively few investigate their potential as gels formed *in situ* intended for drug delivery. This study reports the development of injectable subcutaneous 12-hydroxystearic acid (12-HSA) organogels for the delivery of both lipophilic and hydrophilic drugs. The rheological characterization (flow, dynamic temperature ramp and amplitude oscillatory measurements) and physicochemical properties (syringeability, swelling and degradation studies), as well as permeability and cytotoxicity were analyzed to gain insights into the influence of the gel composition (surfactant addition, organogelator concentration) on the gelation process and organogel properties. Sol-gel phase transition temperature (T_{gel}) and gel-sol phase transition temperature (T_{melt}) were determined by the tube-inverting method and complementary rheology studies. An increase in 12-HSA concentration led to an augmentation in gel strength and storage (G') and loss (G'') moduli values, evidencing the self-assembly of crystalline gelator structure entrapping the oil phase into a three-dimensional (3D) network. The addition of polysorbate 80 (Tween 80, T80) surfactant molecules in the system caused a weaker gel-like structure, with lower flow rate during syringeability assays, despite its lower apparent viscosity compared to those of 12-HSA organogels. In addition, the swelling studies of 12-HSA / 12-HSA T80 organogels as a function of time in phosphate buffered saline (PBS) revealed that the erosion rates were modulated by the organogel compositions. The permeability of acyclovir (ACV) and clotrimazole (CTM), hydrophilic and lipophilic model drugs, respectively, loaded in 12-HSA-based organogels, was assessed in Franz diffusion cells. Organogel-loaded drugs presented lower *in vitro* release rates and *ex vivo* drug permeabilities compared to the corresponding drug solutions. Furthermore, 12-HSA T80 organogel could slow down the release of ACV by a factor of about 2.6-fold, up to 6 h, compared to CTM-loaded 12-HSA organogels. Finally, the cytotoxicity of 12-HSA-based organogels was evaluated through *in vitro* cell viability assays in human foreskin fibroblasts (HFF). Increased 12-HSA concentration resulted in higher cytotoxic effect, with a higher test sensitivity observed for the 3D collagen-embedded cell layer setup matrix versus 2D cell cultures. Our results support the hypothesis that 12-HSA-based organogels are promising systems for controlled drug delivery as *in situ*-forming implants.

KEYWORDS

12-HSA organogels; drug delivery implants; drug release; drug permeability; Franz diffusion cell; rheological characterization; cytotoxicity.

1. INTRODUCTION

In recent decades, new strategies for the delivery of insoluble drugs have emerged by achieving carrier-based delivery systems able to release both hydrophilic and lipophilic drugs [1, 2]. Effective delivery of therapeutic agents through the skin, while overcoming some of the drug solubility and bioavailability strains, has been an appealing alternative to major oral delivery drawbacks [3]. Among the various routes of administration through the skin, subcutaneous (SC) administration of drugs is found very attractive because the adipose tissue is poorly vascularized [4]. It is therefore easy to achieve a slow diffusion at a sustained rate of absorption, with a slower onset of action than intravenous (IV) or intramuscular (IM) administration routes [5]. Generally, SC is either used for drug oily solutions or suspensions, as sustained release systems displaying properties dependent on the drug lipophilicity. Thus, depending on the molecule ionization state, the injection depth and the nature of co-solvents and surfactants could affect its absorption [6]. Implant delivery systems have subsequently been investigated to extend drug delivery over long time periods from their injection sites, in order to reduce dosage frequency, and therefore improve patient compliance, while decreasing systemic side effects [7]. *In situ* gelling systems using biodegradable and biocompatible polymers soluble in water count among the most interesting systems since they form a free-flowing injectable solution, without requiring follow-up surgical removal [8-12]. Thermo-sensitive sol-gel polymeric systems responding to various physicochemical and environmental stimuli (e.g, pH, temperature, specific ligands, light) are commonly investigated [13-16]. They represent a step change from other drug delivery systems (DDM), as the mechanism for drug delivery is based on the polymeric stimulus-responsive properties. For instance, thermoresponsive polymers can undergo sol-gel transition around the body temperature. Drug release of either partitioned or solubilized drugs into the self-assembled hydrophobic polymer domains can be driven by either passive diffusion-, swelling- or erosion-controlled release mechanisms [10, 17, 18].

Recently, the design of organogel-based implants, made from organogelator molecules self-assembled into 3D network structures and entrapping various hydrophobic solvents, has gained research interest [1]. Different low molecular weight organogelators (LMOG), such as phospholipid-, sterol-, amino acid- and fatty acid derivatives) [8, 12, 19-22] or polymeric organogelators (POG), such as poly(ethylene-co-vinyl alcohol), polyester-based polyurethanes, and cellulose derivatives [23, 24] have been used to form *in situ* injectable organogels from organic phases (vegetable oils, N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), glycofurol) with the use of co-solvents (polyethylene glycol (PEG), NMP, N-(2-hydroxyethyl)lactamide) [11, 25, 26]. One promising avenue for organogels used as depot formulations lies in the administration of hydrophilic and lipophilic drugs, such as cholinesterase inhibitors, vaccine adjuvants, contraceptive steroids, anti-inflammatory and chemotherapeutic agents [1]. Contrary to other parenteral extravascular injectable systems based on hydrogels, organogels showed an enhance capacity to immobilize magnetic microparticles without alterations of the mechanical and sol/gel transition properties of the gels after *in vivo* intratumoral injection [25]. Also, as opposed to polyester- and alginate-based hydrogel implants, they did not influence the microenvironmental pH by generating a local increase in acidity around the gels upon degradation [27], this latter phenomenon contributing to inflammation in acidosis-related pathologies.

In recent years, 12-HSA-based *in situ* forming organogels have been investigated as injectable drug delivery systems, using different organic solvents (soybean oil, coconut oil, medium chain triglyceride, glyceryl tributyrates, glyceryl triacetate, propylene glycol) to form self-assembled fibrillar networks [28, 29]. At the nanoscale, many variables such as size and morphology influence the self-assembly mechanisms of organogels, leading to a wide range of structures and shapes owing to specific physicochemical properties. Various morphological structures have been reported, such as aggregates [30], nanofibers [31, 32], nanosheets [31], driven by weak interactions (van der Waals forces, hydrogen bonding and π - π stacking), thereby allowing investigators to determine the nature of the solid-state structure (mono / multi -crystalline or amorphous). As for hydrogels [33-35], the unique properties of organogels in adsorption and self-healing were linked to the dynamic molecular exchanges arising from the internal network structures governing their thermodynamic stability [30-32]. Moreover, the sol state was maintained at room temperature (RT) by adding a small amount of gel inhibitor, such as ethanol or NMP (biocompatible, water-miscible

co-solvents) in the gelator/oil mixture to disrupt interactions between organogelator molecules. Once injected *in vivo*, the co-solvent diffused into the surrounding tissues, causing the sol-gel transition to happen and hence the physical gel formation [8]. Implants based on HSA (5 % and 7 % wt) and encapsulating either the hydrophilic leuprolide acetate or the lipophilic testosterone enanthate drug were found to be well tolerated in mice and effective to deliver the hydrophilic drug, down-regulating the endogenous testosterone serum levels for 4 months; however, the release of testosterone enanthate from the implants was comparable to the administration in the oil vehicle [29].

The aim of the present study was to prepare *in situ* biocompatible 12-HSA-based organogels with suitable biodegradation and mechanical properties, to control the release of hydrophilic and lipophilic drugs. To this end, we investigated the sustained release properties of the hydrophilic acyclovir (ACV) and the hydrophobic clotrimazole (CTM) model drugs *in vitro* and *ex vivo* using Franz diffusion cells. The chemical structure of the ingredients is shown in Figure 1. The *in vitro* drug release kinetics of drug-loaded implants was modelled using common mathematical models (zero-order and First order kinetics, Kormeyer-Peppas, Hixson Crowell and Higuchi models). Thermal behavior, rheological properties, gelation kinetics, swelling and degradation were also examined. Furthermore, a syringeability assay on the sol state of 12-HSA-based organogels was designed to correlate the gel flow rate with organogelator concentration and the needle inner diameter. Using the ISO 10993 guideline for the biological evaluation of medical devices and biomaterials, we further assessed the biocompatibility of the 12-HSA based implants using *in vitro* cell culture models to ascertain the working dosage of this injectable system.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Acyclovir (ACV) and clotrimazole (CTM), USP grade, were obtained from Medisca (St-Laurent, QC, Canada). 12-hydroxystearic acid (CASID[®] HSA, purity of 60-90 %) was kindly provided by Vertellus (Greensboro, NC, USA). T80 (Tween 80) was obtained from Medisca (Saint-Laurent, QC, Canada). N-methyl-pyrrolidone (NMP) was manufactured by Acros Organics (Geel, Belgium). Methanol and acetonitrile (analytical grade) were purchased from Fisher Chemical

(Bridgewater, USA). Light mineral oil (100 wt%) was obtained from Medisca (Saint-Laurent, QC, Canada). Water was purified by a Milli-Q purification system (Millipore, Milford, MA). Human foreskin fibroblasts (HFF) were kindly obtained from Prof. Marc Servant's Lab (Faculty of pharmacy, University of Montreal, Montréal, QC, Canada) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium High glucose, with L-glutamine and sodium pyruvate, without phenol red (DMEM; Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), supplemented with 15 % fetal bovine serum (FBS; Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), and 1 % penicillin-streptomycin (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). All cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂/ 95 % air atmosphere.

2.2 Organogel formulations

All organogel formulations were prepared in two successive steps. First, 12-HSA (2-10 % wt of the oil phase) was dissolved in mineral oil at 60 °C under magnetic stirring, to ensure a complete dissolution of 12-HSA. Once the organogelator was dissolved, the temperature was decreased to 50 °C and the model drug (ACV or CTM, adjusted to a concentration of 1 mg/mL) was physically dispersed in the oily mixture, under magnetic stirring (50 rpm, 5 min). When required, T80 was previously added to dissolve and facilitate ACV incorporation in 12-HSA T80 organogels. The co-solvent NMP (12 % wt of the oil phase) was then added to the hot dispersions. These latter dispersions (5, 1 or 0.5 mL) were immediately filled in syringes, equipped with either 21G x 1 1/2" or 25G x 1 5/8" needles, placed on ice for 30 min and then stored at 4-8 °C.

Wherever applicable, three controls were used: (i) 12-HSA organogel formulations, prepared as above mentioned but without drug, (ii) a solution of 1 mg/mL CTM in ethanolic PBS (35:65) and (iii) a solution of 1 mg/mL ACV in 0.9 % NaCl.

2.3 HPLC analysis

Samples containing ACV and CTM were analyzed using a validated HPLC method with slight modifications [36, 37]. The concentration of AVC and CTM were determined using a SPD-20A Shimadzu (Tokyo, Japan) high-performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a LC 20AT pump, a DGU-20A3 degasser and a SPD-20A UV/vis detector. The HPLC system was controlled by the Labsolutions Shimadzu software. The assay was performed on a reverse-phase

YMC-Pack ODS-A C18 column (5 μm , 4.6 \times 150 mm). The column temperature was set at 40 $^{\circ}\text{C}$ with a flow rate of 1.5 mL/min and 0.7 mL/min for CTM and ACV quantification, respectively. CTM (2 μL) and ACV (3 μL) samples were injected using an automated sampling injector. The mobile phases used under isocratic mode were a mixture of 5 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8) and acetonitrile (50/50, v/v) for CTM samples, and methanol-water (50/50, v/v) for ACV samples. All solutions were first sonicated and filtered through 0.2- μm nylon membranes before use. Data were acquired at a wavelength of 206 nm and 254 nm, with relative retention times at 1.3 and 2.5 minutes for CTM and ACV detection, respectively. The linear range was from 2 to 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($R^2 = 0.999$) for both drugs. All quantitative measurements were repeated 3 times and are presented as means \pm standard deviations (SD).

2.4 Rheological characterization

Oscillatory shear, temperature ramp and viscosity measurements were conducted in a stress-controlled rheometer (AR 1000, TA Instruments). Depending on the sample viscosity, a cone-and-plate geometry with a cone angle of 2° , 47 μm in truncation and a diameter of 20 mm, or a cone and- plate geometry with a cone angle of 2° , 61 μm in truncation and a diameter of 60 mm, were used. To prevent dehydration of the solution, a thin layer of low-viscosity silicone oil was placed on the top of the measuring unit (the viscoelastic response of the sample was not affected by this layer). The rheometer was equipped with a Peltier plate controlling the temperature within 0.1 $^{\circ}\text{C}$ of the set value. All rheological experiments were conducted at a temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$, except for temperature ramp test. For each measurement, at least two runs were carried out. The reproducibility of an experimental run with a new sample solution was usually better than $\pm 5\%$. The temperature ramp test was performed in the temperature range of 10-100 $^{\circ}\text{C}$ at 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and at a frequency of 1 Hz. The viscosity measurements were conducted over an extended range of shear rates (0.03 - 100 s^{-1}) using a flow procedure (steady-state flow mode). The shear rate dependence of the viscosity was usually monitored as a function of increasing shear rate. Between measurements, samples were allowed to equilibrate for some time. All oscillatory shear experiments were carried out within the linear viscoelastic regime, where the dynamic storage or elastic modulus (G') and loss or viscous modulus (G'') are independent of the strain amplitude. The oscillating sweep measurements were performed in the frequency (f) domain of 0.01-30 Hz with an imposed stress of 0.2 Pa.

2.5 Syringeability tests

To evaluate the syringeability of the prepared organogel formulations, the force required for the injection of 12-HSA-based organogels through the selected syringe needles was evaluated *via* the calculated flow rate, relating to the displacement rate of the plunger subjected to a fixed force. A home-made system was set up according to the method described by Schuetz *et al.* [38]: it consisted in a vertical stand supporting a 5.0-mL Luer lock plastic syringe equipped with either a 21G × 1 1/2" or a 25G × 5/8" needle and filled with the organogels stored at 2-8 °C. Different forces (5, 10, 20, 30 and 40 N) were applied on the pan on the syringe plunger. The average time required to expel the total volume of the filled formulation (5.0 mL) under a constant gravitational force was recorded. The flow rate was then calculated as the ratio between the expelled volume and the average time required to expel this volume. All experiments were performed in triplicate at RT. Flow rate values higher than 0.4 mL/min are similar to usual manual injection rates as described in the literature [39].

2.6 Sol-gel and gel-sol phase transition properties

The sol-gel and gel-sol phase transitions of 12-HSA-based organogels were investigated by the inversion flow method. The prepared organogels ([12-HSA] = 2, 4, 6, 8 and 10 wt%) were injected in 1-mL, closed-capped Eppendorf tubes. The resulting sol-gel phase transition temperatures, T_{gel} , and gel-sol phase transition temperatures, T_{melt} , were determined by immersing samples in a water bath from 20 to 80 °C with a 10-min hold on at each temperature and a temperature increment of 2°C. At fixed temperatures, samples were removed from the water bath and subsequently inverted to evaluate the following criteria: "flowing" or "not flowing" gels under their own weight over 30 s. Measurements were repeated thrice for each sample at each temperature to determine the T_{gel} and T_{melt} values in order to establish a sol-gel and gel-sol phase transition diagram.

2.7 Swelling / degradation study

To investigate the degradation and the swelling behavior of 12-HSA-based organogels, the weight of initial organogels prepared from 12-HSA organogels (gelator concentrations: 4 and 10 wt%) were accurately recorded (wet gel weight@ $t = 0$). The gels were then introduced into 5.0-mL

Eppendorf tubes along with 3 mL of PBS medium (pH = 7.4) and kept in an incubator at 37 °C for 28 days, under gentle shaking at 70 rpm. The media were changed every other day. At regular intervals, the media were removed, the organogels were wiped at the edges with Kimwipes papers and their weight after swelling was recorded (wet gels weight@t). Finally, the gels were freeze-dried for 2 days and their dried weights (dried weight@t) were measured and compared to the initial weight of the dried gels (dried weight@t=0). Three samples of each formulation were prepared for each time point and incubation was continued until the organogel samples had insufficient physical integrity to be handled (~ 75 % degradation).

The equilibrium swelling ratio (%) [40] and the degradation percentage [41] based on the initial organogel weight were calculated as a function of time using equations 1 and 2:

$$\text{swelling ratio \% (t)} = \frac{(\text{wet gel weight@t} - \text{wet gel weight @t=0})}{\text{wet gel weight@t=0}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ degraation (t)} = \frac{\text{dried weight@t=0} - \text{dried weight@t}}{\text{dried weight@t=0}} \times 100 \quad (2)$$

2.8 Franz diffusion cells studies

In vitro and *ex vivo* releases of ACV and CTM from organogels containing 4 or 10 wt% of 12-HSA and 1 mg/mL of ACV or CTM were performed using vertical Franz diffusion cells. Solutions of ACV and CTM at the same concentrations were used as controls. Each skin piece or membrane used during the experiments was mounted between the donor and receptor chambers of PermeGear static diffusion cells (effective contact area: 2.54 cm², PermeGear Inc., Bethlehem, Pennsylvania, U.S.). Ethanolic PBS (35:65 v:v) and saline solution (0.9 %) were used as release media for CTM and ACV, respectively, to achieve sink conditions. Receptors were filled with the appropriate medium (5.0 mL) and left 30 minutes for temperature equilibration in a water bath at 37 °C prior samples were loaded into the donor chambers. All experiments were conducted under occlusive conditions with paraffin and aluminum to prevent evaporation. The receptor medium was stirred at 300 rpm. At predetermined time intervals (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72 hours and 5, 7, 10, 14, 18, 21 days), samples volumes (0.5 mL) were withdrawn and replenished with the same volumes of fresh media. Any air bubble formed was carefully removed by tilting the Franz cell to allow air escaping via the sampling arm. ACV and CTM were quantified after dilution in their respective

mobile phase (1:2) by UV-HPLC. Drug release studies were performed in triplicated for each sample formulation. The cumulative mass of drug which had permeated through the membrane or pig skin was calculated according to equation 3:

$$\% \text{ Cumulative drug mass} = \frac{V_E \sum_{i=1}^{n-1} C_i + V_0 C_n}{m_0} \times 100 \quad (3)$$

with V_E = sampling volume (mL); C_i = initial concentration (mg / mL); V_0 = volume of the Franz cell (mL); C_n = concentration of drug withdrawn (mg / mL); m_0 = initial mass (mg); d_i = dilution dosage.

2.8.1 *In vitro* drug release: diffusion experiments

Regenerated cellulose membranes (Spectra/Por 6, 1 kD MWCO, 45 mm Flat Width, 29 mm Diameter x 33' L, Spectrum Labs, Repligen, USA) were rinsed in Milli-Q water for 30 minutes and then used as artificial membranes. Each drug-loaded gel formulation or solution was deposited on membranes (1 mL). At the end of *in vitro* release testing, the residual concentration of each drug on membranes was quantified by HPLC by washing membranes for 24 h in Eppendorf tubes containing 5 mL of each respective medium.

2.8.2 Drug release: permeation experiments

Pig skins were obtained on flank regions of sacrificed young pigs (28 ± 2 kg) from the Montreal Heart Institute (Dr Stanley Nattel's laboratory) and freshly isolated. Porcine skin was chosen because of its histological similarities to human skin. Skin pieces were first wrapped in aluminum foil and stored at -20 °C until further experiment. Storage lasted less than 2 months so as not to influence the barrier integrity. When used, tissues were allowed to thaw at RT for 1 h. The hair was then shaved and tissues were subsequently washed with cold water. The thickness of skin samples was measured with a caliper. The skin piece was placed on the top of the receptor chamber with the *stratum corneum* layer facing upward into the donor compartment. The effective diffusion area (EDA) was 2.54 cm^2 . Samples were subcutaneously injected using 21G x 1 1/2" needle. The injection volume of drug-loaded gels or solution samples was set at 200 μL to form *in situ* depots. After 14 days, Franz cells were disassembled and the skin was removed to quantify the drug content in the four skin layers: *stratum corneum*, epidermis, dermis and hypodermis. Tape stripping of

stratum corneum (28 strips) was used to study the drug penetration [42]. Then, a heat-separated membrane separation method was applied to remove the viable epidermis, dermis and hypodermis by immersing skin samples in Milli-Q water at 60 °C for 2 min, as previously reported [43]. Following this step, the various layers were separated and cut into small pieces using forceps and a scalpel. Samples were soaked in 5.0 mL of 0.4 % perchloric acid solution for 24 h and then vortexed for 1 min followed by ultrasonication for 60 min in an ultrasound bath. ACV and CTM were quantified by HPLC in each tissue extract, after filtration through a 0.2- μ m nylon membrane filter (Acrodisc[®], Pall Life Sciences, Portsmouth, UK). The apparent permeation coefficient (P_{app}) and the steady state skin permeation flux (J_{ss} , slope of the cumulative permeation profile determined by using the zero-order model) of both drugs from after 6 hours were calculated using equations 4 and 5 [44]:

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \times A \times C_0 \times 3600} \times 100 \quad (4)$$

$$J_{ss} = P_{app} \times C_0 \quad (5)$$

with $\Delta Q/\Delta t$ = cumulative permeated amount of drug across the skin (Q) over time (t), A = exposed skin surface area (2.54 cm², in this study), C_0 = initial concentration of the drug in the donor chamber, 3600 = conversion time hours to seconds.

2.9 *In vitro* cytotoxicity studies

An *in vitro* MTS assay was performed on HFF cells (passages 4 to 7) in order to evaluate the cytotoxicity of 12-HSA organogel matrices, prepared with or without T80. Gels (6.0 mL) at different 12-HSA concentrations (0.25 to 18.75 x 10⁻² M) were incubated in 3.0 mL of complete culture medium at 37 \pm 0.2 °C for 24 h. Each extract containing the gel leaching products was filtered through a 0.2- μ m sterile nylon membrane filter (Fisherbrand[™] syringes sterile filters, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to test the effect of extract dilutions on the relative cell viability.

To obtain 3D matrix-embedded HFF cell layer culture, cells were trapped as a cell layer in an extracellular matrix (ECM), as previously described by Huyck *et al.* [45]. Briefly, a collagen solution from rat-tail collagen type I (acid-extracted, nonpepsin treated, EMD Millipore, Temecula, USA) was used as ECM for polymerization and 3D matrix and consisted of 1.6 mg/mL type I collagen, 1× AMEM (Gibco, Invitrogen), 8.3 mM NaHCO₃ in Hank’s Balanced Salt Solution (Gibco). The pH was then adjusted to pH 7.4–8 with 1 M NaOH. Then, a thin layer of ECM was spread in a 96-well plate (100 µL/well) and polymerized 15 min in the incubator (at 37°C, 5 % CO₂). The HFF cells (10⁴ cells/100 µL/well) were then seeded in this 96-well plate and incubated 2 h at 37 °C, 5 % CO₂ to foster cell adhesion and spreading. A second layer of the ECM matrix was then coated (40 µL/well) followed by a 30-min incubation (at 37 °C, 5 % CO₂). After polymerization of the 3D matrix, 100 µL of organogel extracts were added on the top of 3D matrix embedded cells for 24 h. HFF 2D culture monolayers, seeded with an equivalent number of cells, were used for comparison purpose. In both cases, cells treated only with growth medium were used as a negative control and cells treated with 5% SDS as a positive control. After a 24-h incubation, 20 µL of MTS solution were added to the 100-µL extracts or growth medium for 4 h (Figure S3). The optical density (OD) of the formazan solution was analyzed using a Tecan microplate reader (Spark, Tecan, Switzerland) at 490 nm. The cell viability was calculated as in equation 6:

$$\% \text{ viability} = \frac{OD_{\text{test}} - OD_{\text{blank}}}{OD_{\text{untreated}} - OD_{\text{blank}}} \times 100 \quad (6)$$

with OD_{test}: optical density of cells treated by the tested extract; OD_{blank}: optical density of wells without cells; OD_{untreated}: optical density of cells treated by growth medium only.

2.10 Statistical analysis

Differences in apparent permeability and J_{ss} flux between two formulations encapsulating either ACV or CTM were evaluated using a 2-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level of $p < 0.05$ followed by *post hoc* Tuckey’s and Sidak’s tests, respectively. A Student’s t-test was used to compare formulation data for the steady state flux and *in vitro* release rates, as well as the MTS assays. Significance level was set at $p < 0.05$. The GraphPad Software (version 7.0, San Diego, CA, USA) was used to perform all statistical analyses.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Sol-gel phase transition behavior

12-HSA was dispersed in light mineral oil at various concentrations (2-10 wt%) and heated above its melting temperature to form a liquid dispersion capable of undergoing sol-gel and gel-sol phase transitions in pH 7.4 PBS solution at 37 °C. The addition of NMP, an aqueous soluble solvent, was previously reported to disrupt self-assembled associations between the molecular crystalline packing of fatty acids, above the critical gelation concentration (CGC) and the low critical solution temperature (LCST), hence facilitating their injection [8]. The sol-gel (T_{gel}) and gel-sol (T_{melt}) transition temperatures were determined using the tube-inverting method by exposing the samples to cooling and heating cycles, respectively. As shown in Figure 2, 12-HSA organogels exhibited a sol-gel transition behavior dependent on temperature, similar to 12-HSA T80 organogels, with increasing temperature from 25 °C to 37 °C. The CGC value of 12-HSA / 12-HSA T80 organogels was 2 wt%. The gelation process was likely due to the 3D self-assembling of organogelator molecules, by non-covalent forces such as London dispersion force and hydrogen bonding, into a physical organogel [46]. Furthermore, it was found that T_{gel} consistently decreased with increasing gelator concentration. The reduced LCSTs at high gelator concentrations are generally explained as a decrease in the gelator solubility allowing gelator-gelator interactions [47]. Contrary to other injectable systems, we were able to report a low minimum concentration. Moreover, T_{gel} was measured in a range between RT and the human body temperature, an expected operating temperature for implant application. Additionally, the gel window, *ie.* the temperature range of the gel state, was 20-70 °C and 20-64 °C for 12-HSA and 12-HSA T80 organogels, respectively. This shift to a lower value at a maximum temperature for 12-HSA T80 organogels, although the CGC remained at the same concentration when T80 was introduced, may be explained by the addition of surfactant molecules disrupting the crystalline packing interactions between organogelator molecules and, overall, modifying the gel density [47]. Interestingly, in our case, a much larger gel window was denoted for higher LMOG concentrations, contrary to the typical tendency of gelators, such as chitosan, used for thermoreversible and injectable hydrogel implants, showing smaller gel windows and requiring the use of copolymers [48].

3.2 Rheological studies: influence of formulation components on rheological profiling of organogels

The dynamic temperature ramp tests were carried out on 12-HSA and 12-HSA T80 organogels in linear viscoelastic conditions between 10 and 80 °C, to evaluate the effect of the organogelator concentration on G' and G'' moduli and rheological properties through accelerated destabilization (Figure 3). Since 12-HSA is a sensitive thermoreversible organogelator and shows significant change during the sol-gel phase transition temperature, each organogel T_{gel} was estimated from the G' onset increase abrupt transition (the slope) from $G' < G''$ to $G' > G''$ during the cooling step. Initially, two plateaus and one abrupt transition were observed from the region 80-10 °C, with a clear gel-sol phase transition on heating, and a gelation (sol-gel) on cooling for 12-HSA / 12-HSA T80 gels. This was confirmed with two crossover points at which the G' started to exceed the G'' , thus suggesting a structural conversion during both heating and cooling steps, from molten (T_{melt}) to crystalline organogel state (T_{gel}) [49].

Furthermore, for all organogels, the mechanism of the hysteresis phenomenon was underlying by a difference between T_{gel} values during melting and crystallization temperature. T_{gel} and T_{melt} values for 12-HSA-based organogels were determined, with data presented in Figure 3 and Table 1. It was noted a small, but significant ($0.01 < p < 0.05$), decrease in the T_{gel} values from 8 to 10 wt% for 12-HSA / 12-HSA T80 organogels, showing an increase in viscoelastic and gel strength properties. In addition, the maximum G' values decreased from 86,321 to 1784 Pa when decreasing the organogelator concentrations from 10 to 2 wt% for 12-HSA organogels. For 12-HSA T80, the same trend was observed, with lower maximum G' values, from 66,321 to 1,245 Pa from 10 to 2 wt% organogelator concentrations (Table 1). These results demonstrated an overall significant effect of organogelator concentration on the viscoelastic properties of the material, independent of the temperature at which G'_{max} was reached. On the other hand, the G' values of 12-HSA gels, when subjected to heating-cooling cycles, appeared to recover approximately their initial G' values (G'_0) values (comprised between ± 0.5 to 22.3 % compared to their G'_0), hence exhibiting thixotropic behavior (Figure 3a). In contrast, 12-HSA T80 gels showed a poorer and more variable recovery (values comprised between ± 7.5 to 191.0% of compared to their initial G'_0) (Figure 3b). A plausible explanation for this behavior could be related to the interaction between the surfactant molecules and the LMOG chains, disrupting the compact packing of the fibrillar network [47]. After reaching a high critical temperature, a relative sharp decrease of G' and G'' could be observed. Such loss in gel strength has been explained as a 3D

restructuring within the LMOG aggregated structures of the entangled self-assembled fibrillar network (SAFIN) through the rupture of H-bonding, diffusion of aligned fibers and self-assembly [50]. These results confirmed the T_{gel} and T_{melt} values previously obtained with the tube-inverting method.

The plots from frequency sweeps and flow curves were drawn to evaluate the viscoelastic properties of the organogels, as shown in Figure 4. The sol state of the gels was associated with smaller G' values compared to those of G'' , in opposition to the gel state (by an average factor up to 10-fold for 12-HSA and 70-fold for 12-HSA T80 at 2 %wt). As previously discussed, the viscoelastic nature of the organogels under shear rate values from 0.6 to 62 s^{-1} showed similar trends (Figure 4a and b):

(i) $G'(\omega) \gg G''(\omega)$ for high LMOG concentrations (8-10 wt%) and $G'(\omega) \ll G''(\omega)$ for low LMOG concentrations (2-4 wt%); (ii) their values increased with the organogelator concentration. The slope of the curves in the yield zone, as represented by narrow yield zone points, is representative of the structure breakdown at the same force for 12-HSA and 12-HSA organogels. In addition, the presence of crossover points at $\tan(12-HSA) \delta = G''/G' > 0.5$ and $\tan(12-HSA T80) \delta > 1$ is also a confirmation of structure breakdown at low organogelator concentrations. The linear viscoelastic theory at equilibrium was applied for all curves (Figure S1) and exponents n' and n'' determined to gather deeper information about the viscoelastic structure during equilibrium phases displaying frequency dependence (Table S1). The exponent values depend on the nature of the physicochemical system, especially for physical gels, and have been considered by Winter and Chambon as the relaxation exponent for non-Newtonian systems ranging from 1 (Newtonian limit) to a value close to 0 [51]. For stiffer gels (solid-like), $n' < 0.5 \rightarrow 0$: $G'' < G'$ while $n' > 0.5 \rightarrow 1$: $G'' > G'$ corresponds to a softer and weaker gel. As observed in our case, G'' and G' values increased with increasing organogelator concentration and $n' > n''$, except for 6-8 wt% 12-HSA T80. Thus, for most of the samples, the n value indicated that 12-HSA / 12-HSA T80 gels could sustain a deformation applied to the system, formed as an entanglement network. In the particular case of 12-HSA T80, where $n \sim 0.5$, the gel was defined as incipient and close to the gelation point [52]. More importantly, n values for 2-4 wt% gels were associated with a Newtonian system in which the viscoelastic behavior of organogel was no longer existing and the organogelator concentration was not sufficient to confer a resistance to the elastic breakdown of chains interconnected in the network structures at lower magnitude of stress. The calculated n value for all gels ($n < 1$), obtained with the Ostwald-deWaele Power law model to characterize the flow behavior of fluids, showed a non-Newtonian shear-thinning behavior (Table S1). This common type of time-independent behavior, as identified by a decrease in the viscosity as the shear rate increased, is highly recommended for its flow

properties [53]. The higher zero-shear viscosity of 12-HSA organogels, compared to 12-HSA T80 ones, confirmed that the network structure was built up with densely packed crystals that might have reorganized themselves, or broken into smaller clusters when (i) higher shear forces were applied, (ii) the organogelator concentration was reduced and (iii) if a surfactant was added. The shear-thinning property of these organogels are particularly interesting for implant applications as (i) they can flow under an applied force and recover their mechanical properties after stress [54] and (ii) their morphologies might be adjusted through the organogelator concentration for a better implantation at site.

3.3 Syringeability tests

Syringeability experiments were performed at RT using two needles (21G x 1 1/2" and 25G x 1 5/8") and high and low concentrations of LMOG (4 and 10 wt%) to evaluate the effect of the needle characteristics (diameter, length) and gelator concentration on the injection force. Organogels prepared with 4 % wt of HSA were models for low concentration gels (soft gels), since they displayed similar rheological behavior to 2 wt% 12-HSA gels but with shear-shinning characteristics compatible with maintaining their structure upon injection. In order to delimit the maximum manual injection force, which is normally fixed around 15-30 N [55], 5 to 40 N graduated forces were applied. As expected, the highest flow rate was found for the largest needle diameter and the flow rate decreased with increasing 12-HSA concentration (Figure 5, a to d). Indeed, at 4 wt% 12-HSA, the flow rate was 5 to 14 times higher for 21G x 1 1/2" than for 25G x 1 5/8". The addition of T80 into the gel formulation caused a 3-4 fold and 4-5 fold decrease in the flow rates for 21G x 1 1/2" for 25G x 1 5/8", respectively (Figure 5d and f). Moreover, as confirmed in the rheological study, 12-HSA T80 organogels displayed higher G' and G'' and thus gel strengths under angular velocity. Nevertheless, the zero-shear-rate viscosity of 12-HSA T80 organogels was significantly lower than for 12-HSA gels. The diameters of selected needles were consistent with a subcutaneous administration [56]. As previously investigated by Burckbuchler *et al.*, all flow rates between 15-30 N were comprised between 4 mL/min and 0.4 mL/min, which was expected for conventional injection rates [55]. This syringeability test highlighted the importance to assess the ability of injecting a gel preparation to ascertain optimal injection conditions, as the rheological characterization alone would not be sufficient to predict syringeability.

3.4 *In vitro* swelling and degradation study: effect of hydrolytic degradation

The swelling and mass degradation behaviors of organogel implants (4 and 10 wt% of 12-HSA) were further investigated at 37°C in PBS solution (pH 7.4). For the first 24 h, we observed swelling for all gels, with the highest swelling rates at 6 hours for 12-HSA T80 gels (Figure 6a). On the other hand, the degradation process, as attested by reduced freeze-dried masses, also started within the first 24 h (Figure 6b). Quasi-linear degradation rates, typical of a hydrolysis phenomenon, were observed for 3 weeks, with erosion rates depending on the organogelator concentration and the presence of T80. Thus, 12-HSA T80 (4 and 10 wt%) and 4 wt% 12-HSA organogels showed the fastest degradation profiles, up to $82 \pm 3 \%$, $73 \pm 3 \%$ and $67 \pm 4 \%$, respectively, as compared to 10 wt% 12-HSA organogel which only displayed a weight loss of $40 \pm 3 \%$ after 3 weeks. The higher content of 12-HSA caused an enhanced molecular self-assembly of 12-HSA molecules, through the interactions of carboxylic and hydroxyl groups, forming a crosslinked network via H-bonds, amongst others [46]. As a result, the incorporation of a polar additive, such as T80, could alter the overall aggregate structure of 12-HSA-based organogels, via competitive H-bonding groups. Ultimately it could weaken the organogel formation and favor hydrolytic cleavage [57]. It could also be speculated that the mainly hydrophobic environment of 12-HSA could result in a slower hydrolysis by slowing down diffusion of water molecules in the matrix, hence offering protection to the matrix against rapid hydrolysis [57]. This degradation process is similar to that found in surface-eroding gels, in which the rate of bond hydrolysis is faster than the diffusion rate of water molecules from the outside into the gel. Therefore, the degradation is limited to the surface and dependent on the surface area [58]. These results proved that the degradability of 12-HSA / 12-HSA T80 gels could be modulated by their own composition. This data provided additional information that can be used in a dynamic mechanical analysis, to study the potential correlation between crystallinity, storage modulus and yield stress of each gel affected by degradation.

3.5 Performance of Organogels: AVC and CTM *in vitro* diffusion, *ex vivo* kinetics and skin biodistribution

In vitro and *ex vivo* mechanisms of drug release from 12-HSA-based implants were investigated using Franz diffusion cells. First, the influence of the vehicle viscosity was assessed *in vitro* on drug diffusion for each gel vehicle, and compared with those of the drugs in solution. We used acyclovir (PubChem CID: 135398513) as a hydrophilic model drug, considering its aqueous solubility in water (2.50 mg/mL

at 37°C) and its octanol-water partition coefficient ($\log P = -1.56$), and clotrimazole (PubChem CID: 2812) as a hydrophobic model drug, due to its low solubility in water (0.00147 mg/mL) and high $\log P$ (4.1, [59]). The solubility of ACV in mineral oil was improved with the use of the surfactant T80 (solubility in T80: 27.9 mg/mL, [60]). A 0.9 % NaCl solution for ACV and a 35:65 ethanol:PBS solution for CTM were selected as receptor media to prevent poor drug dissolution, which could affect the diffusion kinetics of drugs. As expected for a hydrophilic drug embedded in a hydrophobic matrix, ACV diffusion from 4- and 10-wt% 12-HSA T80 organogels was about 3-fold higher than the ACV solution, for up to 3 days (Figure 7a). On the contrary, diffusion of the more hydrophobic CTM from 4- and 10-wt% organogels showed no significant difference to CTM solution, up to 18 days (Figure 7 b). Taking both degradability and release profiles into account, the matrix made from the highest concentration of organogelator was found to be the most efficient delivery vehicle for a hydrophilic drug, with a maximum release of 79.8 ± 6.5 % after 10 days before reaching a plateau (Figure S2). Since the dissolution rate also affects the drug release rate, Iwanaga *et al.* showed in their study that the drug dispersion state in the organogel matrix greatly impacted the drug release; lipophilic drugs could be fully dissolved in the hydrophobic matrix, which mainly involved diffusion release mechanism, whereas hydrophilic drugs, embedded in a solid state in the organogel matrix, had to be dissolved prior diffusion in the network [61]. Based on the release profiles of organogels and solutions, different kinetic models (zero order, first order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas and Hixson-Crowell) were used to gain deeper insights into the mechanisms of drug release after 6 hours (Table 2). According to these mathematical modellings, the drug release better fitted the Higuchi model (diffusion based on Fick's law) for CTM – loaded in 10 wt% 12-HSA organogel and the Hixson-Crowell (erosion-based release) model for CTM loaded in 4 wt% 12-HSA organogel. In the case of both 4- and 10- wt% 12-HSA T80 organogels, Korsmeyer-Peppas model (quasi Fickian release diffusion) was found the best release model for ACV. However, the use of the correlation coefficient is somehow limited to ascribe with certainty a model to an experimental set of data. For instance, no significant differences were found between certain values from the Hixson-Crowell model and the zero order one for CTM-loaded 4 wt% 12-HSA organogel ([44]). The *in vitro* release profiles of ACV-loaded organogels demonstrated a statistically significant slower diffusion, as compared to ACV solution (Figure 8c). Globally as expected, higher viscosity vehicles resulted in lower *in vitro* release rates. Thus, this correlation between the increase in organogel viscosity and the resulting *in vitro* drug release should also encompass any rheological modification caused by the addition of drug molecules, as well as the component partition coefficients.

Ex vivo permeation studies are illustrated in Figure 8. All gel formulations were injected in liquid state into the hypodermis of flank pig skin. The profiles of *ex vivo* permeation of both drugs showed the same model fitting for release kinetics, excepted for CTM loaded in 4 wt% 12-HSA organogel which demonstrated the best fit with the Higuchi model (Table 2). The two highest (287 and 318 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) and lowest (182 and 230 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) cumulative permeation rates of drugs were found in case of ACV / CTM solutions and ACV loaded in 10- and 4- wt% 12-HSA organogels, respectively, after 3 days (Figure 8a). The apparent permeation of the injected ACV solution, as observed by P_{app} values, was found significantly lower than that of the CTM solution (p value < 0.0001 , Figure 8b). Moreover, a clear and significant reduction in the P_{app} values was observed for ACV embedded in both 4- and 10- wt% 12-HSA T80 organogels, as compared to the drug solution, corroborating the *in vitro* drug release profiles (p values < 0.001). Moreover, the permeation of CTM was also significantly reduced in the case of CTM loaded in 4- and 10- wt% 12-HSA organogels compared to the free drug solution (p value < 0.0001 and p value = 0.0065, respectively). Furthermore, the permeation of ACV loaded in 12-HSA T80 organogels was reduced compared to that of CTM loaded in 12-HSA organogels (p values < 0.001 for 4 wt% 12-HSA T80 organogel compared to 12-HSA organogels and p values < 0.0001 for 10 wt% 12-HSA T80 organogel compared to 12-HSA organogels). As observed *in vitro*, the organogel matrix allowed lower permeation of the hydrophilic model drug compared to the free drug solution, whereas this tendency was less significant for CTM-loaded organogels (Figure 8c). Moreover, the residual amounts of ACV and CTM drugs in the skin layers at the end of the permeation study were negligible, contrasting with the amount of drugs in the receptor media (Figure 8d). Generally, for all formulations, the skin drug distribution was similar, displaying the following rank order: hypodermis $>$ dermis $>$ epidermis $>$ *stratum corneum*, except for CTM loaded in 4 wt% 12-HSA organogel, considering the drug content in the *stratum corneum*. In that case, a small part of the injected amount may have been flushed during the hypodermic injection, due to a higher fluidity of the gel, impacting the drug residual skin distribution. Overall, a higher concentration of drugs was quantified in the hypodermis, evidencing the implant formation at the injection site. The amounts of CTM in the hypodermis layer, whatever the formulation, were significantly higher than those obtained with ACV formulations (Figure 8d). Hence, the hypodermis layer may act as a reservoir for the lipophilic CTM, favorably partitioning in the adipocyte lipids. Besides, a higher concentration of organogelator molecules in the 12-HSA T80 gels could entrapped larger amounts of T80-micellized ACV through the interconnected structure network,

resulting in a higher level of retained drug compared to structures prepared with lower organogelator concentration (Figure 8d).

These results are in accordance with those found by Iwanaga *et al.* who reported that the inclusion of an hydrophilic drug in 12-HSA organogels reduced release rates, forming interesting controlled drug delivery systems for hydrophilic compounds [61].

3.6 Cytotoxicity studies of 12-HSA and 12-HSA T80 organogels

In vitro cytotoxicity assays are commonly used as primary tools to evaluate the biocompatibility of implants, in order to analyze the deleterious effects of substances. These assays allow estimation of the biological cell reactivity to a direct contact with the studied materials or their diffusible components [62]. Usually, *in vitro* cell viability is performed on 2D cell monolayers. Nevertheless, alternative methods were developed to take into account conditions surrounding cell growth and the fact that cells are organized as a tridimensional tissue [45]. To address this issue, the cytotoxicity of organogels was evaluated on 3D-embedded cell layers compared with conventional 2D cell cultures. This assay was implemented following the guidelines of the International Organization for Standardization (ISO) 10993-5 using the extraction dilution method [62]. 12-HSA was shown to display a good biocompatibility for a variety of applications [1, 63], including its use, along with soybean oil, to form biocompatible scaffolds for cell culture, leading to the production of collagen after 3 weeks [63]. Therefore, the *in vitro* cytotoxicity of 12-HSA / 12-HSA T80 organogels was evaluated on HFF cells to determine the concentration range in which the *in situ* forming implants could be appropriately used. The viability of HFF cells embedded in a 3D collagen matrix or cultured on the flat bottoms of 96-well plates was calculated in presence of increasing concentrations of organogel extracts (Fig. 9). HFF cell viability was higher than 70 % (considered a non-cytotoxic value for biomaterials, [64]) for (i) $0.25\text{-}1.5 \times 10^{-2}$ M (corresponding to 0.6 to 3.7-times of 4 wt% of 12-HSA molar concentration injected *ex vivo*) 12-HSA / 12-HSA T80 formulations in 2D cell cultures and (ii) $0.25\text{-}0.75 \times 10^{-2}$ M (corresponding to 0.6 to 1.9-times of 4 wt% of 12-HSA molar concentration injected *ex vivo*) of 12-HSA and $0.25\text{-}1.5 \times 10^{-2}$ M of 12-HSA T80 organogels in 3D collagen-embedded HFF cells. However encouraging, further studies are required with HSA-based organogels, with the possibility to use biocompatible edible oils,

such as, for instance, derived plant- and shark-based squalenes [65]. These modifications should allow increasing the biocompatibility, while attempting to preserve their relevant sol-gel transition behavior. We further investigated the effects of organogel extracts on 3D-grown cells compared with 2D monolayers. The curve fitting of semi-log dose-response profiles enabled the determination of EC_{50} values, for which 50 % of the cytotoxic effect was obtained (Fig. S4). For 12-HSA / 12-HSA T80 organogels, EC_{50} values were estimated at 1.5 and 5.3×10^{-2} M in 2D cell cultures, respectively, and 0.8 and 6.3×10^{-2} M, respectively, in HFF-embedded 3D matrix cultures. As observed, EC_{50} values were approximately 1.9-fold higher in 2D cell cultures than in 3D matrices for 12-HSA organogels and only 1.2-fold higher in 3D matrices compared with 2D cell monolayer for 12-HSA T80 organogels. These results tend to underline the better potential of assessing cell proliferation within a 3D matrix, to reach a higher sensitivity level in determining the non-toxic LMOG concentration in gelled systems. Another interesting point of this study is that 12-HSA organogels present were less risk of cell contamination due to the presence of this organogelator, a bioactive precursor of many derivatives reported to display intrinsic antimicrobial activity [66, 67]. Comparatively, due to their higher water content of hydrogels-based systems are more prone to biological contamination in cell cultures, potentially changing cell behavior or morphology. To avoid such problems, sterilization methods are needed, of which irradiation is often favored. Unfortunately, the generation of free radicals [68] can also be deleterious to cell cultures [69].

4. CONCLUSION

The present study reports the effect of different physicochemical and rheological parameters of injectable organogel implants on their degradation and *in vitro-ex vivo* drug release profiles. The study of rheological parameters (G' , G'' , η_{app}) was useful to characterize such semi-solid formulations, as they correlated with the *in vitro* and *ex vivo* drug release kinetics. However, they were not sufficient enough to predict the gel syringeability. The syringeability tests allowed defining optimal conditions concerning the injection force, flow rate, organogelator concentration and inner diameter of used needles. The prepared organogels displayed very important and specific features, such as thixotropy and thermoreversibility, which should enable them to respond to external stimuli to form *in situ* implants at body temperature. Furthermore, the organogel structures were tunable by adjusting the organogelator concentration; higher organogelator concentrations led to more solid-like and structured networks, more

resistant to hydrolysis. The hydrophilic ACV diffused about 2.6-fold lower from 12-HSA T80 organogels compared to the lipophilic CTM loaded in 12-HSA organogels, up to 6 hours, and 3-fold lower than the ACV solution for the 3 first days following the implant formation. In addition, *in vitro* release rates and *ex vivo* permeation kinetics were found to correlate well. Preliminary cytotoxicity assays performed on HFF cells embedded in a 3D collagen matrix demonstrated that leaching products became toxic for initial organogelator concentration higher than 0.75 to 1.5×10^{-2} M. Further investigations will therefore be of crucial importance to determine how formulation alterations could improve biocompatibility, while preserving the adequate physicochemical features for promising *in situ* forming implants.

Credit authorship contribution statement

Cloé L. Esposito : Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing. Véronique Tardif : Investigation. Margault Sarrazin : Investigation. Plamen Kirilov : Conceptualization, Supervision, Writing – original draft, Writing - review & editing. V. Gaëlle Roullin : Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgements

CLE is grateful to the Faculty of Pharmacy of Université de Montréal for her recruiting scholarship. The authors thank Josée Desrochers and Julie-Ève Ouellet for HPLC technical support and are grateful to Professor Marc Servant for kindly providing the Human Foreskin Fibroblast cell line (HFF). This work was partly funded by the Fonds de Recherche Qu. bec Nature et Technologie (FRQNT, grant # 205644).

References

- [1] C.L. Esposito, P. Kirilov, V.G. Roullin, Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications, *J Control Release*, 271 (2017) 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.019>
- [2] S. Kalepu, V. Nekkanti, Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects, *Acta Pharm Sin B.*, 5 (2015) 442-453. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.07.003>
- [3] C.M. Schoellhammer, D. Blankschtein, R. Langer, Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects, *Expert Opin Drug Deliv*, 11 (2014) 393-407. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.875528>
- [4] A. Gómez-Hernández, N. Beneit, S. Díaz-Castroverde, Ó. Escribano, Differential Role of Adipose Tissues in Obesity and Related Metabolic and Vascular Complications, *Int J Endocrinol*, 2016 (2016) 1-15. <https://doi.org/10.1155/2016/1216783>
- [5] D.E. Golan, A.H. Tashjian, E.J. Armstrong, Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy, Wolters Kluwer Health, 2011, pp. 35-36.
- [6] D.S. Collins, L.C. Kourtis, N.R. Thyagarajapuram, R. Sirkar, S. Kapur, M.W. Harrison, D.J. Bryan, G.B. Jones, J.M. Wright, Optimizing the Bioavailability of Subcutaneously Administered Biotherapeutics Through Mechanochemical Drivers, *Pharmaceutical research*, 34 (2017) 2000-2011. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2229-9>
- [7] J.C. Wright, D.J. Burgess, Long Acting Injections and Implants, Springer New York, 2012.
- [8] G. Bastiat, F. Plourde, A. Motulsky, A. Furtos, Y. Dumont, R. Quirion, G. Fuhrmann, J.C. Leroux, Tyrosine-based rivastigmine-loaded organogels in the treatment of Alzheimer's disease, *Biomaterials*, 31 (2010) 6031-6038. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.009>
- [9] L.N. Borgheti-Cardoso, L.V. Depieri, S.A.A. Kooijmans, H. Diniz, R.A.J. Calzzani, F.T.M.d.C. Vicentini, R. van der Meel, M.C.d.A. Fantini, M.M. Iyomasa, R.M. Schiffelers, M.V.L.B. Bentley, An *in situ* gelling liquid crystalline system based on monoglycerides and polyethylenimine for local delivery of siRNAs, *Eur J Pharm Sci.*, 74 (2015) 103-117. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.04.017>

- [10] P.E. Le Renard, O. Jordan, A. Faes, A. Petri-Fink, H. Hofmann, D. Rufenacht, F. Bosman, F. Buchegger, E. Doelker, The *in vivo* performance of magnetic particle-loaded injectable, *in situ* gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia, *Biomaterials*, 31 (2010) 691-705. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.091>
- [11] A. Motulsky, M. Lafleur, A.C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, F. Boury, J.P. Benoit, J.C. Leroux, Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants, *Biomaterials*, 26 (2005) 6242-6253. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.004>
- [12] F. Plourde, A. Motulsky, A.-C. Couffin-Hoarau, D. Hoarau, H. Ong, J.-C. Leroux, First report on the efficacy of l-alanine-based *in situ*-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs, *J. Control. Release*, 108 (2005) 433-441. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.08.016>
- [13] T.A. Debele, S.L. Mekuria, H.-C. Tsai, Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents, *Mater. Sci. Eng. C*, 68 (2016) 964-981. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.121>
- [14] H. Geng, L. Ye, A.Y. Zhang, J. Li, Z.G. Feng, Low-Molecular-Weight Organo- and Hydrogelators Based on Cyclo(l-Lys-l-Glu), *Langmuir*, 32 (2016) 4586-4594. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b01059>
- [15] S. Ghosh, R.D. Mahapatra, J. Dey, Thermoreversible as Well as Thermoirreversible Organogel Formation by l-Cysteine-Based Amphiphiles with Poly(ethylene glycol) Tail, *Langmuir*, 30 (2014) 1677-1685. <https://doi.org/10.1021/la404258v>
- [16] M. Khuphe, B. Mukonoweshuro, A. Kazlauciusas, P.D. Thornton, A vegetable oil-based organogel for use in pH-mediated drug delivery, *Soft Matter*, 11 (2015) 9160-9167. <https://doi.org/10.1039/C5SM02176F>
- [17] K. Iwanaga, T. Sumizawa, M. Miyazaki, M. Kakemi, Characterization of organogel as a novel oral controlled release formulation for lipophilic compounds, *Int J Pharm*, 388 (2010) 123-128. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.12.045>
- [18] V.K. Singh, I. Banerjee, T. Agarwal, K. Pramanik, M.K. Bhattacharya, K. Pal, Guar gum and sesame oil based novel bigels for controlled drug delivery, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 123 (2014) 582-592. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.056>

- [19] A.C. Couffin-Hoarau, A. Motulsky, P. Delmas, J.C. Leroux, *In situ*-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives, *Pharm Res*, 21 (2004) 454-457. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000019299.01265.05>
- [20] K. Wang, Q. Jia, F. Han, H. Liu, S. Li, Self-assembled L-alanine derivative organogel as *in situ* drug delivery implant: characterization, biodegradability, and biocompatibility, *Drug Dev Ind Pharm*, 36 (2010) 1511-1521. <https://doi.org/10.3109/03639045.2010.488694>
- [21] P. Kirilov, F. Gauffre, S. Franceschi-Messant, E. Perez, I. Rico-Lattes, Rheological characterization of a new type of colloidal dispersion based on nanoparticles of gelled oil, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 11101-11108. <https://doi.org/10.1021/jp905260s>
- [22] A.B. Matheson, V. Koutsos, G. Dalkas, S. Euston, P. Clegg, Microstructure of beta-Sitosterol:gamma-Oryzanol Edible Organogels, *Langmuir*, 33 (2017) 4537-4542. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b00040>
- [23] A.J. Gravelle, M. Davidovich-Pinhas, A.K. Zetzl, S. Barbut, A.G. Marangoni, Influence of solvent quality on the mechanical strength of ethylcellulose oleogels, *Carbohydr. Polym.*, 135 (2016) 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.050>
- [24] Y.E. Shapiro, Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach, *Prog. Polym. Sci.*, 36 (2011) 1184-1253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.04.002>
- [25] P.E. Le Renard, Injectable formulations forming an implant *in situ* as vehicle of silica microparticles embedding superparamagnetic iron oxide nanoparticles for the local, magnetically mediated hyperthermia treatment of solid tumors, Université de Genève, 2011.
- [26] Y. Ma, H. Ma, Z. Yang, J. Ma, Y. Su, W. Li, Z. Lei, Methyl Cinnamate-Derived Fluorescent Rigid Organogels Based on Cooperative π - π Stacking and $C=O \cdots \pi$ Interactions Instead of H-Bonding and Alkyl Chains, *Langmuir*, 31 (2015) 4916-4923. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b00275>
- [27] Y. Li, J. Rodrigues, H. Tomás, Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications, *Chem Soc Rev*, 41 (2012) 2193-2221. <https://doi.org/10.1039/C1CS15203C>
- [28] V. Tantishaiyakul, P. Ouiyangkul, M. Wajarat, T. Pawisat, N. Hirun, T. Sangfai, A Supramolecular Gel Based on 12-Hydroxystearic Acid/Virgin Coconut Oil for Injectable Drug

- Delivery, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 120 (2018) 1800178.
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201800178>
- [29] M. Windorf, *Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –*, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2017, pp. 135.
- [30] A. Prathap, K.M. Sureshan, Sugar-Based Organogelators for Various Applications, *Langmuir*, 35 (2019) 6005-6014. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00506>
- [31] B. Li, B. Wang, X. Huang, L. Dai, L. Cui, J. Li, X. Jia, C. Li, Terphen[n]arenes and Quaterphen[n]arenes (n=3–6): One-Pot Synthesis, Self-Assembly into Supramolecular Gels, and Iodine Capture, *Angewandte Chemie International Edition*, 58 (2019) 3885-3889. <https://doi.org/10.1002/anie.201813972>
- [32] D. Podder, S.R. Chowdhury, S.K. Nandi, D. Haldar, Tripeptide based super-organogelators: structure and function, *New Journal of Chemistry*, 43 (2019) 3743-3749. <https://doi.org/10.1039/C8NJ05578E>
- [33] N. Hou, R. Wang, R. Geng, F. Wang, T. Jiao, L. Zhang, J. Zhou, Z. Bai, Q. Peng, Facile preparation of self-assembled hydrogels constructed from poly-cyclodextrin and poly-adamantane as highly selective adsorbents for wastewater treatment, *Soft Matter*, 15 (2019) 6097-6106. <https://doi.org/10.1039/C9SM00978G>
- [34] R. Xing, K. Liu, T. Jiao, N. Zhang, K. Ma, R. Zhang, Q. Zou, G. Ma, X. Yan, An Injectable Self-Assembling Collagen–Gold Hybrid Hydrogel for Combinatorial Antitumor Photothermal/Photodynamic Therapy, *Advanced Materials*, 28 (2016) 3669-3676. <https://doi.org/10.1002/adma.201600284>
- [35] J. Zhu, R. Wang, R. Geng, X. Zhang, F. Wang, T. Jiao, J. Yang, Z. Bai, Q. Peng, A facile preparation method for new two-component supramolecular hydrogels and their performances in adsorption, catalysis, and stimuli-response, *RSC Advances*, 9 (2019) 22551-22558. <https://doi.org/10.1039/C9RA03827B>
- [36] F.J. Tan SX, Moini SH, Development and Validation of a HPLC Method for Clotrimazole Drug Substance Assay and Impurities., *U.S. Pharmacopeia (Ed.)*, The department of health, 2009.
- [37] P. Ravisankar, A. Niharika, S. Sireesha, O. Koushik, V. Himaja, Development and validation of RP-HPLC method for quantitative estimation of acyclovir in bulk drug and tablets, *J. chem. pharm. Sci.*, 8 (2015) 73-80.

- [38] Y.B. Schuetz, R. Gurny, O. Jordan, A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan, *Eur J Pharm Biopharm*, 68 (2008) 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.06.020>
- [39] E. Chiesa, S. Pisani, B. Colzani, R. Dorati, B. Conti, T. Modena, K. Braekmans, I. Genta, Intra-Articular Formulation of GE11-PLGA Conjugate-Based NPs for Dexamethasone Selective Targeting-*In vitro* Evaluation, *Int J Mol Sci*, 19 (2018) 1-22. <https://doi.org/10.3390/ijms19082304>
- [40] L. Peng, Y. Liu, J. Gong, K. Zhang, J. Ma, Continuous fabrication of multi-stimuli responsive graphene oxide composite hydrogel fibres by microfluidics, *RSC Advances*, 7 (2017) 19243-19249. <https://doi.org/10.1039/C7RA01750B>
- [41] S. Thirumala, J.M. Gimble, R.V. Devireddy, Methylcellulose based thermally reversible hydrogel system for tissue engineering applications, *Cells*, 2 (2013) 460-475. <https://doi.org/10.3390/cells2030460>
- [42] A. Lalloz, M.A. Bolzinger, J. Faivre, P.L. Latreille, A. Garcia Ac, C. Rakotovao, J.M. Rabanel, P. Hildgen, X. Banquy, S. Briancon, Effect of surface chemistry of polymeric nanoparticles on cutaneous penetration of cholecalciferol, *Int J Pharm*, 553 (2018) 120-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.09.046>
- [43] P.S. Gide, S.K. Gidwani, K.U. Kothule, Enhancement of transdermal penetration and bioavailability of poorly soluble acyclovir using solid lipid nanoparticles incorporated in gel cream, *Indian J Pharm Sci*, 75 (2013) 138-142.
- [44] Q. Bao, B. Newman, Y. Wang, S. Choi, D.J. Burgess, *In vitro* and *ex vivo* correlation of drug release from ophthalmic ointments, *J Control Release*, 276 (2018) 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.03.003>
- [45] L. Huyck, C. Ampe, M. Van Troys, The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix, *Assay Drug Dev Technol*, 10 (2012) 382-392. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.391>
- [46] Y. Lan, M.A. Rogers, 12-Hydroxystearic acid SAFiNs in aliphatic diols – a molecular oddity, *CrystEngComm*, 17 (2015) 8031-8038. [10.1039/C5CE00652J](https://doi.org/10.1039/C5CE00652J)
- [47] H. Almeida, M. Helena Amaral, P. Lobão, Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and selfregulated drug delivery, *J. appl. pharm. sci.*, 2 (2012) 1-10. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2012.2609>

- [48] A.K. Mahanta, S. Senapati, P. Maiti, A polyurethane–chitosan brush as an injectable hydrogel for controlled drug delivery and tissue engineering, *Polym. Chem*, 8 (2017) 6233-6249. <https://doi.org/10.1039/C7PY01218G>
- [49] A.R. Patel, P. Dumlu, L. Vermeir, B. Lewille, A. Lesaffer, K. Dewettinck, Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions, *Food Hydrocolloids*, 46 (2015) 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.029>
- [50] V.A. Mallia, R.G. Weiss, Structure-Property Comparison and Self-Assembly Studies of Molecular Gels Derived from (R)-12-Hydroxystearic Acid Derivatives as Low Molecular Mass Gelators, *Gels and Other Soft Amorphous Solids*, ACS, 2018, pp. 227-243.
- [51] L. Tan, S. Liu, D. Pan, Viscoelastic Behavior of Polyacrylonitrile/Dimethyl Sulfoxide Concentrated Solution during Thermal-Induced Gelation, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 603-609. <https://doi.org/10.1021/jp809701b>
- [52] R. Ranjan, K. Rawat, H.B. Bohidar, Folic acid supramolecular ionogels, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 19 (2017) 22934-22945. <https://doi.org/10.1039/C7CP03639F>
- [53] G. Nava, T. Yang, V. Vitali, P. Minzioni, I. Cristiani, F. Bragheri, R. Osellame, L. Bethge, S. Klussmann, E.M. Paraboschi, R. Asselta, T. Bellini, Newtonian to non-newtonian fluid transition of a model transient network, *Soft Matter*, 14 (2018) 3288-3295. <https://doi.org/10.1039/C8SM00373D>
- [54] Z. Liu, P. Yao, Injectable shear-thinning xanthan gum hydrogel reinforced by mussel-inspired secondary crosslinking, *RSC Adv*, 5 (2015) 103292-103301. <https://doi.org/10.1039/C5RA17246B>
- [55] V. Burckbuchler, G. Mekhloufi, A.P. Giteau, J.L. Grossiord, S. Huille, F. Agnely, Rheological and syringeability properties of highly concentrated human polyclonal immunoglobulin solutions, *Eur J Pharm Biopharm*, 76 (2010) 351-356. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.08.002>
- [56] Q. Zhang, M.A. Fassihi, R. Fassihi, Delivery Considerations of Highly Viscous Polymeric Fluids Mimicking Concentrated Biopharmaceuticals: Assessment of Injectability via Measurement of Total Work Done “WT”, *AAPS PharmSciTech*, 19 (2018) 1520-1528. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0963-x>
- [57] A. Akelah, *Functionalized Polymeric Materials in Agriculture and the Food Industry*, Springer US, 2013, pp. 143.

- [58] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nat. Rev. Mater.*, 1 (2016) 16071. <https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.71>
- [59] M. Dallet, Background document on clotrimazole (2013 update), OSPAR Commission, London, United Kingdom (2013).
- [60] P.M. Bhupendra, Panchal; Umang, Varia, Formulation and Evaluation of Aciclovir Loaded Novel Gelfor Topical Application, *Biomed J Sci & Tech Res*, 1 (2017) 319-324. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2017.01.000184>
- [61] K. Iwanaga, M. Kawai, M. Miyazaki, M. Kakemi, Application of organogels as oral controlled release formulations of hydrophilic drugs, *Int. J. Pharm*, 436 (2012) 869-872. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.041>
- [62] W. Li, J. Zhou, Y. Xu, Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices, *Biomedical reports*, 3 (2015) 617-620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>
- [63] L. Lukyanova, S. Franceschi-Messant, P. Vicendo, E. Perez, I. Rico-Lattes, R. Weinkamer, Preparation and evaluation of microporous organogel scaffolds for cell viability and proliferation, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79 (2010) 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.03.044>
- [64] R. Pignatello, *Biomaterials: Physics and Chemistry*, IntechOpen, 2011, pp. 56.
- [65] C.B. Fox, Squalene emulsions for parenteral vaccine and drug delivery, *Molecules*, 14 (2009) 3286-3312. <https://doi.org/10.3390/molecules14093286>
- [66] C. Hou, New bioactive fatty acids, *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 17 Suppl 1 (2008) 192-195.
- [67] S. Pabis, J. Kula, Synthesis and Bioactivity of (R)-Ricinoleic Acid Derivatives: A Review, *Curr Med Chem*, 23 (2016) 4037-4056. <https://doi.org/10.2174/09298673233666160627104453>
- [68] I.M. El-Sherbiny, M.H. Yacoub, Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges, *Global cardiology science & practice*, 2013 (2013) 316-342. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>
- [69] C.R. Harrell, V. Djonov, C. Fellabaum, V. Volarevic, Risks of Using Sterilization by Gamma Radiation: The Other Side of the Coin, *Int J Med Sci*, 15 (2018) 274-279. <https://doi.org/10.7150/ijms.22644>

Legends to figures

Figure. 1. Chemical structures of the various ingredients used in this study.

Figure. 2. Sol-gel and gel-sol phase transition curves of 12-HSA (blue circles) and 12-HSA T80 (red squares) organogels at various organogelator concentrations, established by the inverted-tube method.

Figure. 3. Temperature sweep experiments. Heating (left) and cooling (right) cycles for (a) 12-HSA and (b) 12-HSA T80 organogels prepared using (pink lozenges) 2, (green inverted triangles) 4, (blue triangles) 6, (red squares) 8 and (black circles) 10 wt% 12-HSA. G' and G'' are shown as plain and open symbols, respectively.

Figure. 4. Frequency sweeps (at $\tau = 0.2$ Pa) (a,c) and shear rate ramps (b, d) shown as apparent viscosity (η_{app}) versus shear rate for 12-HSA (a, b) and 12-HSA T80 (c, d) organogels. (pink lozenges) 2, (green inverted triangles) 4, (blue triangles) 6, (red squares) 8 and (black circles) 10 wt% 12-HSA; G' and G'' are shown as plain and open symbols, respectively.

Figure. 5. Design-Expert plots: 3D–surface plots (a, c, e) and corresponding 2-D surface plots (b, d, f) for the debit at Force at 12-HSA concentrations through 21G x 1 1/2" (a, b) and 25G x 1 5/8" (c, d) needles and needle inner diameter at 12-HSA:T80 ratio of 1:25 w/w (e, f), respectively.

Figure. 6. Swelling ratio (a) and dried mass weight loss (b) of 4- (green inverted triangles) and 10- (black circles) wt% 12-HSA organogels and 4- (green triangles) and 10- (gray squares) wt% 12-HSA T80 organogels. Swelling and erosion experiments performed in PBS (pH = 7.4, 37 °C).

Figure. 7. Diffusion experiments in Franz diffusion cells of ACV (a) model drug from solution (blue lozenges), 4- (green triangles) and 10- (gray squares) wt% 12-HSA T80 organogels and CTM (b) solution (orange circles), 4- (green inverted triangles) and 10- (black circles) wt% 12-HSA organogels. Used release media were a saline solution (0.9 %) and an ethanolic solution of

PBS (pH 7.4), respectively. Each value represents the mean and standard deviation of 3 independent experiments.

Figure. 8. *Ex vivo* permeation profiles of ACV and CTM through guinea pig skin (a), corresponding Papp (n =3), (* p < 0.05) after a 6-h exposure (b), steady state fluxes and *in vitro* release rates obtained with the zero-order model fitting (n = 3) at 6 h (c), and residual amounts of ACV and CTM in different porcine skin layers according to the formulations, expressed in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (d).

ACV model drug in solution (blue) or in 4- (light green) and 10- (light gray) wt% 12-HSA T80 organogels; CTM model drug in solution (orange), 4- (green) and 10- (dark gray) wt% 12-HSA organogels.

Figure. 9. MTS-based cell viability of 3D collagen-embedded HFF cells (a) and HFF cell monolayers (b) treated with 24-h extracts of 12-HSA (blue bars) and 12-HSA T80 (red bars) organogels. Black bars represent viability of untreated cells whereas gray bars show the viability of HFF cells treated with 5% SDS. Graphs represent means \pm standard deviations (n = 3). Stars show the statistically significant differences according to Student's *t*-test (p < 0.05) between 12-HSA and 12-HSA T80 organogel groups.

Table 1. Gelling (T_{gel}) and melting (T_{melt}) temperatures of 12-HSA-based organogels and maximum G' recordings.

Composition	Organogelator concentration (wt%)	T _{gel} (°C)	T _{melt} (°C)	Maximum G' value (Pa)	Temperature at which max. G' value was recorded (°C)
12-HSA	2	37	79	1784	10
	4	36	80	6588	11
	6	25	80	12,546	10
	8	26	80	23,215	15
	10	21	80	86,321	10
12-HSA T80	2	37	75	1245	17
	4	35	79	5236	10
	6	30	80	2234	10
	8	26	80	9998	11
	10	21	84	66,321	10

Table 2. Model fitting of *in vitro* and *ex vivo* drug release profiles after a 6-h exposure of ACV- and CTM-loaded 12-HSA-based organogels using Franz diffusion cells.

Formulation	Zero order		First order model		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		Hixson-Crowell	
	R ²	K ₀	R ²	K ₁	R ²	K _H	R ²	n	R ²	K ₃
<i>In vitro</i> drug release										
CTM - 4 wt% 12-HSA	0.9902	3.391 ± 0.1507	0.982	0.03506 ± 0.00212	0.9763	10.74 ± 0.7477	0.9353	0.2518 ± 0.03825	0.9903	0.5481 ± 0.01218
CTM - 10 wt% 12-HSA	0.9799	3.509 ± 0.2248	0.958	0.03738 ± 0.003502	0.9963	11.29 ± 0.3064	0.993	0.2536 ± 0.01222	0.9871	0.5303 ± 0.01436
ACV - 4 wt% 12-HSA T80	0.9029	2.387 ± 0.3501	0.8339	0.06461 ± 0.01289	0.973	7.903 ± 0.5889	0.9828	0.2872 ± 0.02193	0.9104	0.1673 ± 0.02115
ACV - 10 wt% 12-HSA T80	0.9099	2.406 ± 0.3386	0.819	0.07274 ± 0.01529	0.9755	7.945 ± 0.5627	0.9908	0.315 ± 0.01752	0.9172	0.1339 ± 0.02022
<i>Ex vivo</i> drug release										
CTM - 4 wt% 12-HSA	0.9554	2.988 ± 0.2888	0.9281	0.0365 ± 0.004544	0.9623	9.565 ± 0.8465	0.8914	0.2374 ± 0.0474	0.961	0.06266 ± 0.005663
CTM - 10 wt% 12-HSA	0.9306	3.839 ± 0.4688	0.8962	0.04068 ± 0.006191	0.968	12.49 ± 1.016	0.8788	0.1937 ± 0.04153	0.9442	0.08566 ± 0.009315
ACV - 4 wt% 12-HSA T80	0.9257	1.152 ± 0.1459	0.9044	0.04082 ± 0.005935	0.916	3.656 ± 0.495	0.9388	0.3786 ± 0.0558	0.9288	0.01954 ± 0.002419
ACV - 10 wt% 12-HSA T80	0.992	1.274 ± 0.05109	0.9715	0.04867 ± 0.003726	0.9936	4.068 ± 0.1458	0.9953	0.3391 ± 0.01349	0.9935	0.02138 ± 0.0007725

Graphical abstract

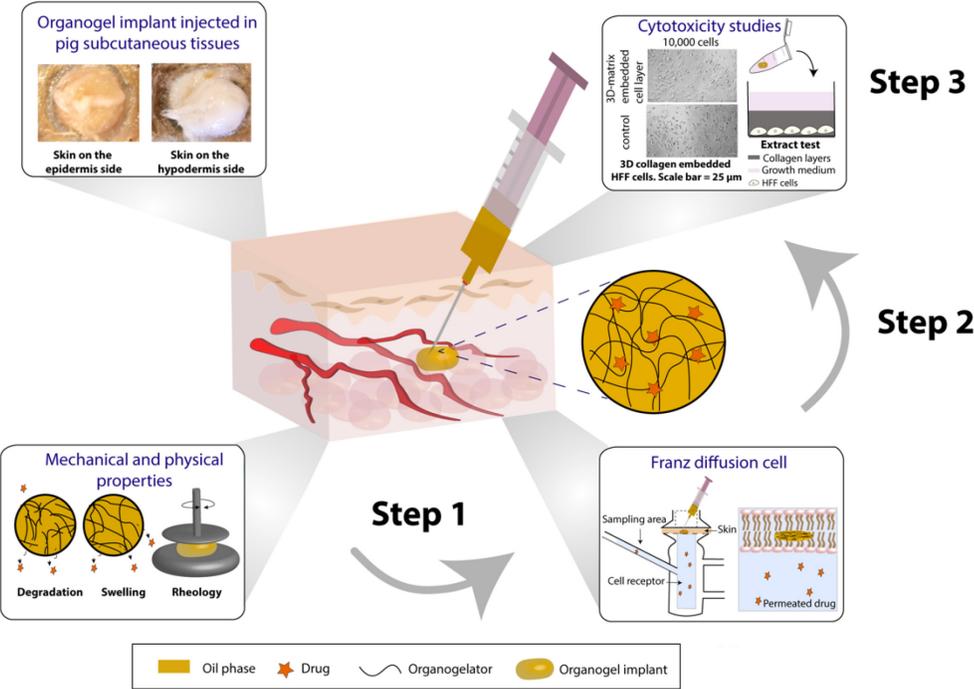


Figure 2.

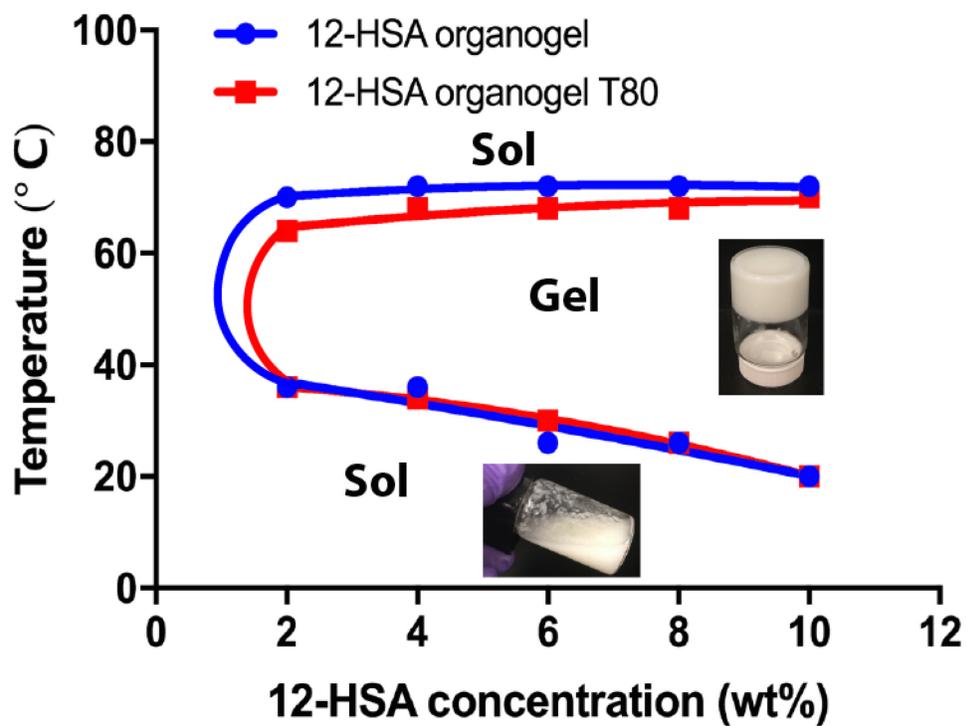


Figure 3.

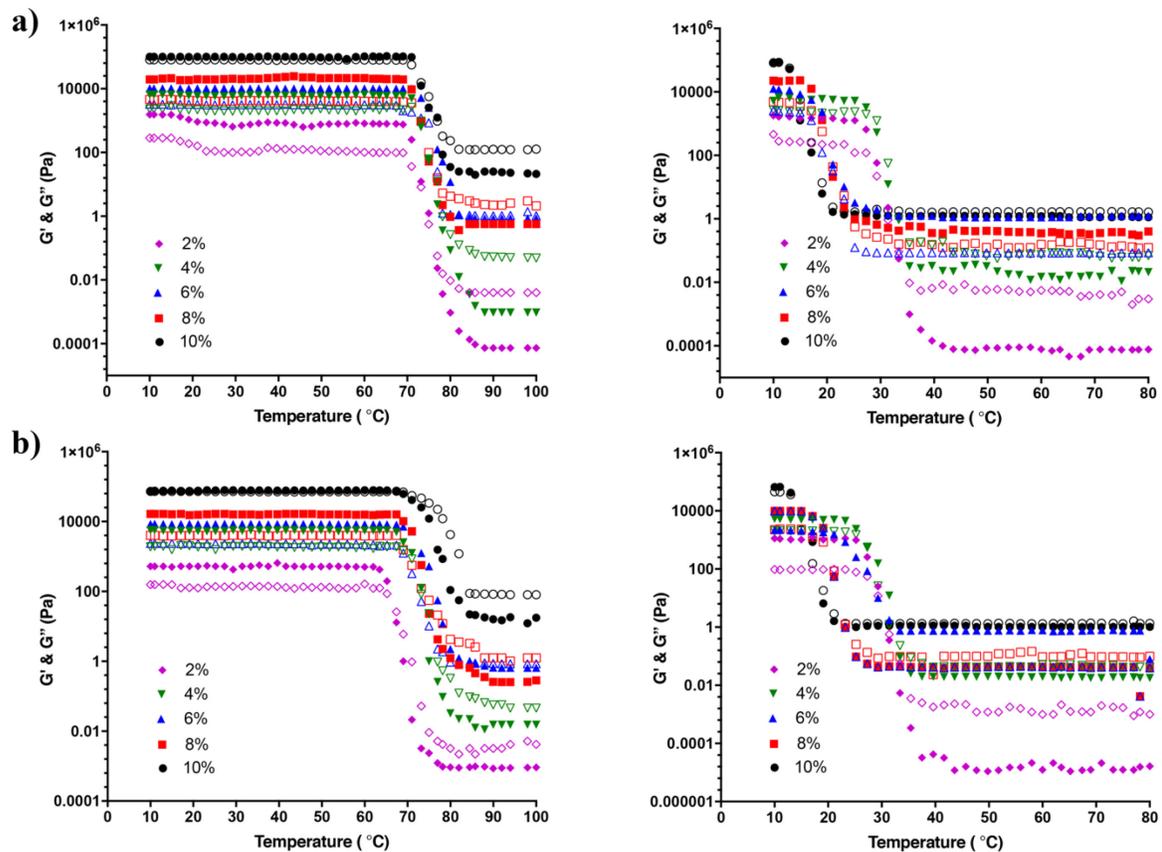


Figure 4.

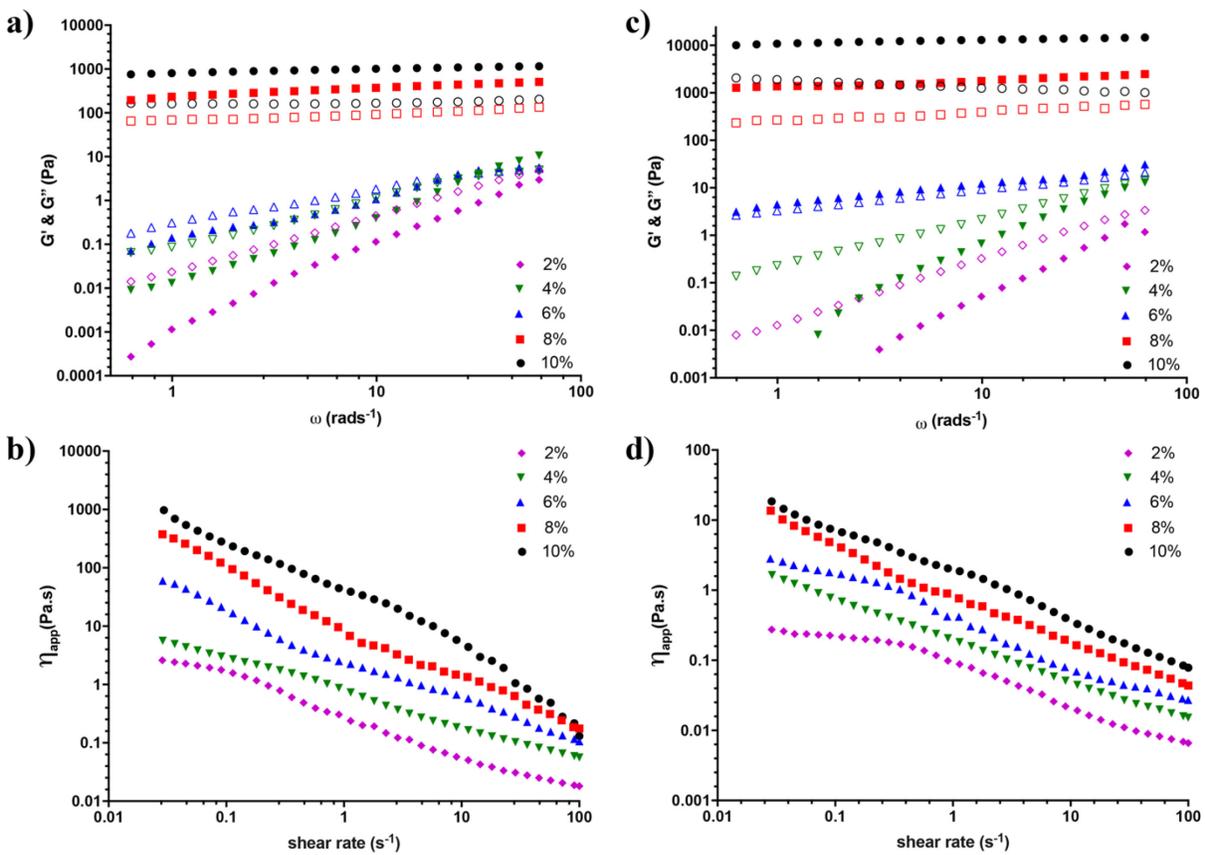


Figure 5.

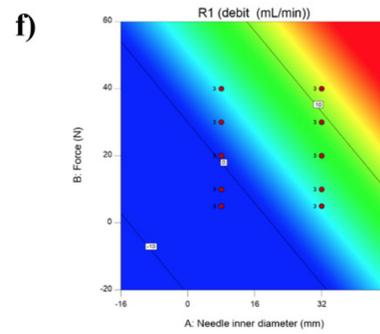
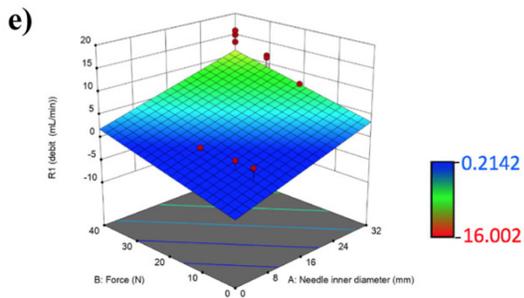
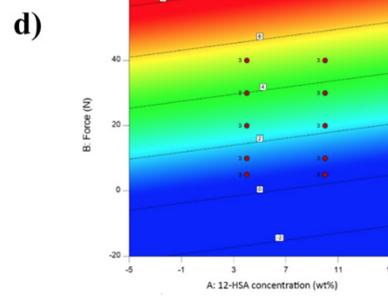
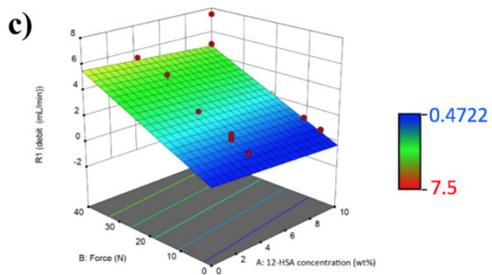
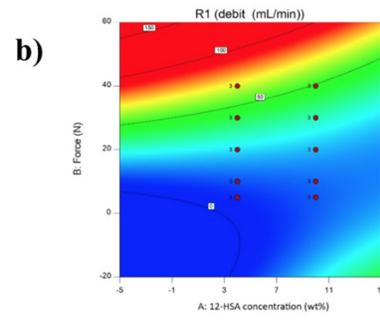
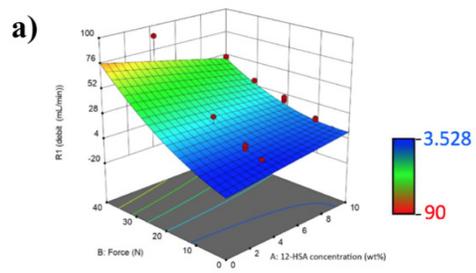


Figure 6.

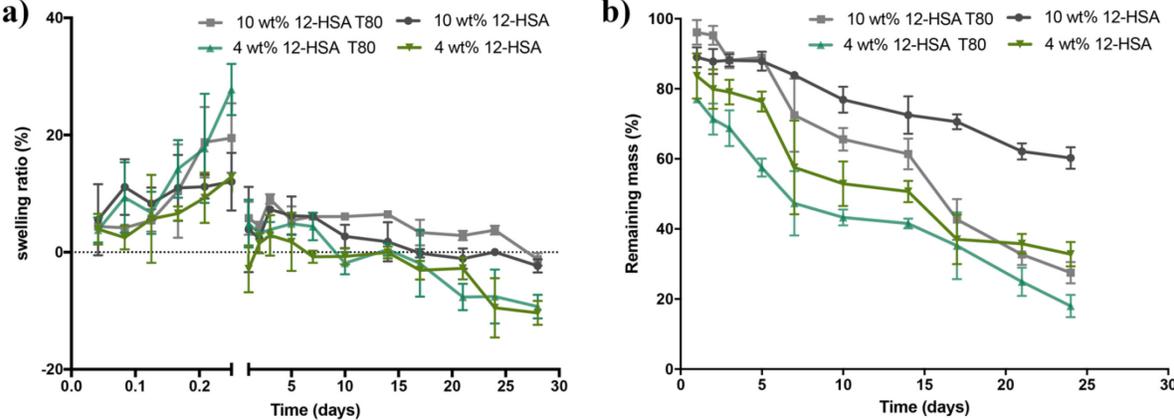


Figure 7.

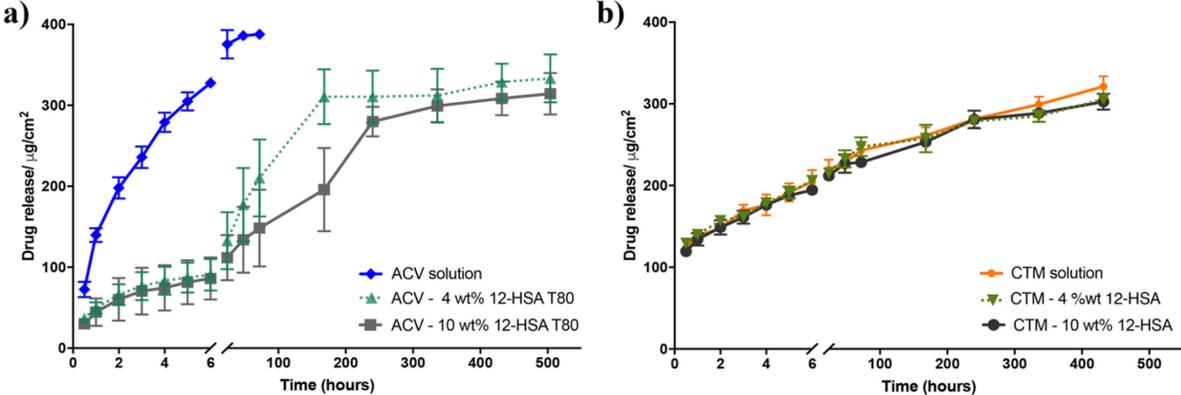


Figure 8.

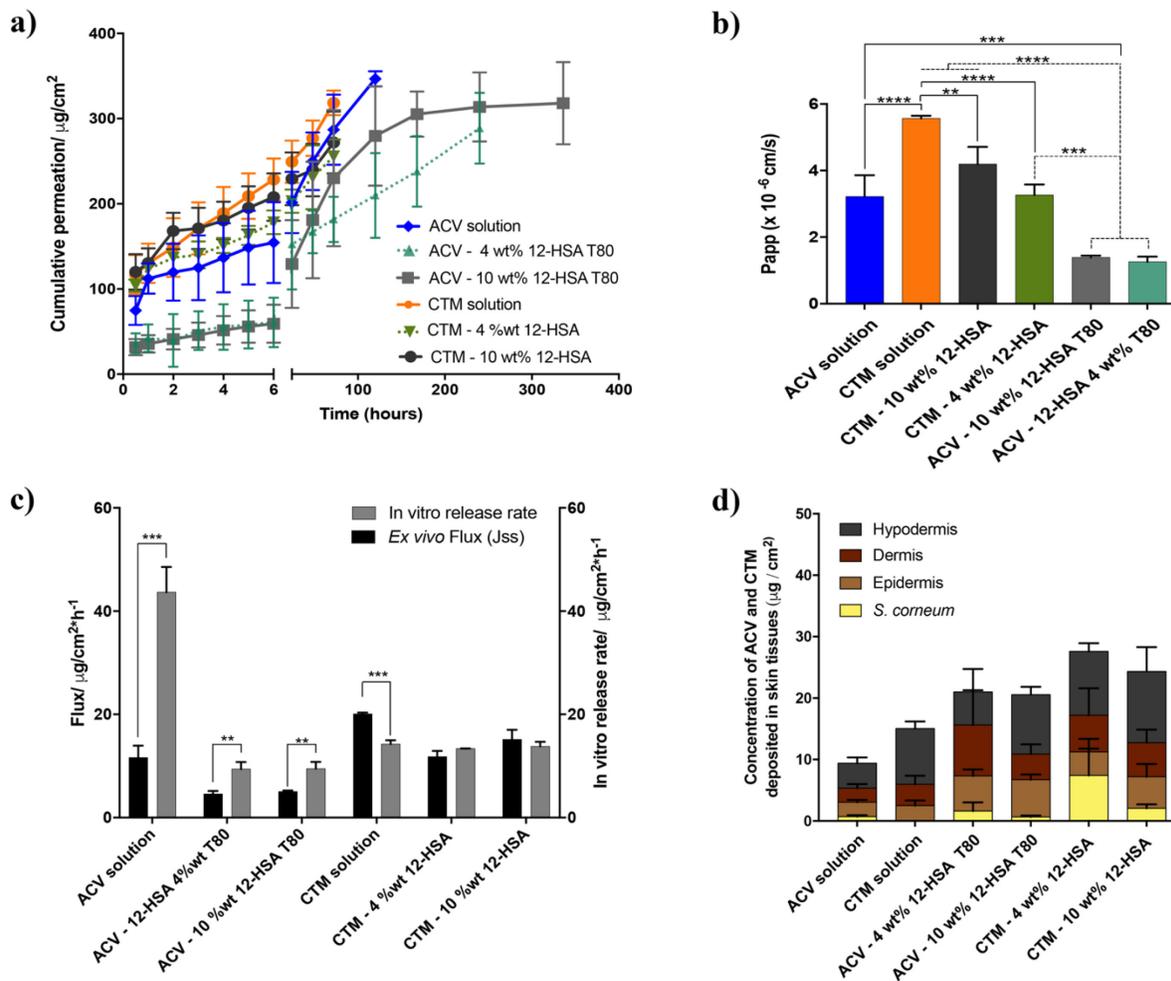
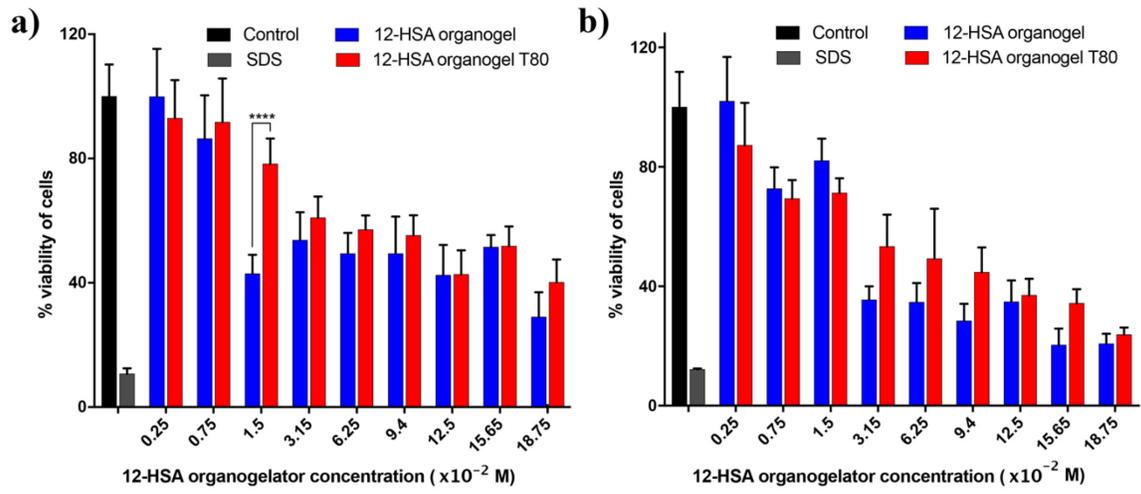


Figure 9.



Supplemental table

Table S1. Mechanical properties of the organogel formulations.

Organogel formulation	Concentration (wt%)	Linear viscoelastic theory equation at equilibrium ([1])				Ostwald-de Waele Power law model	
		$G'(\omega) \sim \omega^{n'}$		$G''(\omega) \sim \omega^{n''}$		$\eta = k \dot{\gamma}^{n-1}$	
		R^2	n'	R^2	n''	R^2	n
12-HSA	2	0.9957	1.9669	0.9996	1.2994	0.9912	0.330
	4	0.9916	1.6188	0.9909	1.0502	0.9967	0.411
	6	0.985	0.9976	0.9920	0.7514	0.9889	0.251
	8	0.9902	0.1978	0.9753	0.1551	0.9917	0.008
	10	0.9911	0.0916	0.7029	0.0438	0.9790	0.012
12-HSA T80	2	0.8470	1.4130	0.9992	1.3691	0.9694	0.489
	4	0.9969	1.4630	0.9992	1.0105	0.999	0.418
	6	0.9906	0.4438	0.9994	0.4405	0.9872	0.371
	8	0.9641	0.1463	0.9712	0.19	0.9958	0.321
	10	0.9853	0.0760	0.9860	-0.152	0.9962	0.339

Supplemental figures

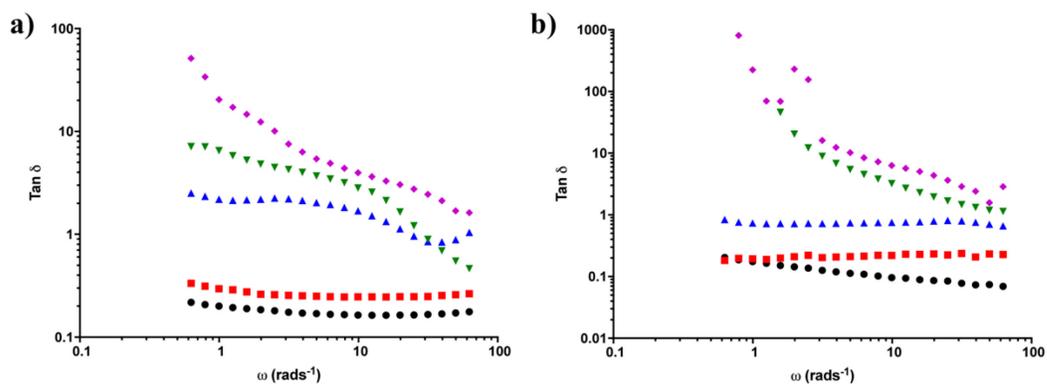


Figure S1. Rheological behaviors ($\text{Tan}(\delta)=f(\omega)$) of 12-HSA (a) and 12-HSA T80 (b) organogels, prepared with 2- (pink lozenges), 4- (inverted green triangles), 6- (blue triangles), 8- (red squares) and 10- (black circles) wt% 12-HSA, under frequency sweeps at $\tau=0.2$ Pa.

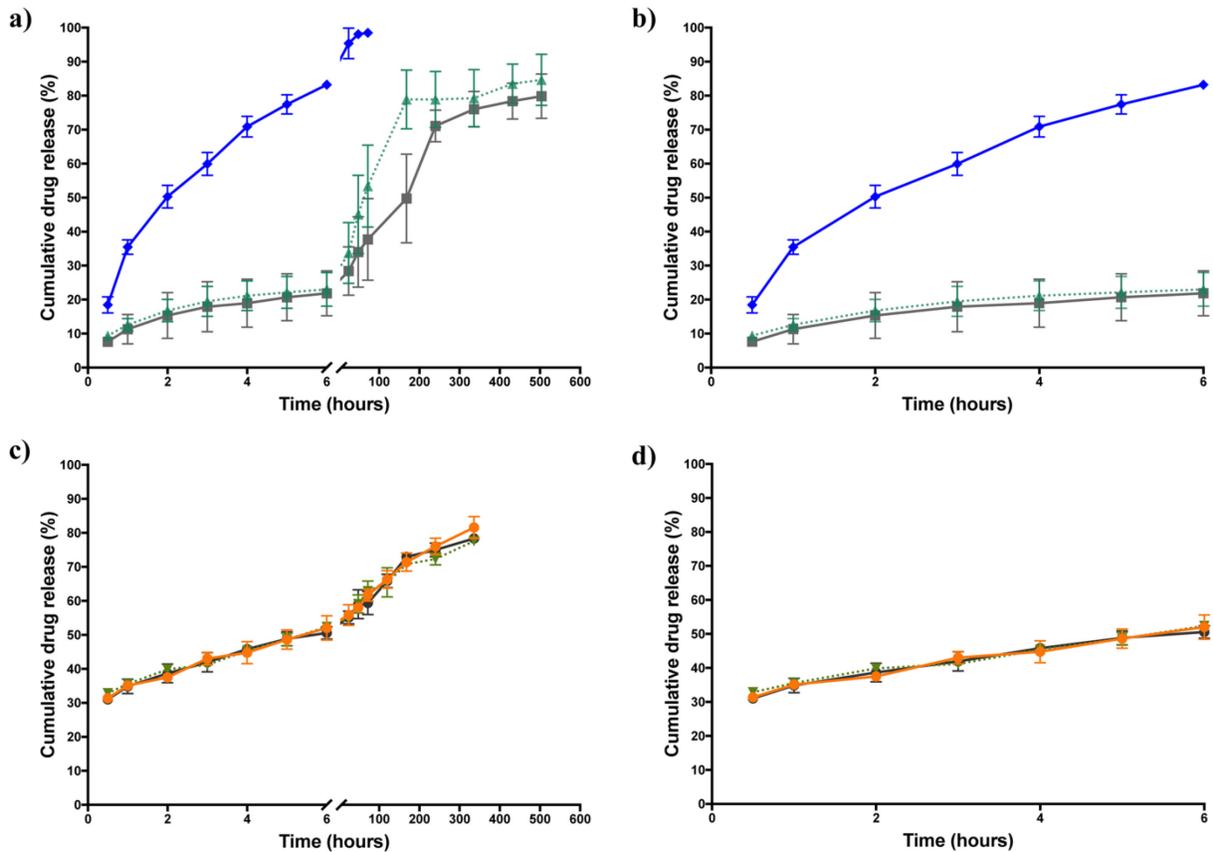


Figure S2. Release profiles in Franz diffusion cells of ACV (a,b) model drug from solution (blue lozenges), 4- (green triangles) and 10- (gray squares) wt% 12-HSA T80 organogels and CTM (c,d) solution (orange circles), 4- (green inverted triangles) and 10- (dark grey circles) wt% 12-HSA organogels. Enlargement (b, d) of the first 6-h time points, used to establish the model fitting for the release kinetics. Used release media were a saline solution (0.9 %) and an ethanolic solution of PBS (pH 7.4), respectively. Each value represents the mean and standard deviations of 3 independent experiments.

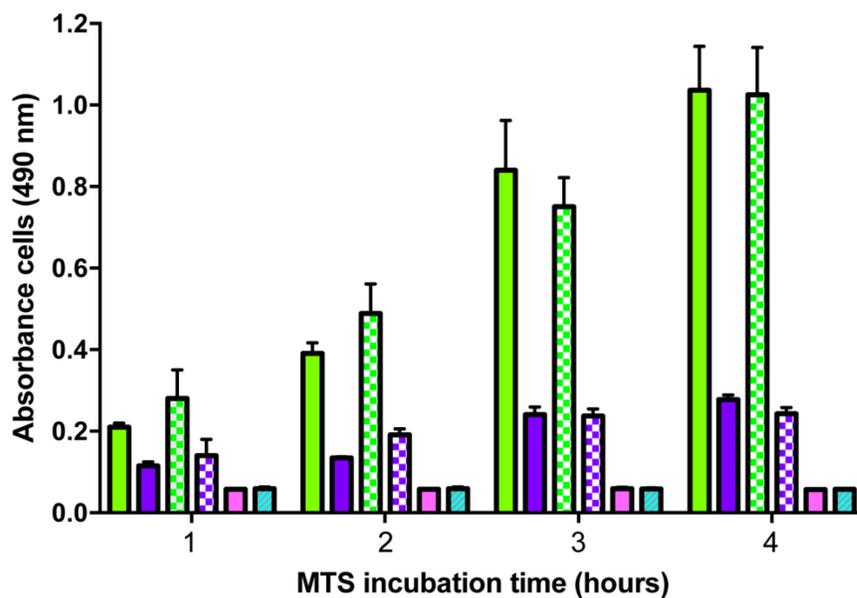


Figure S3. Influence of incubation time of the MTS reactive on cell proliferation absorbances (490 nm) in 2D cell cultures (plain bars) and 3D matrix-embedded cell layers (tiled bars). Untreated cells are in green, whereas positive controls (SDS treated cells) are in purple. Background signals are in pink and blue for 2D and 3D cultures, respectively. Data show the means \pm SD of triplicate independent experiments ($n = 3$).

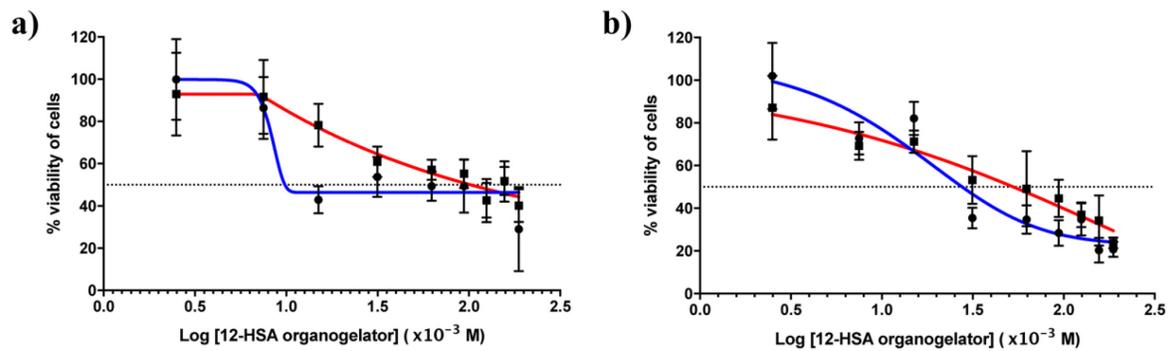


Figure S4. EC₅₀ determinations from dose-response curves tested for 12-HSA (blue circles) and 12-HSA T80 (red squares) organogelators on inhibiting viability of HFF cells for 2D cell monolayers (a) and 3-D collagen embedded HFF cells (b) via MTS-based cytotoxic assays after 24 h. Data show the means \pm SD of triplicate independent experiments (n = 3).

Supplemental reference

[1] A.R. Patel, M. Babaahmadi, A. Lesaffer, K. Dewettinck, *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (2015) 4862-4869.

3.3 Troisième étude : A quantitative UHPLC-MS/MS method for the growth hormone-releasing peptide-6 determination in complex biological matrices and transdermal formulations

Article publié dans *Talanta* 233 : 122555 (2021)

Cloé L. Esposito^a, Araceli Garcia Ac^a, Elise Laszlo^a, Sung Vo Duy^b, Catherine Michaud^a, Sébastien Sauvé^b, Huy Ong^a, Sylvie Marleau^a, Xavier Banquy^a, Davide Brambilla^{a,*}

^aFaculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

^bDepartment of Chemistry Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

*Correspondence to Davide Brambilla, PhD, Faculté de pharmacie, Université de Montréal, 2940 Chemin de Polytechnique, Montréal, Canada.

E-mail : davide.brambilla@umontreal.ca

Contribution des auteurs

Cloé L. Esposito

Conceptualisation du projet, méthodologie, validation des résultats, analyse formelle, partie expérimentale, visualisation, rédaction – préparation du brouillon original, rédaction – révision et édition.

Araceli Garcia Ac

Conceptualisation du projet, méthodologie, validation des résultats, analyse formelle, partie expérimentale, rédaction – révision et édition.

Élise Laszlo

Méthodologie, validation des résultats, partie expérimentale, rédaction – révision et édition.

Sung Vo Duy

Méthodologie, validation des résultats, partie expérimentale, rédaction – révision et édition.

Catherine Michaud

Partie expérimentale.

Sébastien Sauvé

Ressources, rédaction – révision et édition.

Huy Ong

Supervision, ressources, rédaction – révision et édition.

Sylvie Marleau

Conceptualisation du projet, supervision, ressources, rédaction – révision et édition.

Xavier Banquy

Ressources, rédaction – révision et édition, financement du projet.

Davide Brambilla

Conceptualisation du projet, gestion de projet, supervision, ressources, rédaction – révision et édition, financement du projet.

RÉSUMÉ

L'hexapeptide GHRP-6 (*growth hormone-releasing peptide-6*) fait partie d'un groupe de peptides synthétiques appelés sécrétagogues de l'hormone de croissance qui ont attiré l'attention au cours des deux dernières décennies en raison de leurs effets cyto- et cardioprotecteurs. Malgré de nombreuses études précliniques mettant en évidence les effets bénéfiques cardiovasculaires potentiels du GHRP-6, la confirmation de leur efficacité clinique est toujours attendue. Des progrès récents au niveau des systèmes d'administration transdermique de médicaments ont été réalisés pour relever les défis liés aux faibles taux de perméation cutanée des peptides en utilisant des timbres de microaiguilles. Par conséquent, des méthodes analytiques hautement sensibles et validées sont nécessaires pour une transition en clinique potentielle des timbres de microaiguilles pour l'administration de peptides.

Des méthodes utilisant la chromatographie liquide de ultra-haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (UHPLC-MS/MS, *ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*) ont été développées dans cette étude afin de quantifier le GHRP-6 dans les matrices biologiques (plasma, peau) et les microaiguilles se dissolvant dans la peau. Les limites de détection de la méthode UHPLC/MS-MS obtenues étaient de 0,1, 1,1, 0,9 et 1,5 ng / mL pour une solution dépourvue de matrice et les matrices de plasma, de microaiguilles et de peau, respectivement. La validation de la méthode impliquait également l'évaluation de la précision, de l'exactitude, des limites de quantification, de la linéarité des courbes d'étalonnage ($R^2 > 0,990$), de l'efficacité de récupération lors de l'extraction de l'analyte, de l'effet de matrice, des études de stabilité, de la sélectivité et de l'effet de *carry-over*. De plus, des échantillons de contrôle de qualité ont été analysés à trois niveaux de concentration pour déterminer l'efficacité de récupération (85 à 109 %) et de précision / biais (3,2 à 14,7 %). La précision intra et inter-jours était dans la plage d'acceptation (déviations standard relatives de 3,0 à 13,9 % et de 0,4 à 14,5 %, respectivement). La validité et l'applicabilité de ces méthodes ont été démontrées pour l'administration transdermique de GHRP-6 à l'aide de timbres de microaiguilles chargés de GHRP-6 et appliqués sur la peau de porc.

Mots clés : UHPLC-MS/MS, plasma, administration transdermique de médicaments, peau, extraction, peptide.

ABSTRACT

Growth hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) is part of a group of small synthetic peptides with potent GH-releasing activity that have gained attention in the last two decades by virtue of their cyto- and cardioprotective effects. Despite numerous preclinical studies highlighting the potential cardiovascular benefits of GHRP-6, confirmation of clinical efficacy is still awaited. Recent advances in transdermal drug delivery systems have been made to address challenges related to the poor skin permeation rate of peptides by using pain-free microneedle (MN) devices. Accordingly, highly sensitive and validated analytical methods are required for the potential clinical translation of MN-based peptides. The ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) methods developed in this study aimed to quantify GHRP-6 in biological matrices (plasma, skin) and dissolving polymeric MNs. UHPLC/MS-MS method detection limits of 0.1, 1.1, 0.9 and 1.5 ng/mL were achieved in neat solution, plasma, MN polymer solution, and skin matrices, respectively. Method validation also involved assessment of precision, accuracy, limits of quantification, linearity of matched calibration curves ($R^2 > 0.990$), extraction recovery, matrix effect, stability studies, selectivity, and carry-over effect. Additionally, quality control samples were analyzed at three concentration levels to determine recovery (85-109%) and accuracy/bias (3.2-14.7%). Intra- and inter-day precision were within the range of acceptance (RSDs of 3.0-13.9% and 0.4-14.5%, respectively). The validity and applicability of such methods were successfully demonstrated for transdermal GHRP-6 delivery using GHRP-6-loaded MN patches applied to pig skin.

KEYWORDS : UHPLC-MS/MS, plasma, transdermal drug delivery, skin, extraction, peptide.

1. INTRODUCTION

Growth hormone-releasing peptides (GHRPs) are a family of small synthetic peptides that showed potent GH-releasing activity through the growth hormone secretagogue receptor (GHSR) located in the hypothalamus and the pituitary gland [1, 2]. In addition, systemic administration of these peptides has demonstrated several pharmacological effects including cytoprotection, cardioprotection, neuroprotection and a number of beneficial metabolic effects [1-3]. Among them, GHRP-6 (His-DTrp-Ala-Trp-DPhe-Lys-NH₂), a synthetic hexapeptide, was the first in the GHRP series to show potent GH-releasing activity both *in vitro* and *in vivo* [2, 4, 5]. GHRP-6 can also interact with the CD36, a myocardial fatty acid transporter [6] and a scavenger receptor found on macrophages, monocytes and the endothelium of microvessels, which may lead to the anti-atherosclerotic effect of GHRPs *in vivo* in a CD36-dependent manner [7]. The administration of peptide drugs is limited to the invasive parenteral route due to their instability, the harsh conditions within the GI tract (low pH and enzymatic digestion), and poor epithelial permeability [8, 9]. A non-invasive transdermal route would represent an appealing alternative; however, this drug delivery strategy is hindered as peptides do not cross the epidermal layer. Thus, the development of minimally invasive drug delivery technologies represents a clinically relevant field of research for this class of molecules. Among them, dissolving polymer-based microneedles (MNs) could allow the painless self-applicable transdermal administration of peptides, thus improving the quality of life of patients [10].

To date, analytical methods have been developed to analyze only GHRP-6, mainly in urine [11-15] and dried blood spots (DBS) [16] due to the fact that GHRPs are listed on the World-Anti-Doping-Agency's Prohibited list [11, 16, 17]. However, there exist many challenges in developing a specific and sensitive method to quantify GHRP-6 and derivatives in biological samples, including the need for an internationally standardized method (ISO, OECD) [11], cross-reactivity for immunoassays [18] and limited linear dynamic range in LC-MS [19]. Accordingly, the analysis of peptides using liquid chromatography (LC)-coupled with mass spectrometry (MS) (LC-MS or LC-MS/MS) has emerged as a sophisticated characterization and quantification tool offering single- and multi-analyte screening for GHRPs [17]. Gil *et al.* developed a nano LC-MS method for the quantification of GHRP-6 in human plasma after extraction by protein precipitation using

cold acetone (-20 °C) at a 4:1 ratio to plasma [20]. To our knowledge, this is the only method reported to quantify GHRP-6 in plasma to date. The method could achieve a limit of quantification (LOQ) of 5 ng/mL with no matrix effects in plasma compared to neat solution. Nevertheless, the use of a nano-flow LC column increases the risk of saturation issues (stationary phase overload, ion-source and detector saturation) and may prove less robust than standard LC analytical columns [21]. Min *et al.* used LC-MS/MS to quantify GHRPs (including GHRP-6 and its metabolites) in human urine with weak cation exchange (WCX) [11]. The authors achieved suitable limit of detection (LOD) performance for GHRP-6 (0.5 ng/mL) and low matrix effects (3% signal enhancement) despite a slightly low recovery at 2 ng/mL (57.7%).

In recent years, only a few methods have been developed to quantify peptides in matrices such as skin, plasma, and polymeric transdermal formulations, including dissolving MN patches, which would be crucial for pharmacokinetic studies and drug delivery methods optimization. These analytical approaches were mainly used for (1) pentagastrin and sincalide studies in porcine skin and MNs using LC-MS [22], (2) hydrophilic model peptides delivered by MNs using LC-UV/Vis [23], and (3) recombinant human growth hormone and desmopressin in plasma and MNs using enzyme immunoassay and LC-MS/MS, respectively [24]. Analytical methods currently available in literature for GHRP-6 may not be directly transferrable to MNs and skin due to the need for tailored preparation methods. Biological matrices used to assess the percutaneous absorption of drugs are also essential to understanding the key factors influencing *ex vivo* and *in vivo* studies [25]. In transdermal drug delivery studies with MNs, new effective and sensitive methodologies are needed to enhance standardization of MNs drug quantification as these devices are currently undergoing clinical trials. Formulation excipient-mediated matrix effects can cause significant ion suppression and may therefore affect the reliability of pharmacokinetics data [26]. These matrix components are typically present at high concentrations and can have a major impact on the electrospray ionization (ESI) of coeluted target analytes, including signal suppression (commonly) or enhancement phenomena depending on the physicochemical properties of the excipient [27]. Well-validated calibration techniques are thus essential to reduce or compensate for matrix effects and ensure reliable and accurate LC-MS/MS data. As a solvent-based internal calibration alone cannot always counteract matrix effects, the additional use of matrix-matched calibrants can be recommended [28]. Stable isotope internal standards are usually employed for matrix effect

correction but are often expensive or difficult to obtain [29]. The use of a coeluting structural analogue (confirmed to be absent in blank matrix samples) represents an interesting cost-effective alternative for correcting matrix effects as such analogues can mimic the physicochemical and chromatographic behaviours of isotope-labeled standards [29].

In this study, we present the optimization of a reliable and robust method to determine the concentration of GHRP-6 in skin, plasma, and polymeric MN matrix formulations. The analytical workflow involves pre-protein precipitation, ion exchange SPE, acid-alkaline hydrolysis, and UHPLC-MS/MS. We validated the use of hexarelin (for skin and MN matrices) and goserelin (for the plasma matrix) as internal standards. Validation criteria were successfully met for selectivity, accuracy, precision, LOD and LOQ, recovery, and stability. The validated method was successfully applied to evaluate the transdermal delivery of GHRP-6 using MN arrays composed of pharmaceutical-grade dissolving polymers in pig skin.

2. Materials and methods

2.1 Reagents and chemicals

Acetone (HPLC grade), acetonitrile (HPLC grade), methanol (HPLC grade), formic acid (Optima™ LC/MS Grade), sodium hydroxide 1N (NaOH), acetic acid, and hydrochloric acid (HCl) were purchased from Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA). Aqueous ammonia solution (NH₄OH, 5%) was prepared from Fisher ACS plus NH₄OH (35%). 1,5-octyl-β-d-glucopyranoside was obtained from Abcam (Cambridge, UK). Water was of ultrapure quality (Millipore, Bedford, MA). GHRP-6 was supplied by ProSpec Bio (Rehovot, Israel) with 99% purity. Poly(vinyl alcohol) (molecular weight = 10 000 Da) (PVA) and hexarelin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Goserelin and 0.9% sodium chloride irrigation, USP solution, were purchased respectively from Bachem (Torrance, CA) and Baxter (Mississauga, ON, Canada). Poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP) (molecular weight = 3 500–7 000 Da, Kollidon 12-K) (PVP K-12) was kindly provided by BASF (Ludwigshafen, Germany).

2.2 Specimen collection and sample preparation

Excised pig skin samples were kindly provided by the Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal (Dr. Alexandre Thibodeau) and stored at -20 °C until use. Blood was collected from each mouse via cardiac puncture into a 1.5 mL Eppendorf tubes containing 15% (w/v) dipotassium-ethylenediaminetetraacetic acid as anticoagulant from non-treated C57BL/6 male mice weighing 20-25 g (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) and stored at -20 °C.

Plasma

Aliquots (50 µL) of plasma were subjected to protein precipitation with 200 µL of cold acetone (-20 °C) followed by vortexing for 3 min and centrifugation at 13 000 g for 5 min. The resulting supernatants (~200 µL) were dried in a Speed Vac (Savant, Thermo Fisher, Waltham, MA) and stored at -20 °C. Each sample was reconstituted in 50 µL of acetonitrile-water (20:80, v/v) with 2% (v/v) formic acid, a second centrifugation was carried out (13 000 g, 5 min) and 20 µL of the supernatant were analyzed by UHPLC-MS/MS.

MN matrix

PVP/PVA MN patches with GHRP-6 loaded MN tips were fabricated using the micromolding technique and by adapting a solvent casting method. The procedure is detailed in supporting information (SI, Materials and Methods 1). The presence of GHRP-6 in the MN patch was assessed by dissolving a GHRP-6-loaded patch in 1 mL of 0.9% saline solution, after which 50 µL of the resulting solution was precipitated in acetonitrile at a ratio of 1:4 (v/v, aqueous to organic ratio), then diluted in 1:250 ratio in acetonitrile-water (20:80, v/v) with 2% (v/v) formic acid.

Pig skin

GHRP-6 was extracted from the skin by acid-alkaline hydrolysis followed by protein precipitation (SI, Materials and Methods 2). An SPE Strata X-CW microelution 2 mg/well (Phenomenex, Torrance, CA) 96-well plate was used for homogenate clean-up. Columns were conditioned twice with 200 µL methanol and twice with 200 µL ultrapure water. The eluent was then added to the well SPE block and allowed to pass through the column under gravity. The wells were washed twice with 200 µL of 5% NH₄OH and twice with 200 µL 20% acetonitrile in water. Analytes were

eluted twice with 100 μ L 2% formic acid in acetonitrile:methanol (60:40 v/v). The eluate was evaporated in a TurboVap LV. Dried samples were reconstituted in 500 μ L of acetonitrile-water (20:80, v/v) with 2 % (v/v) formic acid and submitted to UHPLC-MS/MS analysis.

2.3 Instrumentation

Analysis was performed using an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) system from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA). It consisted of an LC Accela system (HTC Thermopal Autosampler and Accela 1250 Quaternary Pump) coupled with a TSQ Quantiva™ Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). UHPLC/MS-MS method parameters are reported in Table S1.

The MS/MS system was operated with a heated electrospray ionization (HESI) source in positive ionization mode. Analyte detection was performed in selected reaction monitoring mode (SRM) with each transition of analyte and IS reported in Table S2. MS settings for each optimized compound are reported in Table S2 and obtained by infusing GHRP-6/ISTDs in acetonitrile/water (50:50, v/v). Data acquisition and peak integration were accomplished with Xcalibur software 3.0 (Thermo Fisher Scientific) and further data processing performed using GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

2.4 Method validation

Analytical validation was performed following the Food and Drug Administration (FDA) guidelines “Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation” [30]. Selectivity, accuracy, precision and extraction recovery were calculated using three daily replicates of quality control (QC) points on two working days in the different matrices. Linearity and sensitivity (LOD, LOQ) were calculated using calibration points (n=4). Calibration points and QC samples were prepared by two different analysts to evaluate reproducibility. Precision was calculated as the relative standard deviation (RSD) of the intra-day and inter-day replicates. Relative error (RE), a measure of bias, was expressed as $[(\text{mean observed concentration} - \text{spiked concentration})/(\text{spiked concentration})] \times 100$. According to FDA guidelines, bias and precision should be within $\pm 15\%$ and $<15\%$, respectively.

2.4.1 Quality control samples in plasma, MN polymer solution, and skin matrix.

QC samples in plasma, skin and MN matrices were prepared at three levels: 2.5 or 4.5 (skin only), 10 and 50 ng/mL for low, mid and high QC samples, respectively. The QC samples in plasma were prepared by adding aliquots of working standard solutions to the blank plasma. Goserelin was used as internal standard (ISTD) in plasma samples with a final concentration of 25 ng/mL.

The MN solution was prepared by dissolving blank MN patches (without GHRP-6) in water at a ratio of 1 MN patch/1 mL 0.9% saline solution, whereas for skin, blank matrix extracts were used to build corresponding QC samples. Hexarelin was added as ISTD in the MN and skin matrices at a final concentration of 25 ng/mL. All sample matrices were processed according to Section 2.2.

2.4.2 Recovery and matrix effect

Analytical recovery, precision, and accuracy were determined using the experimental design proposed by Matuszewski *et al.* [31]. Sample set 1 was composed of 3 replicates of neat samples of low, medium, and high preset QC concentrations. Set 2 was prepared with pooled blank matrix samples spiked with analyte and ISTDs after extraction. Set 3 was composed of 3 replicates of the same pooled matrix samples spiked with analyte and ISTDs before extraction for low, medium, and high QC concentrations. Recovery was calculated by dividing mean peak areas of ion ratios (GHRP-6/ISTD) of set 3 by set 2.

Neat solution calibration curves were prepared at six concentrations for GHRP-6 (0.3, 1, 5, 10, 25 and 60 ng/mL) as per the procedure detailed in SI (Materials and Methods 3). Matrix-matched calibration curves were prepared to evaluate matrix effects of plasma, MNs, and skin extract matrices at the same concentrations as for calibrators in neat solution (except for skin matrix at the final concentrations of 2.5, 3.5, 5, 10, 25 and 60 ng/mL for GHRP-6). Matrix effects were calculated by dividing the slope of regression of ion ratios in post-extracted matrix-matched calibration by the slope of regression of ion ratios added in neat solution.

2.4.3 Linearity of matrix-matched calibration curves

The linearity of calibration curves was evaluated in skin, plasma, and MN matrices (n=4). Each calibration curve consisted of blank and zero standard samples (n=6) and six calibration points for

MN solutions and plasma matrices from 0.3 ng/mL to 60.0 ng/mL, whereas 2.5 ng/mL to 60.0 ng/mL calibration points were used to create the calibration curve for skin matrix. A linear regression fitting was used, considering the analyte/ISTD peak area ratio versus the GHRP-6 nominal concentration to the ISTD and the goodness of fit of the regression was calculated with Pearson's determination coefficient R^2 . The accuracy for each standard point of the calibration curve should be between 85-115% and 80-120% at LOQ of the theoretical concentration for at least 75% of the standard points.

2.4.4 Limit of detection, limit of quantification and selectivity

LOD and LOQ were estimated using the error on the y-intercept and the slope of the linear regression method of calibration curves for neat, plasma and MN matrices, while for skin matrix, the blank determination was applied. LOD and LOQ were expressed as the analyte concentration corresponding to the sample blank value (without analyte) plus 3 times (LOD) or 10 times (LOQ) the standard deviation of the blank for 10 measurements [32, 33].

The selectivity of the method was evaluated by analysis of QC samples, calibration point replicates and four blank samples with ISTD. Interfering signals were monitored and compared to identify potential crosstalk phenomena and co-eluting impurities.

2.4.5 Stability

A first stability study was conducted over a period of 24 h in neat solution, plasma, and MN solution. GHRP-6 was tested at three QC concentration levels. The effect of temperature was studied at 4 °C and room temperature (RT).

A second long-term stability study was performed over 30 days. Investigated matrices included plasma, skin, MNs, and neat solutions. The samples were spiked at the same concentrations as the above-described study and evaluated at -20 °C.

2.4.6 Administration of GHRP6-loaded MNs to pig skin: *in vitro* GHRP-6 delivery profiling

The *in vitro* transdermal delivery of GHRP-6-loaded PVP/PVA MN arrays was investigated in dermatomed pig skin (350 μ m thickness) using a Franz diffusion cell (PermeGear Inc., Bethlehem, Pennsylvania) as previously reported [34, 35]. Briefly, the skin was clamped between the donor

and the receptor chamber and MN patches were inserted into pig skin by applying manual pressure for 1 min. The diffusion cell was filled with 5 mL phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4) and the receptor medium was stirred at 300 rpm. At 0.5, 1, 2, 4, 6 and 24 h post-insertion, 0.5 mL was withdrawn from the receptor chamber. PVP/PVA MN patches with nominal lengths of 500 and 800 μm were compared, and the amount of GHRP-6 permeated through the skin was quantified after insertion for 24 h. After the last receptor sample was collected, residual GHRP-6 into the skin was also extracted and quantified.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of sample preparation: plasma, skin and MNs

The sensitive and specific detection of GHRP-6 in different matrices (plasma, skin, and MNs) necessitates a suitable extraction method for improving extraction recovery and minimizing matrix effects.

In the present study, a previously described method using an acetone/plasma ratio of 4:1 was successfully used to limit residual soluble plasma components after protein precipitation [19]. The use of protein precipitation led to a 3-fold reduction of the variation in extraction recovery for plasma samples spiked at 50 ng/mL compared with samples that were processed only with SPE (SPE cartridge oasis WCX 2 mg) (**Figure S1**). Also, a 72% signal suppression was observed with the SPE extraction method, which was significant when compared to protein precipitation.

For the extraction of GHRP-6 from the MN polymer matrix samples, a protein precipitation method and dilution of interfering polymer substances were optimized. Lan *et al.* underlined the aggregation phenomenon of PVP in different volume ratios of water/acetone impacting its dispersibility and stabilization [36]. Hence, acetonitrile was selected for protein precipitation using cold acetone at a volume ratio of 1:4 to extract GHRP-6 from highly soluble PVP and PVA MN polymers in water. Subsequently, a dilution in water (1:250) was sufficient to reduce the matrix complexity and prevent UHPLC-column clogging.

The acid-alkaline hydrolysis method was used as pretreatment to release the peptide from pig skin by chemical degradation of the epidermis [37] prior to precipitation of proteins and SPE extraction. Through an initial basic hydrolysis with 1M NaOH, non-collagenous proteins were removed [37, 38]. Secondly, the pH was neutralized with an equimolar amount of 1M HCl to ensure the complete inactivation of hydrolysis. Collagen was then extracted and removed with 0.5 M acetic acid followed by precipitation with 0.9% NaCl_(aq) adapted from Wang *et al.* [39]. Afterwards, a cleanup step with acetone was needed before SPE extraction to remove interfering compounds before passing through the column. The lipid extraction method using lipid-lipid extraction (LLE) with methyl tert-butyl ether was attempted for extracting lipids from the skin and compared to SPE extraction [40]. SPE proved to be more efficient at removing interferences from the matrix as the GHRP-6 recovery level for pig skin spiked with 25 ng/mL led to an average recovery of 98.8% (RSD = 14.9%, n=3) while by LLE it was 223% (RSD = 49.7%, n=3) indicating ion enhancement. Matrix-induced response enhancement may be observed as more active sites are blocked in the injector, as influenced by matrix components, which prevents the combined adsorption and degradation reaction of the analyte [41]. The final procedure employed SPE by cation-exchange microelution columns (96-well SPE Plate, 2 mg/well) to release the analyte from possible binding to proteins, while removing fats, phospholipids, and desalting the samples. In particular, as GHRP-6 peptide bears a net charge of 2.1 at pH 7.0, a cation-exchange stationary phase was selected. A rinse solution of acetonitrile/water (20:80, v/v) provided the best results to elute undesired neutral compounds with low polarity and pH from the SPE columns. The first cleanup step with 5% NH₄OH, as recommended by Sue *et al* [42], served to remove undesired neutral, highly polar compounds. The elution solution composed of acetonitrile/methanol (60:40, v/v) resulted in a recovery process efficiency within the upper desirable range of 90-110% for low, medium, and high QC samples with minimal interferences (**Table 1**).

3.2. Optimization of UHPLC-MS/MS conditions

Full-scan mass spectra of GHRP-6 and the two ISTD, hexarelin and goserelin, were acquired to select appropriate product ions for detection (**Figure S2**). Goserelin, another small peptide-releasing hormone, was only used in plasma as ISTD because although GHRP-6 and hexarelin have similar physicochemical properties, hexarelin showed poor ionization reproducibility in plasma (data not shown). There could be many reasons of some variation in IS response during the

analytical run such as physicochemical differences between plasma and other matrices, but there is a clear need to compensate matrix effects and achieve acceptable method performance [43]. Doubly protonated ions $[M + 2H]^{2+}$ were identified at m/z 437.30 for GHRP-6 (**Figure S2. A**), m/z 444.30 for hexarelin (**Figure S2. B**), and m/z 635.42 for goserelin (**Figure S2. C**). Singly charged ions $[M + H]^+$ at m/z 873.40 for GHRP-6, m/z 887.42 for hexarelin, and m/z 1269.6 were also observed, though at a lower relative abundance than $[M+2H]^{2+}$. To interpret protonation sites and peptide fragmentation, the mobile proton model was followed [44]. GHRP-6 and hexarelin are peptides composed of 6 amino acids including two basic residues (histidine and lysine), which, as expected, were doubly protonated [45]. These doubly protonated forms derived from protonation either at the N-terminal amino group of histidine, or at the C-terminal lysinamide residue of each compound. Goserelin is a synthetic decapeptide analogue possessing two basic amino acids (histidine and arginine) and was also easily doubly protonated. Parameters that affect the intensity of fragment ions, such as collision energy, RF lens voltage, sheath gas, spray voltage, vaporizer temperature, and gas flow [46] were optimized, and the precursor and product ions with the highest signal response were chosen (**Table S2**). The doubly protonated species generated three abundant product ions in collision-induced dissociation (CID), but only the most intense fragment was followed.

In the product ion spectrum of GHRP-6, z-, b-, and c-series product ions were observed at m/z 129.14 (z_1), 248.23 (a_3), and 324.12 (b_2) (**Figure S2. A**), while for hexarelin (**Figure S2. B**) and goserelin (**Figure S2. C**) z-, c-, b-, and y-series product ions were observed at m/z 129.16 (z_1), 248.10 (a_3), 338.14 (b_2), and 249.04 (b_2), 329.13 (y_3), and 607.29 (c_5), respectively. The observed product ions resulted not only from the cleavage of peptide bonds, but also from the production of carbenium ions. All z-, b-, c-, and y-series-derived product ions are presented in **Table S2** for each compound.

Mass frontier spectral interpretation software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, CA) [47] was used to elucidate fragment structures (**Figure S2**). For confirmation, additional experiments were performed using a Q Exactive Orbitrap™ high-resolution mass spectrometer (PRM mode) to measure the accurate mass of MS/MS fragment ions. A single mass measurement error lower than 5 ppm was obtained for all the studied fragments.

Although multiple reaction monitoring (MRM) detection shortens run times, improvement of the chromatographic separation is required to avoid pitfalls associated with crosstalk of compounds with the same product ion (at m/z 129 and 248) but different precursor ions. As GHRP-6 and hexarelin have two product ions in common, a chromatographic method capable of clearly separating them was developed. Mobile phases were optimized to augment analyte sensitivity [48]. Multiple studies reported an improvement in sensitivity for peptide detection after addition of DMSO (1, 3 and 5% v/v), likely due to narrowed charge state distributions of ion signals and accelerated droplet fission [49, 50]. In this study, the addition of 1% DMSO to the mobile phase composition was evaluated to lower the quantification limits, leading to an actual GHRP-6 signal reduction of about 60% (**Figure S3**). This could be due to the low vapor pressure of DMSO enrichment in transitioning from droplets to gas phase ions, reducing the proton affinity of the peptide as proton acceptor [51], likely due to the higher proton affinity of DMSO compared to water and its high gas-phase basicity. Alternatively, DMSO was added between injections as a rinsing agent. The water and 50:50 v/v DMSO:water wash after a 1.7-fold upper limit of quantification (the highest calibrator) standard induced a visible reduction of column carryover effects (**Figure S4**). The final optimized gradient profile using water-acetonitrile mobile phases acidified with 0.1% formic acid showed the best separation of all tested compounds. Representative ion chromatograms of GHRP-6 and ISTDs fortified in matrices and neat solution are shown in **Figures 1 and S5, respectively**. GHRP-6, goserelin, and hexarelin presented suitable chromatographic peak shapes and intensity in all matrices. The retention time ratios for GHRP-6 in relation to hexarelin (ISTD) were respectively 0.996, 1.000, and 0.989 in neat solutions, MN matrices, and skin matrices; while the retention time ratio in relation to goserelin (ISTD) was 0.928 for both neat solution and plasma matrix. Therefore, all retention time ratios were within the tolerated window of the ratio of the neat solutions.

3.3. Method validation

The performance of the method for GRHP-6 quantification was evaluated in terms of selectivity, sensitivity, linearity, accuracy, precision, extraction recovery, and matrix effects. Absolute matrix effects can reflect either ion suppression or enhancement from plasma, skin, or from polymers in MNs. However, by using appropriate internal standard in each matrix, extraction losses and matrix

effects can be compensated for [52]. Structurally related compounds (hexarelin) or closely eluting compounds (goserelin) were used as ISTDs. The relative matrix effects in plasma and MN polymer solution were ~ 44 and 27%, respectively, compared with the solvent-based standard, indicating moderate ion enhancement, while lower matrix effects were reported for the skin matrix (<5%) (**Table 1**). To reduce or eliminate the effects of possible sample-induced matrix interference on analyte quantification, calibration curves were prepared using matrix-matched calibrants.

In the present study, the method showed selectivity, as no endogenous interferences were observed around the retention times of GHRP-6 and their corresponding ISTDs in each matrix. The MRM chromatograms of blank matrices (plasma, skin and MNs) and neat solution, as well as samples spiked in these matrices at concentration close to LOD are shown in **Figure 1 and Figure S5**. Selectivity was also determined with single blank (with ISTD) and double blank (without analyte and ISTD) showing respectively that neither crosstalk nor signal resulted from the sample matrix. GHRP-6 eluted at 2.70, 2.71, 2.70 and 2.72 min in neat solution, plasma, MN polymer solution, and skin matrices, respectively. Regarding ISTDs, hexarelin eluted at 2.71, 2.70, and 2.75 min in neat solution, MN polymer solution, and skin matrices respectively, while goserelin eluted at 2.91 and 2.92 min in neat solution and plasma, respectively. In addition, no crosstalk or carryover was noted in the studied GHRP-6 concentration between ISTD and the analyte, as two blank samples were injected after high standard samples. The mass spectrometric effect of crosstalk may be an issue in peptide analyses with mass transitions for identical product ions, and therefore must be addressed [53, 54]. Despite few publications focused on minimizing the risk of crosstalk affecting the accuracy of the analytical method, Vogeser *et al.* reported that changing the order of the monitored identical product ions for the selected compound and its ISTD with a compound with another mass transition aimed to prevent crosstalk effects in sirolimus analytes analysis [54]. For this purpose, SRM reactions of the GHRP6 transitions (437.209 → 129.129) and (437.209 → 324.040) were tested before hexarelin (444.361 → 129.097) and the time to clear ions from the collision cell between sample injections was augmented with an additional time of 1.10 min in each run.

The GHRP-6 calibration curves in neat solution and different matrices (plasma, MN polymer solution, and skin) showed suitable linearity over the tested range of 0.3-60 ng/mL for neat solution,

plasma, and MN polymer solution and 2.5-60 ng/mL in skin matrix with determination coefficients (R^2) > 0.99 from the regression analysis (**Table 1 and Figure S6**). The sensitivity of the method was evaluated by analyzing blank matrices and calibration samples spiked at 0.3 ng/mL, except for skin at 2.5 ng/mL, to determine LOQ and LOD with the calibration curves and a signal-noise ratio ≥ 10 and ≥ 3 , respectively. The LOD and LOQ were 0.1 and 0.3, and 0.9 and 2.3 ng/mL for neat solution and MN polymer solution, respectively; while in plasma and skin the LOD and LOQ were 1.1 and 3.4, and 1.5 and 4.5 ng/mL, respectively. The LOQ value in plasma was below the one previously described in the literature with sensitivities comparable to those previously reported from literature [20]. Accuracy and intra- and inter-day precision did not differ by more than 15% for all QC levels, which is considered acceptable according to the defined acceptance criteria of the U. S. Food and Drug Administration (FDA) (**Table 2**) [30].

The extraction efficiency was in all cases between 85 and 109% with intra-/inter- RSD (%) and RE (%) <15%, attributed to the fact that extraction losses and matrix effects can be well compensated with the use of an appropriate ISTD and a matrix-matched calibration.

3.4. Stability of GHRP-6 in plasma, MN and skin matrices

Stability assays of GHRP-6 were performed in different spiked matrices (skin, plasma and MN polymer solution) and neat solution, under different analysis hold times and temperatures: sitting at RT or 4 °C for 24 h; or stored at -20 °C for 1 month (**Table 3**). Short-term stability studies of GHRP-6 indicate that the analyte is stable in MNs and neat solution in all conditions, whereas in plasma and skin, GHRP-6 maintains its stability at -20 °C for 1 month, with recoveries in the range 88-115.0% and effective accuracy within $\pm 15\%$ of the target value. Furthermore, no significant difference was noted in the peak ratio of GHRP-6/ISTD signal responses of all stable solutions. However, GHRP-6 in plasma at RT and 4 °C was observed to be particularly unstable, as shown by both biased-high or biased-low values observed for all QCs. This could be explained by the co-elution of a large number of endogenous substances affecting chromatographic analyses and ionization of selected analyte [41].

A follow-up study was carried out to further investigate the degradation and instability of GHRP-6 in plasma. The concentration of GHRP-6 in pooled mice plasma decreased to $31 \pm 1\%$ after 8 h and up to 24 h for medium QC samples, as determined by the chromatographic peak area ratio of analyte/ISTD (**Figure S7**). Nevertheless, previous reports proposed an explanation for the protection of compounds derived from enkephalin such as GHRP-6 and hexarelin against peptidases and proteases based on the presence of D-amino acid moieties [20, 55, 56]. Guan *et al.* also reported the stability of GHRP-6 and hexarelin at 4 °C for 72 h and at RT for 24 h [57, 58]. This difference of GHRP-6 stability in plasma may be explained with the use of ammonium hydroxide — added to plasma prior sample treatment — which likely prevented degradation of the peptide by the denaturing plasma proteins [58]. On the basis of these stability studies, it can be concluded that the starting material should be stored at -20 °C and only be processed shortly before the actual analysis to ensure suitable signal stability of GHRP-6.

3.5. Quantification of GHRP-6 delivered using dissolving patches

The present methods were successfully applied to evaluate the *in vitro* transdermal delivery of GHRP-6 with PVA/PVP MNs inserted into pig skin using a Franz diffusion cell. GHRP-6-loaded PVA/PVP MN patches with initial lengths of $653 \pm 14\ \mu\text{m}$ and $426 \pm 23\ \mu\text{m}$ (initial nominal lengths of 800 and 500 μm , respectively) were compared, and GHRP-6 was detected and quantified up to 24 h post-administration (**Figure 2, A-C**). The GHRP-6 release profiles of MNs with a nominal initial length of 800 and 500 μm (initial dose encapsulated of $191 \pm 67\ \mu\text{g}$ and $109 \pm 27\ \mu\text{g}$, respectively) were significantly different after 6h. While the 500 μm patch had only released $28 \pm 7\%$ of GHRP-6 after 6h, the 800 μm patch had already released $53 \pm 11\%$ of its total GHRP-6 content ($p < 0.001$). At 24h post-application, longer MN patches showed a 1.4-fold increase in cumulative amount of GHRP-6 permeated through the skin ($62 \pm 6\%$), compared to the shorter patches ($46 \pm 9\%$) (**Figure 2 D**). The residual amount of GHRP-6 remaining in the skin for 800 μm MN patches ($37 \pm 5\%$) was 1.5-fold lower than 500 μm MN patches ($55 \pm 10\%$). Therefore, MN length influences the transdermal diffusion of GHRP-6, and a higher length of 800 μm displayed strong potential for enabling a more effective GHRP-6-based drug delivery. In addition, this study reinforces the hypothesis that MNs can enhance the transdermal delivery of hydrophilic peptides while representing an effective strategy in medicine [23]. These results demonstrate the

applicability and validity of the developed analytical methods to future transdermal drug delivery studies.

4. CONCLUSION

A reliable, specific, sensitive UHPLC-MS/MS method was developed and validated for detection and quantification of GHRP-6, for the first time in an extended list of complex matrices (MNs, skin and plasma). Optimization of chromatography, selection of specific MS/MS product ions, use of ISTDs, and matrix-matched calibration altogether yielded suitable analytical method performance. The stability of GHRP-6 and ISTDs was assayed in all matrices at room temperature and/or -20°C . The developed methods were successfully implemented for the analysis of skin and MN samples after transdermal GHRP-6 delivery with the use of MN patches in pig skin. These methods will provide a useful tool for assessing *in vitro* and *in vivo* screening tests in the development of transdermal drug formulation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

This work was supported by the TransMedTech Institute (NanoBio Technology Platform) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund. DB acknowledges financial support from the Canadian Generic Pharmaceutical Association and Biosimilars Canada, the Fond de Recherche du Québec Santé et Nature et Technologies, and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. XB is thankful to the Canada Research Chair program for financial support. We also thank Sam Babity for proofreading the article. The graphical abstract was created using Biorender.com.

Credit author statement

Cloé L. Esposito: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing – original draft, and Writing – review & editing. Araceli Garcia Ac: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing – review & editing. Elise Laszlo: Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing. Sung Vo Duy: Methodology, Validation, Investigation, Writing – review & editing. Catherine Michaud: Investigation. Sébastien Sauvé; : Resources, Writing – review & editing. Huy Ong: Supervision, Resources, Writing – review & editing. Sylvie Marleau: Conceptualization, Supervision, Resources, Writing – review & editing, Funding acquisition. Xavier Banquy: Resources, Writing –review & editing, Funding acquisition. Davide Brambilla: Conceptualization, Project administration, Resources, Writing – review & editing, Supervision, Funding acquisition.

References

- [1] J. Berlanga-Acosta, A. Abreu-Cruz, D.G.-D.B. Herrera, Y. Mendoza-Marí, A. Rodríguez-Ulloa, A. García-Ojalvo, V. Falcón-Cama, F. Hernández-Bernal, Q. Beichen, G. Guillén-Nieto, Synthetic Growth Hormone-Releasing Peptides (GHRPs): A Historical Appraisal of the Evidences Supporting Their Cytoprotective Effects, *Clin Med Insights Cardiol* 11 (2017) 1179546817694558, <https://doi.org/10.1177/1179546817694558>.
- [2] M. Granado, C. Garcia-Caceres, L.M. Frago, J. Argente, J.A. Chowen, The positive effects of growth hormone-releasing peptide-6 on weight gain and fat mass accrual depend on the insulin/glucose status, *Endocrinology* 151(5) (2010) 2008-18, <https://doi.org/10.1210/en.2009-1394>.
- [3] A. Delgado-Rubín de Célix, J.A. Chowen, J. Argente, L.M. Frago, Growth hormone releasing peptide-6 acts as a survival factor in glutamate-induced excitotoxicity, *Journal of Neurochemistry* 99(3) (2006) 839-849, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04122.x>.
- [4] B.B. Bercu, R.F. Walker, *Growth Hormone Secretagogues in Clinical Practice*, Taylor & Francis, 1998.
- [5] J. Bellone, L. Ghizzoni, G. Aimaretti, C. Volta, M.F. Boghen, S. Bernasconi, E. Ghigo, Growth hormone-releasing effect of oral growth hormone-releasing peptide 6 (GHRP-6) administration in children with short stature, *Eur J Endocrinol* 133(4) (1995) 425-9, <https://doi.org/10.1530/eje.0.1330425>.
- [6] A. Bonen, S.E. Campbell, C.R. Benton, A. Chabowski, S.L. Coort, X.X. Han, D.P. Koonen, J.F. Glatz, J.J. Luiken, Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36, *The Proceedings of the Nutrition Society* 63(2) (2004) 245-9, <https://doi.org/10.1079/PNS2004331>.
- [7] A. Demers, N. McNicoll, M. Febbraio, M. Servant, S. Marleau, R. Silverstein, H. Ong, Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study, *Biochem J* 382(Pt 2) (2004) 417-24, <https://doi.org/10.1042/BJ20040036>.
- [8] A.F. Soares, A. Carvalho Rde, F. Veiga, Oral administration of peptides and proteins: nanoparticles and cyclodextrins as biocompatible delivery systems, *Nanomedicine (Lond)* 2(2) (2007) 183-202, <https://doi.org/10.2217/17435889.2.2.183>.

- [9] J.T. Sigalos, A.W. Pastuszak, The Safety and Efficacy of Growth Hormone Secretagogues, *Sex Med Rev* 6(1) (2018) 45-53, <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2017.02.004>.
- [10] M. Kirkby, A.R.J. Hutton, R.F. Donnelly, Microneedle Mediated Transdermal Delivery of Protein, Peptide and Antibody Based Therapeutics: Current Status and Future Considerations, *Pharmaceutical research* 37(6) (2020) 117-117, <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02844-6>.
- [11] H. Min, B. Han, C. Sung, J.-H. Park, K. Lee, H. Kim, K. Kim, J. Son, O.-S. Kwon, J. Lee, LC-MS/MS Method for Simultaneous Analysis of Growth Hormone-Releasing Peptides and Secretagogues in Human Urine, *Mass Spectrometry Letters* 7 (2016) 55-63, <https://doi.org/10.5478/MSL.2016.7.3.55>.
- [12] A. Thomas, S. Höppner, H. Geyer, W. Schänzer, M. Petrou, D. Kwiatkowska, A. Pokrywka, M. Thevis, Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry* 401(2) (2011) 507-16, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4702-3>.
- [13] M. Timms, N. Hall, V. Levina, J. Vine, R. Steel, A high-throughput LC-MS/MS screen for GHRP in equine and human urine, featuring peptide derivatization for improved chromatography, *Drug testing and analysis* 6(10) (2014) 985-95, <https://doi.org/10.1002/dta.1624>.
- [14] H. Cox, C. Hughes, D. Eichner, Detection of GHRP-2 and GHRP-6 in urine samples from athletes, *Drug testing and analysis* 7 (2015), <https://dx.doi.org/10.1002/dta.1791>.
- [15] P. Judák, J. Grainger, C. Goebel, P. Van Eenoo, K. Deventer, DMSO Assisted Electrospray Ionization for the Detection of Small Peptide Hormones in Urine by Dilute-and-Shoot-Liquid-Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 28(8) (2017) 1657-1665, <https://doi.org/10.1021/jasms.8b05616>.
- [16] T. Lange, A. Thomas, K. Walpurgis, M. Thevis, Fully automated dried blood spot sample preparation enables the detection of lower molecular mass peptide and non-peptide doping agents by means of LC-HRMS, *Analytical and bioanalytical chemistry* 412(15) (2020) 3765-3777, <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02634-4>.
- [17] M. Mazzarino, V. Calvaresi, X. de la Torre, G. Parrotta, C. Sebastianelli, F. Botrè, Development and validation of a liquid chromatography–mass spectrometry procedure after

- solid-phase extraction for detection of 19 doping peptides in human urine, *Forensic Toxicology* 33(2) (2015) 321-337, <https://doi.org/10.1007/s11419-015-0279-4>.
- [18] J. Tate, G. Ward, Interferences in immunoassay, *Clin Biochem Rev* 25(2) (2004) 105-120.
- [19] S. Trobbiani, P. Stockham, T. Scott, Increasing the linear dynamic range in LC-MS: is it valid to use a less abundant isotopologue?, *Drug testing and analysis* 9(10) (2017) 1630-1636, <https://doi.org/10.1002/dta.2175>.
- [20] J. Gil Valdes, A. Cabrales, O. Reyes, V. Morera, L. Betancourt, A. Sánchez, G. García, G. Moya, G. Padron, V. Besada, L. González, Development and validation of a bioanalytical LC-MS method for the quantification of GHRP-6 in human plasma, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 60 (2011) 19-25, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.11.007>.
- [21] Y. Bian, R. Zheng, F.P. Bayer, C. Wong, Y.-C. Chang, C. Meng, D.P. Zolg, M. Reinecke, J. Zecha, S. Wiechmann, S. Heinzlmeir, J. Scherr, B. Hemmer, M. Baynham, A.-C. Gingras, O. Boychenko, B. Kuster, Robust, reproducible and quantitative analysis of thousands of proteomes by micro-flow LC-MS/MS, *Nature communications* 11(1) (2020) 157-157, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13973-x>.
- [22] C. Dillon, H. Hughes, N. O'Reilly, C. Allender, D. Barrow, P. McLoughlin, Dissolving Microneedle Based Transdermal Delivery of Therapeutic Peptide Analogues, *International Journal of Pharmaceutics* 565 (2019), <https://doi.org/doi:10.1016/j.ijpharm.2019.04.075>.
- [23] S. Zhang, Y. Qiu, Y. Gao, Enhanced delivery of hydrophilic peptides *in vitro* by transdermal microneedle pretreatment, *Acta Pharm Sin B* 4(1) (2014) 100-104, <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.011>.
- [24] K. Fukushima, A. Ise, H. Morita, R. Hasegawa, Y. Ito, N. Sugioka, K. Takada, Two-Layered Dissolving Microneedles for Percutaneous Delivery of Peptide/Protein Drugs in Rats, *Pharmaceutical research* 28(1) (2011) 7-21, <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0097-7>.
- [25] B. Godin, E. Touitou, Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(11) (2007) 1152-1161, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.07.004>.
- [26] X.S. Tong, J. Wang, S. Zheng, J.V. Pivnichny, P.R. Griffin, X. Shen, M. Donnelly, K. Vakerich, C. Nunes, J. Fenyk-Melody, Effect of Signal Interference from Dosing Excipients on Pharmacokinetic Screening of Drug Candidates by Liquid Chromatography/Mass

Spectrometry, Analytical Chemistry 74(24) (2002) 6305-6313, <https://doi.org/10.1021/ac025988p>

- [27] V. Veeravalli, H.S. Cheruvu, P. Srivastava, L.M. Vamsi Madgula, Three-dimensional aspects of formulation excipients in drug discovery: a critical assessment on orphan excipients, matrix effects and drug interactions, *Journal of Pharmaceutical Analysis* 10(6) (2020) 522-531, <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.007>
- [28] M. Gergov, T. Nenonen, I. Ojanperä, R.A. Ketola, Compensation of Matrix Effects in a Standard Addition Method for Metformin in Postmortem Blood Using Liquid Chromatography–Electrospray–Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Toxicology* 39(5) (2015) 359-364, <https://doi.org/10.1093/jat/bkv020>.
- [29] G. Shi, Application of co-eluting structural analog internal standards for expanded linear dynamic range in liquid chromatography/electrospray mass spectrometry, *Rapid communications in mass spectrometry* : RCM 17(3) (2003) 202-6, <https://doi.org/10.1002/rcm.897>.
- [30] Food and Drug Agency (FDA). U.S. Department of Health and Human Services Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2018, <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
- [31] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS, *Analytical Chemistry* 75(13) (2003) 3019-3030, <https://doi.org/10.1021/ac020361s>.
- [32] Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing, and Controls, *Federal Register (Notices)* 65 (2000) 776-777.
- [33] A. Shrivastava, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists* 2 (2011) 21-25, <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
- [34] R.F. Donnelly, T.R.R. Singh, M.J. Garland, K. Migalska, R. Majithiya, C.M. McCrudden, P.L. Kole, T.M.T. Mahmood, H.O. McCarthy, A.D. Woolfson, Hydrogel-Forming Microneedle Arrays for Enhanced Transdermal Drug Delivery, *Advanced Functional Materials* 22(23) (2012) 4879-4890, <https://doi.org/10.1002/adfm.201200864>.

- [35] S.F. Lahiji, M. Dangol, H. Jung, A patchless dissolving microneedle delivery system enabling rapid and efficient transdermal drug delivery, *Scientific reports* 5 (2015) 7914-7914., <https://doi.org/110.1038/srep07914>.
- [36] W.J. Lan, S.H. Yu, H.S. Qian, Y. Wan, Dispersibility, stabilization, and chemical stability of ultrathin tellurium nanowires in acetone: morphology change, crystallization, and transformation into TeO₂ in different solvents, *Langmuir* 23(6) (2007) 3409-17, <https://doi.org/10.1021/la063272+>.
- [37] R. Abuine, A. Rathnayake, H.-G. Byun, Biological activity of peptides purified from fish skin hydrolysates, *Fisheries and Aquatic Science* 22 (2019), <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0125-4>.
- [38] W. Wu, B. Li, H. Hou, H. Zhang, X. Zhao, Isolation and identification of calcium-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and their binding properties with calcium, *Food & function* 8(12) (2017) 4441-4448, <https://doi.org/10.1039/c7fo01014a>.
- [39] L. Wang, X. An, F. Yang, Z. Xin, L. Zhao, Q. Hu, Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*), *Food Chemistry* 108(2) (2008) 616-623, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.017>.
- [40] A. Sündermann, L.F. Eggers, D. Schwudke, Liquid Extraction: Bligh and Dyer, in: M.R. Wenk (Ed.), *Encyclopedia of Lipidomics*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2016, pp. 1-4, https://doi.org/10.1007/978-94-007-7864-1_88-1.
- [41] P. Panuwet, R.E. Hunter, Jr., P.E. D'Souza, X. Chen, S.A. Radford, J.R. Cohen, M.E. Marder, K. Kartavenka, P.B. Ryan, D.B. Barr, Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring, *Crit Rev Anal Chem* 46(2) (2016) 93-105, <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.980775>.
- [42] C. Su, H. Sun, H. Yang, L. Yin, J. Zhang, J.P. Fawcett, J. Gu, A validated UPLC-MS/MS method coupled with protein precipitation and ion exchange solid phase extraction for the quantitation of porcine relaxin B29 in dog plasma and its application to a pharmacokinetic study, *Analytical and bioanalytical chemistry* 409(28) (2017) 6559-6565, <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0604-3>.
- [43] N.C. van de Merbel, R.A. Koster, C. Ohnmacht, Very complex internal standard response variation in LC-MS/MS bioanalysis: root cause analysis and impact assessment, *Bioanalysis* 11(18) (2019) 1693-1700, <https://doi.org/10.4155/bio-2019-0122..>

- [44] V.H. Wysocki, G. Tsapralis, L.L. Smith, L.A. Breci, Mobile and localized protons: a framework for understanding peptide dissociation, *Journal of mass spectrometry* : JMS 35(12) (2000) 1399-406, [https://doi.org/10.1002/1096-9888\(200012\)35:12<1399::AID-JMS86>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1096-9888(200012)35:12<1399::AID-JMS86>3.0.CO;2-R).
- [45] R. Boyd, A. Somogyi, The mobile proton hypothesis in fragmentation of protonated peptides: a perspective, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 21(8) (2010) 1275-8, <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2010.04.017>.
- [46] S. Banerjee, S. Mazumdar, Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte, *International Journal of Analytical Chemistry* 2012 (2012) 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- [47] J. Zhou, R.J.M. Weber, J.W. Allwood, R. Mistrik, Z. Zhu, Z. Ji, S. Chen, W.B. Dunn, S. He, M.R. Viant, HAMMER: automated operation of mass frontier to construct in silico mass spectral fragmentation libraries, *Bioinformatics* 30(4) (2014) 581-583, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt711>.
- [48] R. Rebane, A. Kruve, J. Liigand, P. Liigand, A. Gornischeff, I. Leito, Ionization efficiency ladders as tools for choosing ionization mode and solvent in liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 33(23) (2019) 1834-1843, <https://doi.org/10.1002/rcm.8545>
- [49] H. Hahne, F. Pachl, B. Ruprecht, S. Maier, S. Klaeger, D. Helm, G. Médard, M. Wilm, S. Lemeer, B. Kuster, DMSO enhances electrospray response, boosting sensitivity of proteomic experiments, *Nature methods* 10 (2013), <https://doi.org/10.1038/nmeth.2610>.
- [50] M. Nshanian, R. Lakshmanan, H. Chen, R.R. Ogorzalek Loo, J.A. Loo, Enhancing Sensitivity of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of Peptides and Proteins Using Supercharging Agents, *Int J Mass Spectrom* 427 (2018) 157-164, <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2017.12.006>.
- [51] A. Tjernberg, N. Markova, W.J. Griffiths, D. Hallén, DMSO-related effects in protein characterization, *Journal of biomolecular screening* 11(2) (2006) 131-7, <https://doi.org/10.1177/1087057105284218>.
- [52] W. Zhou, S. Yang, P.G. Wang, Matrix effects and application of matrix effect factor, *Bioanalysis* 9(23) (2017) 1839-1844, <https://doi.org/10.4155/bio-2017-0214>.

- [53] L.-P. Morin, J.-N. Mess, M. Furtado, F. Garofolo, Reliable procedures to evaluate and repair crosstalk for bioanalytical MS/MS assays, *Bioanalysis* 3 (2011) 275-83, <https://doi.org/10.4155/bio.10.203>.
- [54] M. Vogeser, C. Seger, Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory, *Clinical chemistry* 56(8) (2010) 1234-44, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.138602>.
- [55] A. Knoop, A. Thomas, E. Fichant, P. Delahaut, W. Schänzer, M. Thevis, Qualitative identification of growth hormone-releasing hormones in human plasma by means of immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS, *Analytical and bioanalytical chemistry* 408(12) (2016) 3145-3153, <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9377-3>.
- [56] M. Popławska, A. Błażewicz, Identification of a novel growth hormone releasing peptide (a glycine analogue of GHRP-2) in a seized injection vial, *Drug testing and analysis* 11(1) (2019) 162-167, <https://doi.org/10.1002/dta.2467>.
- [57] F. Guan, S. Fay, X. Li, Y. You, M.A. Robinson, Identification of *ex vivo* catabolites of peptides with doping potential in equine plasma by HILIC-HRMS, *Drug testing and analysis* 12(6) (2020) 771-784, <https://doi.org/10.1002/dta.2781>.
- [58] F. Guan, Y. You, X. Li, M.A. Robinson, A comprehensive approach to detecting multitudinous bioactive peptides in equine plasma and urine using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry, *Drug testing and analysis* 11(9) (2019) 1308-1325, <https://doi.org/10.1002/dta.2671>.

Legends to figures

Figure. 1. LC-MS/MS chromatograms of GHRP-6 and its internal standards for samples A) without analyte and ISTD (blank), and B) samples spiked with the analyte (concentration close to LOD), GHRP-6 (above panels) and corresponding ISTD (below panels, at 25 ppb), in MN, plasma and skin matrices.

Figure. 2. (A) Representative fluorescence microscopy images of MNs encapsulating Cy5 labeled GHRP-6 and Cy5 probe delivered into the skin (bottom right panel). LC-MS/MS chromatogram (B) and MS/MS spectrum (C) of GHRP-6 delivered by dissolving microneedles (MNs) after 24 h, with a nominal initial length of 800 μm , to pig skin *ex vivo*. (D) Comparison of cumulative GHRP-6 release profiles from MNs with a nominal initial length of 800 and 500 μm obtained with the Franz cell diffusion ($n = 3 \pm \text{SD}$).

Table 1. Performance of the LC-MS/MS method for the GHRP-6 in different matrices: linearity (coefficients of determination, R^2), protein precipitation extraction (PPE) / solid phase extraction (SPE) recoveries, matrix effects, Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ).

Matrix	ISTD	R^2	Matrix effect (%)	Qc samples nominal concentration (ng/mL) \pm SD			Linear range (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
				Low QC	Medium QC	High QC			
Neat	Hexarelin	0.992	N/A	2.3 \pm 0.2	9.7 \pm 0.4	44 \pm 4	0.3-60	0.1	0.3
	Goserelin	0.9905	N/A	2.6 \pm 0.4	11 \pm 1.0	46 \pm 3	0.3-60	0.1	0.3
Recovery (%) \pm SD									
Plasma	Goserelin	0.9958	143.5	88 \pm 6	93 \pm 5	103 \pm 11	0.3-60	1.1	3.4
MNs	Hexarelin	0.9964	127.1	99 \pm 6	85 \pm 4	86 \pm 7	0.3-60	0.9	2.3
Skin	Hexarelin	0.9931	103.3	99 \pm 13	109 \pm 3	108 \pm 10	2.5-60	1.5	4.5

Table 2. Precision (relative standard deviation, RSD) and bias (relative error, RE) for the quantitation of GHRP-6 in different matrices.

Matrix	ISTD	Accuracy / bias (RE %)			Intra-day precision (RSD %)			Inter-day precision (RSD %)		
		Low QC	Medium QC	High QC	Low QC	Medium QC	High QC	Low QC	Medium QC	High QC
Neat solution	Hexarelin	3.2	4.0	11.4	7.0	4.0	8.4	3.1	3.9	0.4
	Goserelin	10.1	9.6	8.7	13.9	9.7	6.5	7.6	7.2	5.4
Plasma	Goserelin	12.0	7.2	9.6	6.2	5.6	10.8	14.5	13.7	10.8
MNs	Hexarelin	4.9	14.7	14.5	5.9	4.1	7.7	3.6	3.6	2.4
Skin	Hexarelin	9.9	9.3	9.5	13.5	3.0	8.8	12.3	7.4	13.7

Table 3. Stability of GHRP-6 in plasma, skin and prepared samples under different storage conditions.

Matrix	RT for 24 h			Stored at 4 °C for 24 h			Stored at -20 °C for 30 days			
	Recovery (%) ± SD	Precision (RSD %)	Accuracy / bias (RE %)	Recovery (%) ± SD	Precision (RSD %)	Accuracy (RE %)	Recovery (%) ± SD	Precision (RSD %)	Accuracy / bias (RE %)	
MNs	Low QC	106 ± 11	9.9	10.2	112 ± 5	4.1	12.1	88 ± 1	1.3	11.8
	Medium QC	97 ± 8	8.2	6.7	97 ± 7	6.8	4.7	94 ± 13	13.6	11.0
	High QC	100 ± 2	2.2	1.5	103 ± 1	1.4	2.9	101 ± 6	6.1	4.5
Neat	Low QC	103 ± 10	10.1	7.5	102 ± 5	5.2	4.6	95 ± 12	12.1	7.3
	Medium QC	110 ± 10	9.0	9.8	114 ± 6	5.3	14.4	115 ± 2	1.7	15.0
	High QC	108 ± 4	3.5	8.3	109 ± 1	1.3	9.3	92 ± 13	10.2	12.0
Plasma	Low QC	257 ± 26	10.2	156.7	125 ± 77	61.7	50.8	107 ± 4	3.8	7.2
	Medium QC	174 ± 19	10.7	73.6	69 ± 13	18.4	30.6	88 ± 10	11.9	12.2
	High QC	56 ± 3	4.9	43.9	11 ± 7	61.7	59.8	89 ± 2	2.6	11.0
Skin	Low QC							106 ± 13	12.8	11.5
	Medium QC							94 ± 7	7.4	7.3
	High QC							113 ± 9	7.8	13.2

Graphical abstract

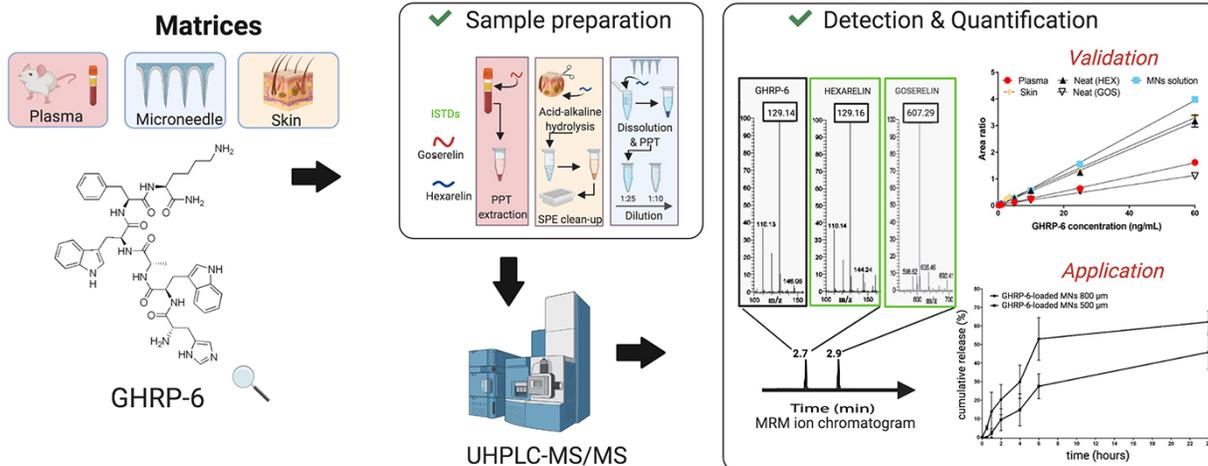


Figure 1.

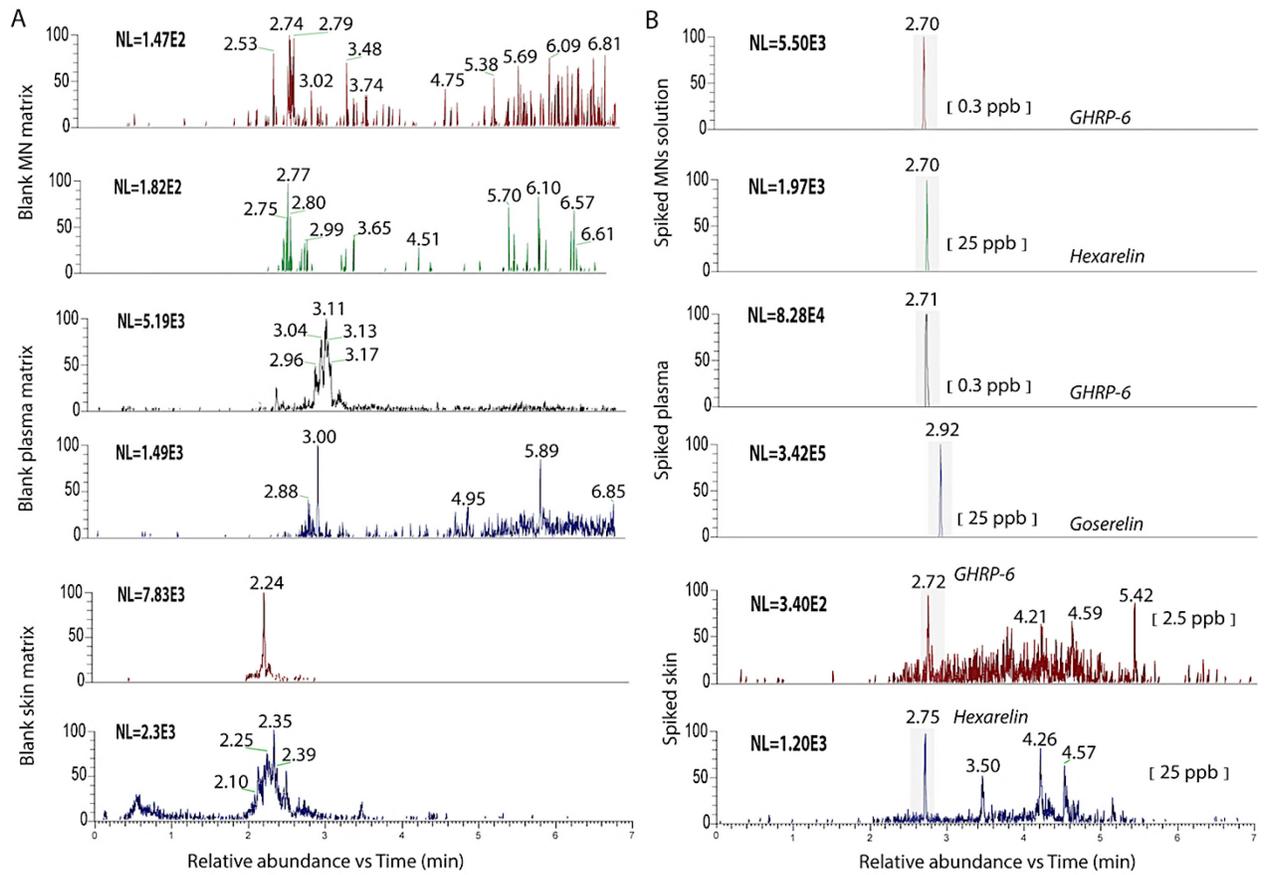
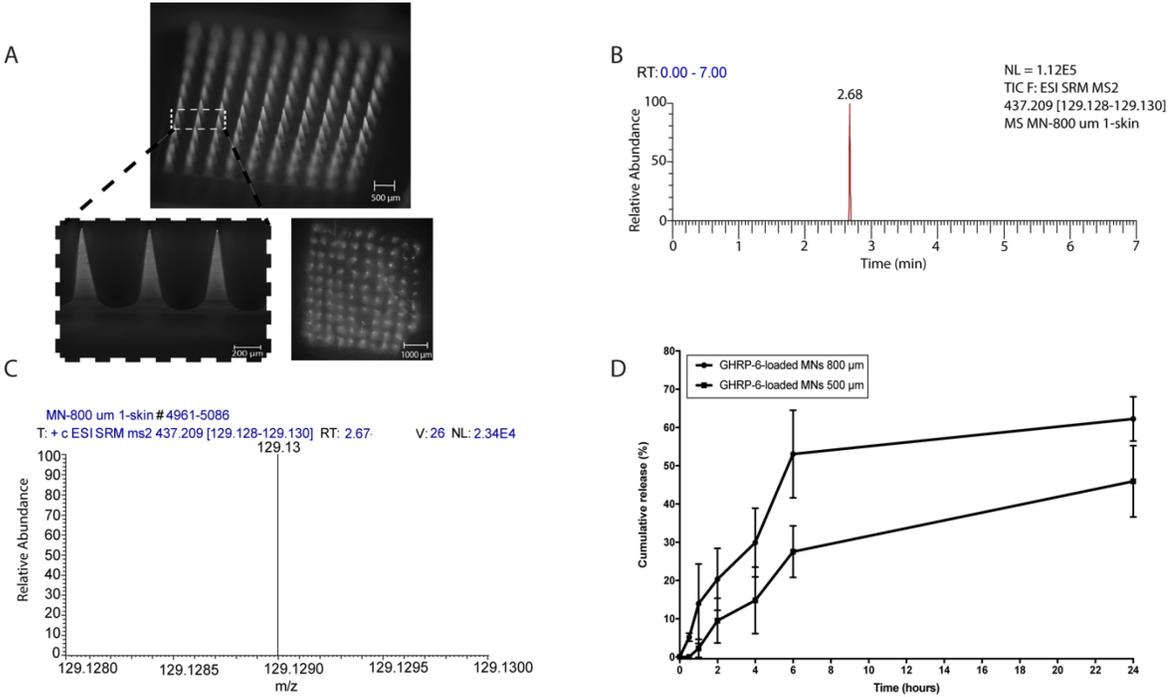


Figure 2.



Supplemental materials and methods

1. Preparation of GHRP-6-loaded MNs

For plain polymer matrix solution, PVA (1.8 g) and PVP (1.8 g) were dissolved (75 °C, 40 min) in 4.5 mL of water. For GHRP-6-loaded polymer matrix solution, used for the MN tips, GHRP-6 (2.5 mg) was added to 40 μ L of plain polymer solution, and centrifuged (4700 g, 5 min, 21°C). This solution was cast into the mold using a vacuum (−100 kPa) for 1-2 min to pull the solution into the MN tip cavities. A spatula and ethanol-soaked cotton swab were used to remove excess polymer remaining in the MN molds surface. Then, 100 μ L of the polymer matrix solution were added twice under vacuum to completely fill the tip cavities. The final backing layer was formed by adding plain polymer matrix solution into the molds. The MNs were dried for 2 days at 25 °C and at 60% relative humidity (Forma Environmental Chamber, ThermoFisher, Waltham, CA) and subsequently for one more day at room temperature (RT).

2. Pretreatment of skin sample

Skin tissue was cut into one piece of approximately 4.1 mm \times 4.6 mm (surface of the MN patch), then into 10 small pieces and pre-treated with 1 M NaOH (0.5 mL) for 30 min at RT to remove noncollagenous proteins and then with 1 M HCl (0.5 mL) to obtain the swollen skins. A homogenizer (TissueLyserII, Qiagen, Inc, Germantown, MD) was used to homogenize the tissues for 4 min (2 \times 2 min cycles). The collagen in skin was extracted with 0.5 M acetic acid at a sample/solution ratio of 1:100 (w/v) overnight with continuous stirring. The extracts were separated and centrifuged at 20,000 g for 0.5 h at 4°C. The supernatant was then precipitated by the addition of NaCl_(aq) (0.01 g/mL) and centrifuged at 20,000 g for 0.5 h. The supernatant was dried with a TurboVap LV (Biotage, Hengoed, UK) until supernatant volume reached

approximately 200 μL . The samples were then subjected to protein precipitation (twice), at a ratio of 1:3 (v/v, aqueous to organic ratio). The tubes were mixed by vortexing for 2 min and then centrifuged at 13,386 g for 5 min. The resulting supernatants ($\sim 750 \mu\text{L}$) were dried and each sample was finally reconstituted with 200 μL of acetonitrile-water (20:80, v/v) with 2 % (v/v) formic acid for SPE extraction.

3. Preparation of GHRP-6 and ISTDs standard solutions

Stock solutions of GHRP-6 and two internal standards, hexarelin and goserelin, were prepared at 1 mg/mL, 887 $\mu\text{g/mL}$ and 10 mg/mL, respectively, in acetonitrile-water (20:80, v/v) with 0.5 % (w/v) of 1,5-octyl- β -d-glucopyranoside and 2 % (v/v) formic acid, to prevent adsorption problems.

To obtain a calibration curve and quality control (QC) samples in neat solution, working standard solutions of GHRP-6 with a concentration of 100 ng/mL and 125 ng/mL for each ISTD (hexarelin and goserelin) were prepared in acetonitrile-water (20:80, v/v) with 2 % (v/v) formic acid. These solutions were then used to generate a six-point matrix-free calibration curve ranging from 0.3 to 60 ng/mL and a final ISTDs concentration of 25 ng/mL. QCs were investigated at concentrations of 2.5 (low), 10 (medium) and 50 ng/mL (high). Each calibration curve included a zero standard (blank neat solution or matrix with ISTD only) and a blank sample (processed negative control neat solution or matrix sample).

Supplemental tables

Table S1. UHPLC and MS-MS parameters used for neat and different matrices (plasma, skin and MNs) analysis of GHRP-6 and its ISTDs.

UPLC conditions		MS/MS parameters			
Column	Hypersil GOLD™ C18 selectivity UPLC column, 1.9 μm particle size, 2.1 mm I.D., 50 mm length.	Capillary voltage (kV)	3.6		
Mobile phase A	Water with 0.1 % formic acid	Sheath gas flow rate (arbitrary units)	<i>GHRP-6</i>	60	
			<i>Hexarelin</i>	35	
			<i>Goserelin</i>	45	
Mobile phase B	Acetonitrile with 0.1 % formic acid	Auxiliary gas flow rate (arbitrary units)	<i>GHRP-6</i>	20	
			<i>Hexarelin</i>	15	
			<i>Goserelin</i>	19	
Flow rate (mL/min)	0.5	Sweep gas (arbitrary units)	0		
Injection volume (μL)	20	Capillary temperature (°C)	350		
Autosampler temperature (°C)	10	Vaporizer temperature (°C)	400		
Oven temperature (°C)	45	CID gas (mTorr)	1.5		
Run time (min)	8	Time (mm:ss)	Flow (mL/min)	Solvent A%	Solvent B%
		00:01		95	5
		01:01		95	5
		05:01		5	95
		07:01		100	0
		08:11		95	5

Table S2. Amino acid sequence and multiple reaction monitoring conditions for positive mode electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of GHRP-6 and ISTDs peptides. The major ions (ie. doubly charged ions and their corresponding product ions) investigated are in bold.

Compound	Monoisotopic mass (Da)	Amino acid sequence	Tube Lens (V)	Precursor (m/z)	Ion product (m/z)	Optimized ion product (m/z)	Collision energy (V)
GHRP-6	872.44	His-(D-Trp)-Ala-Trp-(D-Phe)-Lys-NH ₂	68	437.209	129.129	129.10263	19
					324.040	324.14594	24
					248.040	248.11467	29
					129.097	129.10229	20
Hexarelin	886.46	His-(D-2-methyl-Trp)-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	69	444.361	248.129	248.11401	28
					338.040	338.16049	22
					607.476	607.29791	15
Goserelin	1268.6	pyroGlu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Lys-Leu-Arg-Pro-AzaGly-NH ₂	84	635.430	249.040	249.09872	29
					329.079	329.20502	18

Supplemental figures

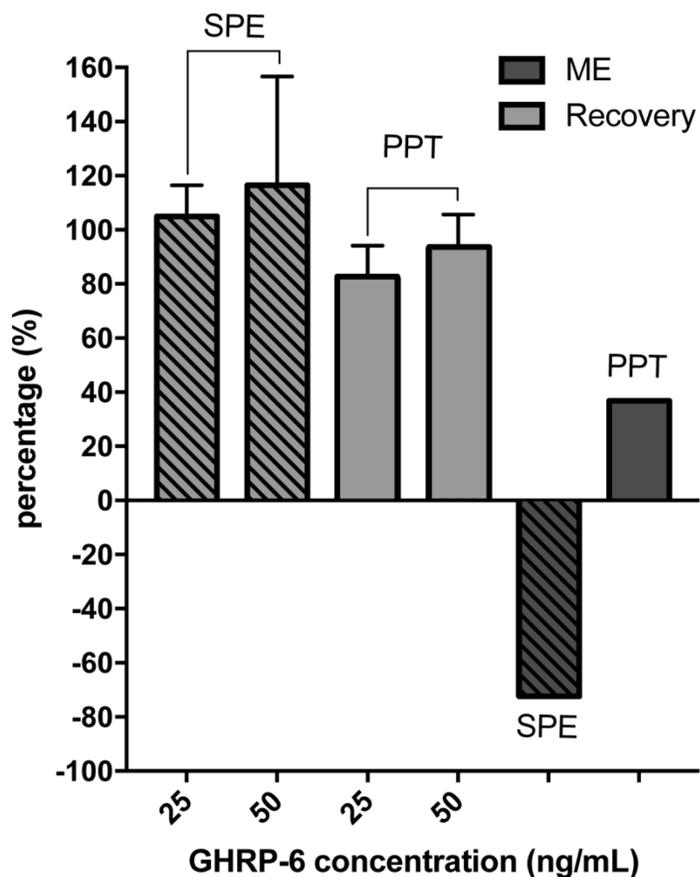


Figure S1. Comparison of the matrix effects and recovery between two techniques SPE (stripped) and PPT (plain) in the extraction of GHRP-6 in plasma samples. GHRP-6 was spiked at 25 and 50 ng/mL into pooled mice plasma ($n = 3 \pm \text{SD}$) and extracted using SPE cartridge oasis WCX 2 mg or protein precipitation methods.

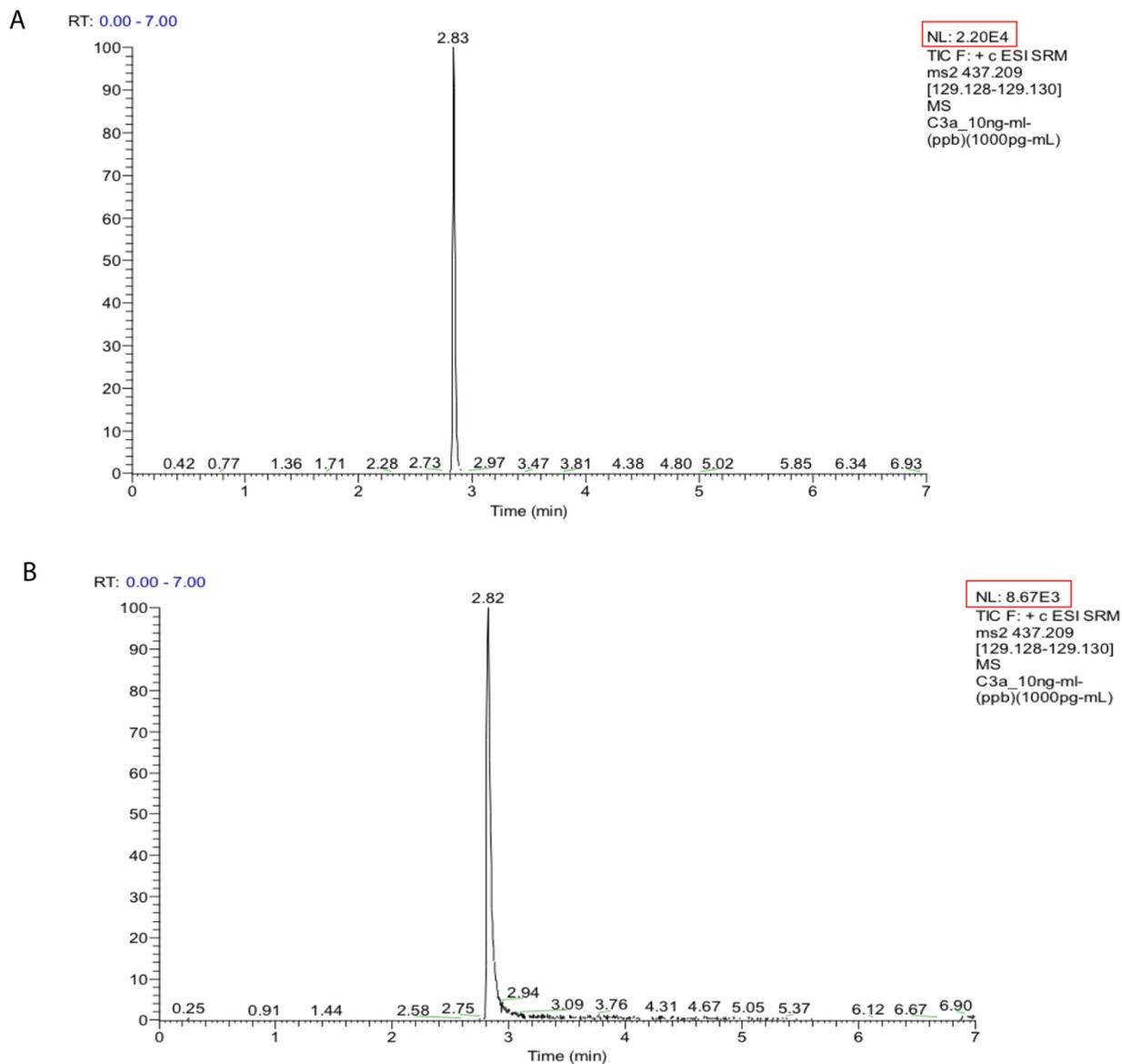


Figure S3. Effect of DMSO (1% v/v) added to the mobile phase. Neat solution samples spiked at a concentration of 10 ng/mL injected with A) no DMSO in the mobile phase vs. B) DMSO added in both mobile phase A & B.

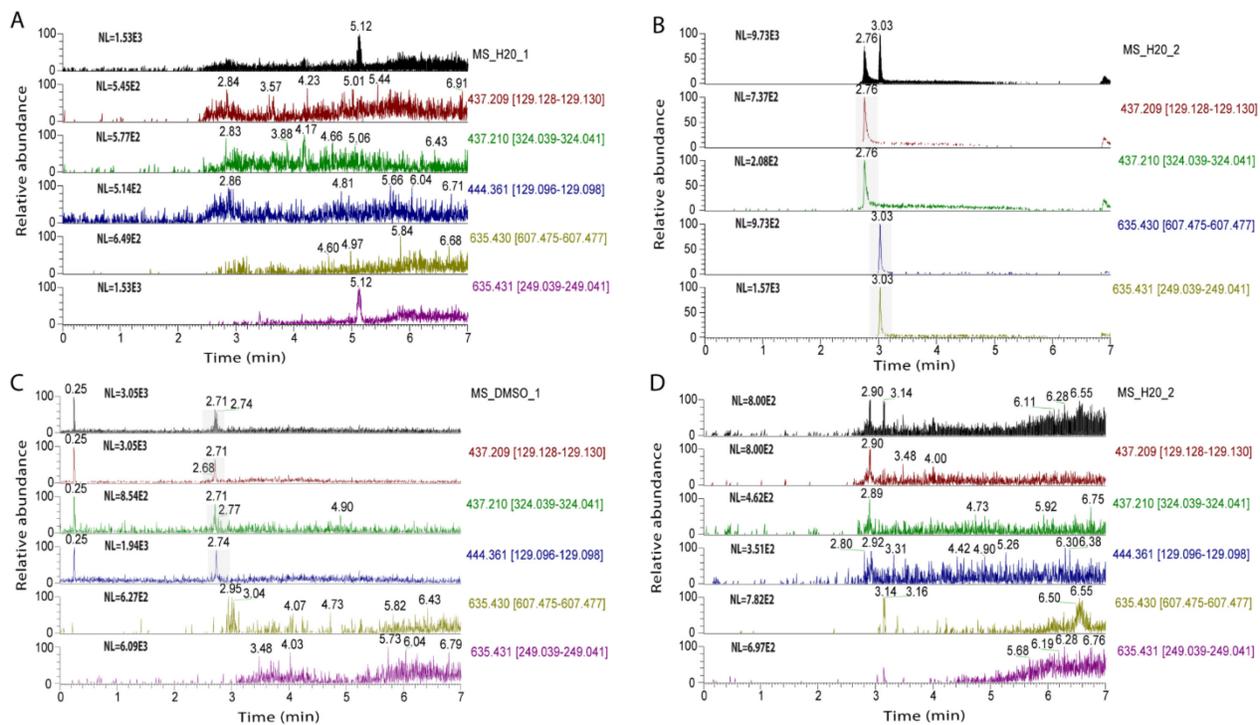


Figure S4. Effect of DMSO blank (50:50 v/v DMSO: H₂O) on autosampler carryover. A) H₂O blank injected at the beginning of the sequence, B) H₂O blank injected after a concentrated standard of 100 ng/mL showing a carry over, C) DMSO and D) H₂O blanks injected after a concentrated standard of 100 ng/mL, showing no carry over after H₂O blank.

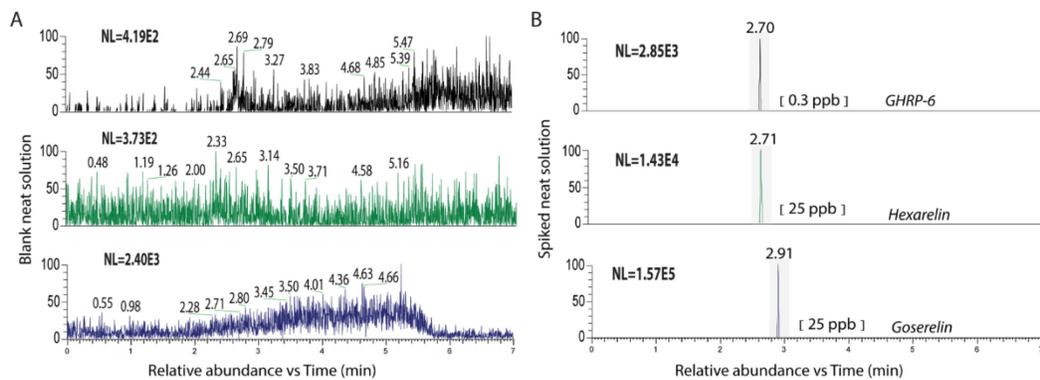


Figure S5. LC-MS/MS chromatograms of GHRP-6 and its internal standards for samples A) without analyte and ISTD (blank), and B) samples spiked with the analyte (concentration at LOQ), GHRP-6 (above panel) and corresponding ISTD (below panels, at 25 ppb) in neat solution.

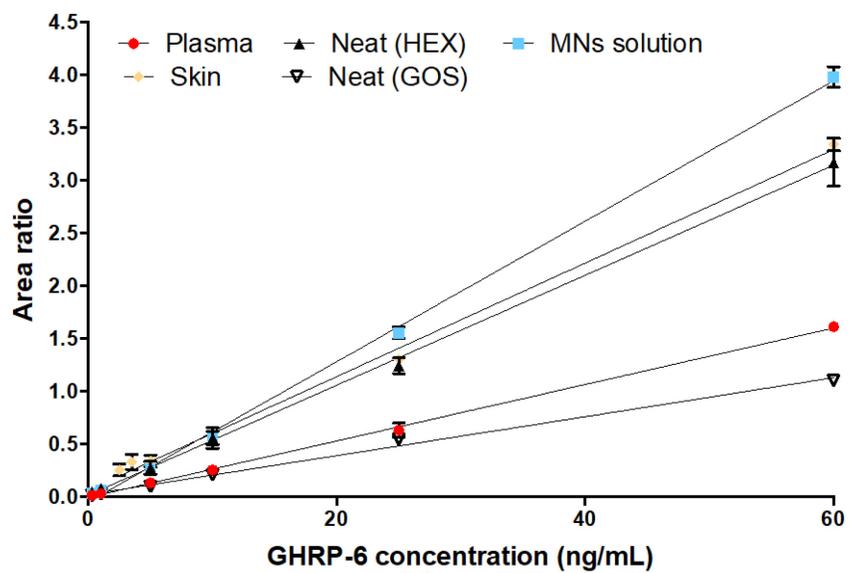


Figure S6. Calibration curves of GHRP-6 performed in plasma, MNs and skin matrices and in neat solution. The results are represented as mean \pm SD ($n = 4 \pm$ SD).

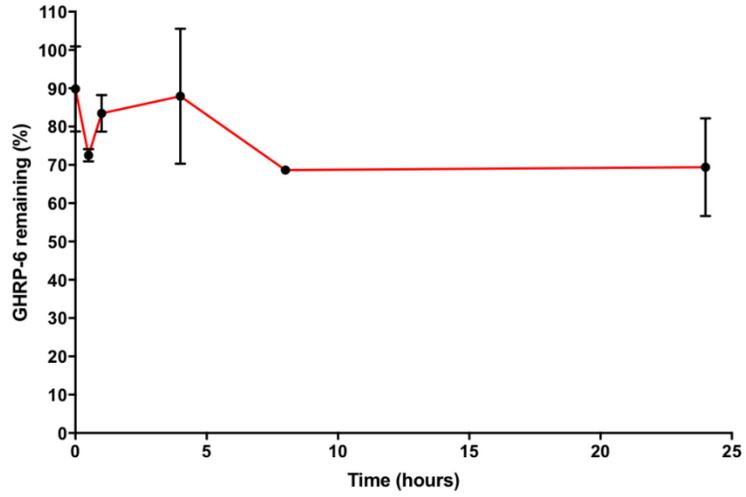


Figure S7. Degradation kinetics of GHRP-6 in pooled plasma at 4 °C and at different time points up to 24 h for mid QC samples. The results are represented as mean \pm SD ($n = 3 \pm$ SD).

Annexe 1: Développement d'un nouveau système d'administration du GHRP-6 par microaiguilles

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels et consommables

Les moules MPatchTM utilisés pour la production de microaiguilles provenaient de Micropoint technologies Pte Ltd (Singapour). Les dimensions pour les deux moules étaient : hauteur de 500 ou 800 μm , 10 x 10 aiguilles, aire de timbre de 4,1 mm x 4,6 mm. L'alcool polyvinylique (PVA) (poids moléculaire de 10 kDa) et la polyvinylpyrrolidone (PVP) (poids moléculaire de 3,5 à 7 kDa) provenaient de Sigma-Aldrich (États-Unis) et de BASF (Allemagne), respectivement. La solution de violet de gentiane (1% m/v) provenait de Humco (Texarkana, Texas). La cyanine-5 (Cy5) (poids moléculaire de 519 Da) a été fournie par le laboratoire du Dr Davide Brambilla (Faculté de pharmacie, Université de Montréal) avec un maximum d'excitation / émission de 649 / 670 nm.

1.2. Fabrication de timbres de microaiguilles (MNs, *microneedles*) en PVP-PVA.

Voir chapitre 3.3 (matériels supplémentaires). Deux types de microaiguilles (contrôles) sont inclus dans l'étude : les microaiguilles sans peptide (contrôle négatif) et les microaiguilles contenant une sonde fluorescente, Cy5, préalablement dissoute dans du méthanol (100%, 100 μL), avec une concentration finale de la solution pour les pointes d'aiguilles de 0,24 mg/mL.

1.3. Morphologie et propriétés mécaniques des timbres de microaiguilles.

Un stéréomicroscope à fluorescence (Zeiss Axio Zoom.V16, Zeiss Inc., Oberkochen, Allemagne) a été utilisé pour observer les morphologies et les dimensions des microaiguilles. Les différentes dimensions (hauteur, largeur et longueur) des microaiguilles et l'espacement entre chaque microaiguille ont été analysés à l'aide du logiciel Image J. De plus, la localisation du Cy5 dans les

pointes de microaiguilles a été observée. Les propriétés mécaniques ont ensuite été évaluées à l'aide d'un analyseur de texture TA-XT2 (Stable Microsystems, Haslemere, Royaume-Uni) en mode compression pour déterminer la force de rupture résultante du réseau de microaiguilles. Les timbres ont été visualisés avant et après l'application de la force de compression à l'aide du stéréomicroscope à fluorescence. Brièvement, pour tester la force de résistance à la fracture des microaiguilles, un seul timbre a été fixé sur la sonde (horizontale et microaiguilles dirigées vers le bas) et celui-ci a été dirigé vers une plateforme rigide en acier inoxydable positionnée verticalement. La sonde du capteur s'est déplacée dans le sens vertical à une vitesse de 0,5 mm s⁻¹. La sensibilité de l'appareil a été réglée à 0,049 N. La mesure de la force de résistance des microaiguilles a été mesurée lorsque les microaiguilles ont touché la plateforme avec un déplacement maximum de 0,7 mm des pointes des microaiguilles vers le support du timbre (atteinte de la force de fracture des microaiguilles).

1.4. Expérience *ex vivo* d'insertion des microaiguilles dans la peau de porc.

La capacité des formulations de microaiguilles à pénétrer dans la peau a été évaluée sur une peau de porc à l'aide d'un applicateur manuel à ressort. Les timbres de microaiguilles chargés avec la sonde fluorescente, Cy5, ont été appliqués sur la peau en utilisant une force verticale seulement pendant 3 minutes, puis ont été immédiatement retirés. Après application du timbre de microaiguilles, une solution de violet de gentiane (1% m/v) a été appliquée sur la peau pendant 10 minutes pour colorer les sites de pénétration des microaiguilles. Celle-ci a été ensuite nettoyée avec une solution saline (0,9 %) et de l'éthanol (70 %) pour éliminer le colorant résiduel à la surface de la peau. Les taux de pénétration des microaiguilles ont été calculés en divisant le nombre de taches colorées (dues à une coloration au violet de gentiane ou à la présence de microaiguilles fluorescentes dans la peau) par le nombre de microaiguille dans le timbre (Li *et al.*, 2019). L'efficacité de libération de la sonde a été calculée en deux étapes. Premièrement, l'intensité de fluorescence de la sonde dans la peau a été évaluée en soustrayant 1) l'intensité de fluorescence résiduelle dans le support par rapport à celle du timbre avant insertion et 2) l'autofluorescence à la surface de la peau. Ensuite, l'intensité de fluorescence de la sonde dans la peau a été divisée par l'intensité de fluorescence dans le timbre avant insertion. Ces données ont été mesurées par un logiciel d'analyse d'images quantitatives (Zen 2.5 pro; Zeiss, Allemagne). Enfin, la peau a été

congelée dans un composé qui durcit à -20 °C (OCT, *optimal cutting temperature*) ou enrobée de paraffine (Iric, laboratoire d'histologie du Dr Gaboury). Par la suite, une coupe parallèle tous les 50 µm couvrant la zone du timbre a été réalisée pour faire une analyse histologique des peaux. Un échantillon de peau sans insertion de microaiguille (contrôle négatif) a été coloré avec de l'hématoxyline / éosine / safran pour visualiser les couches cutanées.

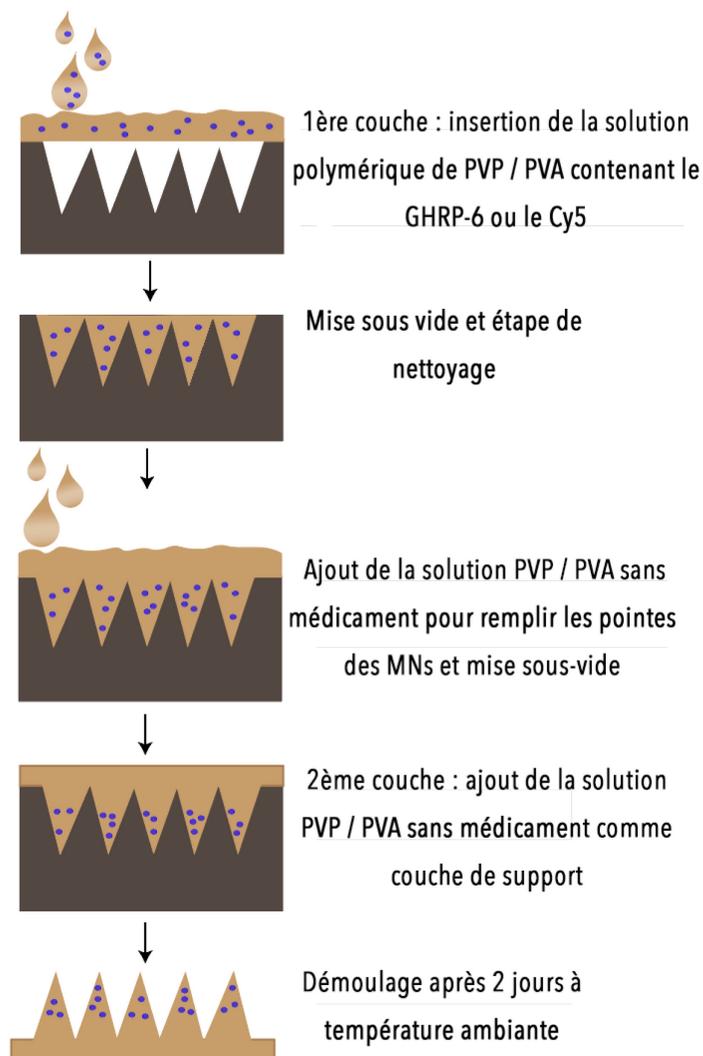


Figure S1. Illustration schématique du processus de fabrication des timbres de microaiguilles de PVP / PVA par micro-moulage. Cette fabrication inclut deux étapes de préparation : la première étant la conception de la couche de microaiguilles encapsulant le médicament modèle (GHRP-6) ou une sonde fluorescente (Cy5) et la deuxième étant la conception du support.

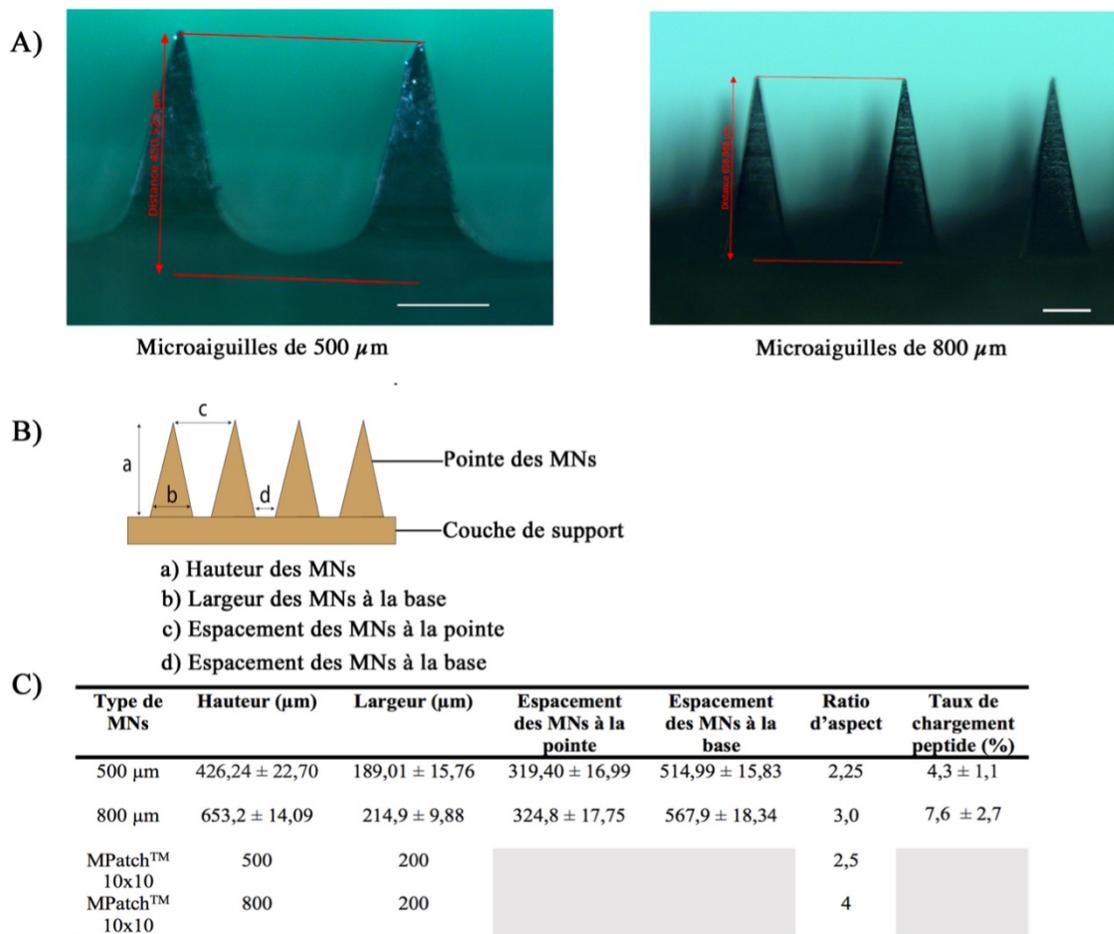


Figure S2. Caractérisation des timbres de microaiguilles de PVP / PVA. (A) Images de microscopie à champ clair de microaiguilles de différentes tailles. Barre d'échelle, 200 μm , (B) Représentation schématique d'un timbre de microaiguilles et de ses paramètres géométriques, (C) Tableau des caractéristiques physiques des timbres de microaiguilles préparés à partir de PVP / PVA en utilisant deux types de moules MPatch™ (500 et 800 μm) (n=10) et taux d'encapsulation de GHRP-6 correspondants (n=3).

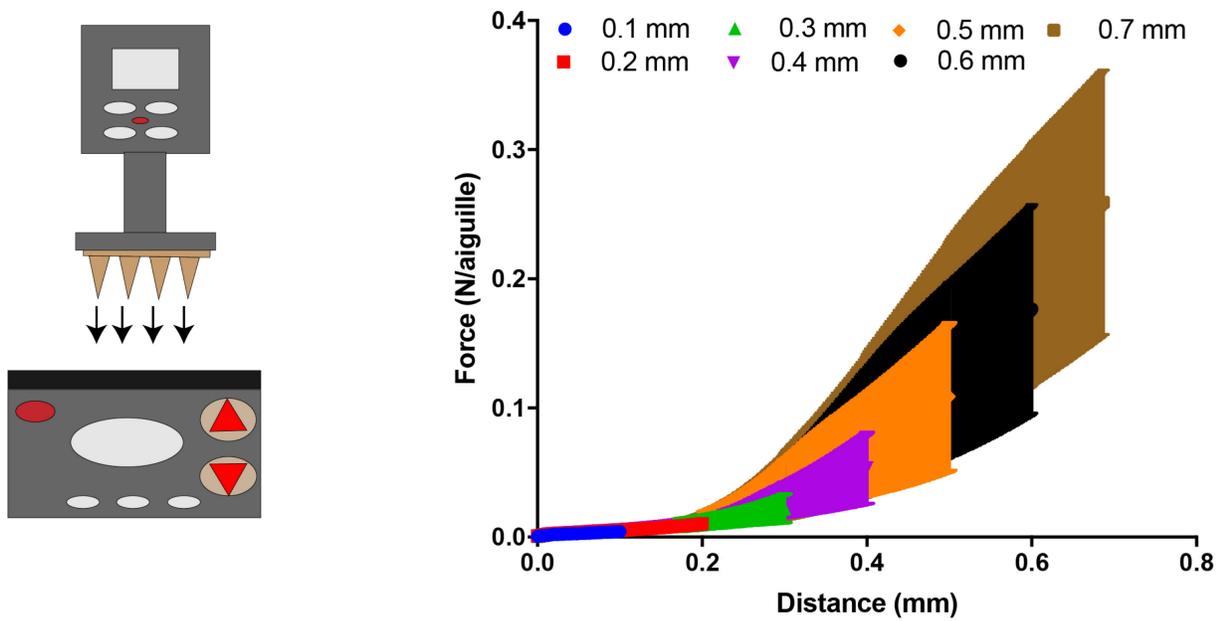


Figure S3. Caractérisation des performances mécaniques des timbres de MNs PVP-PVA. Schéma du montage expérimental des microaiguilles lors de l'application d'une force à différent déplacement de la pointe des aiguilles touchant la plateforme au support du timbre (gauche) et graphique du comportement mécanique des microaiguilles de 800 μm sous ce test de compression (n=6) (droite).

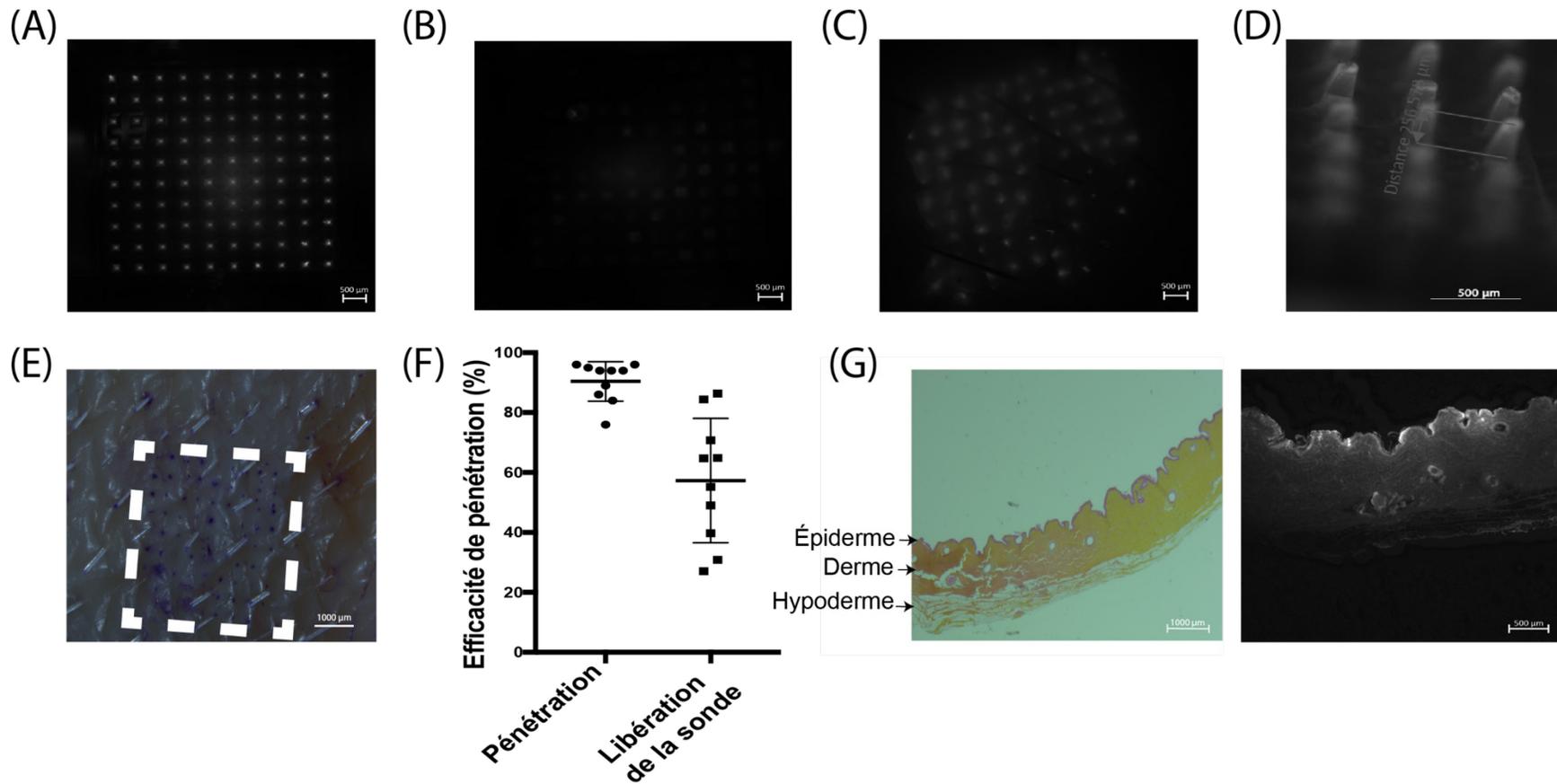


Figure S4. Images représentatives en fluorescence du timbre de microaiguilles (A) avant insertion, (B) après insertion, (C) de la délivrance de la sonde fluorescente Cy5 dans la peau, (D) après insertion au niveau des pointes de microaiguilles (barre d'échelle, 500 μm), et (E) en fond clair de la peau de porc après insertion du timbre de microaiguilles (barre d'échelle, 1000 μm). (F) Quantification de l'efficacité de pénétration (n=10), de délivrance du Cy5 (n=10) et (G) images représentatives de coupes histologiques en fond clair de la peau de porc avant insertion de microaiguilles (image gauche, barre d'échelle de 1000 μm) et en fluorescence après insertion de microaiguilles (image droite, barre d'échelle de 500 μm).

Référence

Li, W., Terry, R. N., Tang, J., Feng, M. R., Schwendeman, S. P., & Prausnitz, M. R. (2019). Rapidly separable microneedle patch for the sustained release of a contraceptive. *Nature Biomedical Engineering*, 3(3), 220-229.

Chapitre 4 - DISCUSSION ET CONCLUSION

4.1. Mise en contexte

Les systèmes d'administration de médicaments ont beaucoup évolué depuis l'utilisation de formulations simples (ex : gels, crème, timbre transdermique) vers des systèmes plus sophistiqués de polymères, pour permettre le passage de substances actives à travers la peau. Les systèmes transdermiques peuvent être non invasifs (ou minimalement) et auto-administrables, ce qui en font des alternatives prometteuses à la voie orale. Cependant, l'objectif principal reste le même à savoir que ces nouveaux systèmes d'administration doivent maximiser principalement le taux d'absorption de la substance active vers la cible cutanée, ce qui permet de diminuer à la fois les doses et la fréquence d'administration. *In fine*, ce type de système ainsi développé améliorerait la biodisponibilité et l'observance du patient. Le plus grand défi de la voie cutanée demeure l'amélioration de la perméabilité d'une variété de molécules thérapeutiques dont les macromolécules (ex : peptides, protéines) qui ne nécessitent pas forcément de faibles doses (ordre du mg ou moins) tout en s'affranchissant de la principale barrière de la peau, le *stratum corneum*.

Dans ce contexte, de nouveaux systèmes d'administration innovants : les implants d'organogel se formant *in situ* et les microaiguilles se dissolvant dans la peau ont été étudiés. Ceux-ci offrent de nombreux avantages dont (i) le contrôle de la libération du médicament à plus ou moins long terme, ce qui permet de réduire la fréquence d'administration des médicaments et éventuellement les effets secondaires, (ii) une flexibilité dans le système d'administration permettant un traitement localisé tout en obtenant une biodisponibilité améliorée et (iii) une fabrication simple et peu coûteuse. Afin d'améliorer l'impact clinique de tels systèmes, une administration sûre et efficace doit être atteinte. À cette fin, il est indispensable de comprendre comment la composition des formulations et leurs propriétés physiques et chimiques influencent les mécanismes complexes impliqués dans la libération de la substance active. Par conséquent, nous avons étudié dans ce projet de thèse, dans un premier temps, l'effet de la composition des organogels sur le relargage des substances actives sélectionnées hydrophiles et lipophiles. Dans un deuxième temps, l'influence de la hauteur des microaiguilles sur la libération d'un peptide modèle a été également investiguée.

4.2. Les implants d'organogel à base de 12-HSA pour l'administration de substances actives hydrophiles et lipophiles

4.2.1 L'addition de molécules d'organogélifiant diminue la Tgel et augmente la stabilité thermique des gels

Notre premier objectif était de développer des implants se formant *in situ* à base d'organogels et d'évaluer leurs propriétés (physicochimiques, rhéologique), leur profil de gonflement / dégradation, leur aptitude à l'injectabilité, ainsi que leurs performances comme système d'administration de médicaments hydrophiles et lipophiles. Nos résultats indiquent que l'augmentation du pourcentage massique en 12-HSA entraîne une augmentation de la résistance du gel à la déformation et à la dégradation de par la formation d'un réseau tridimensionnel gélifié. L'ajout d'un agent tensioactif non ionique (polysorbate 80, Tween 80) perturbe l'équilibre d'assemblage du système gélifié, en diminuant l'injectabilité des formulations et en augmentant leur dégradation. Le système d'organogels permet de prolonger la libération de l'acyclovir, médicament modèle hydrophile, comparativement aux formulations de clotrimazole (substance active lipophile). Les effets cytotoxiques des formulations développés indiquent une toxicité plus élevée des gels en augmentant la quantité de 12-HSA. Cependant, cet effet semble lié à l'huile minérale légère présente au sein du système.

Dans un premier temps, les formulations d'organogels ont été préparées à base d'organogélifiant de faible poids moléculaire, le 12-HSA (chapitre 3.2). Au sein de ces formulations, le pourcentage massique en organogélifiant a été varié : 2, 4, 6, 8 et 10 % m/m (% poids/poids) avec ou sans Tween 80 pour un ratio de volume constant de 1 : 4 pour le Tween 80 : huile minérale. La concentration de NMP dans chaque système est restée constante (12 % m/m de phase huileuse).

Grâce à leur propriété thermoréversible, les organogels ont généré un intérêt grandissant pour leur utilisation potentielle comme système d'administration de médicaments. Ces transitions

de phases réversibles gel-sol (température de fusion, *melting temperature* (T_{melt})) et sol-gel (température de gélification, *gelation temperature* (T_{gel})) correspondent au chauffage et au refroidissement du système, respectivement. D'un point de vue physicochimique, la nature dynamique réversible de ces interactions physiques entre les molécules d'organogélifiant et de solvant organique / huile entraîne soit la formation par assemblage de molécules d'organogélifiant ou la rupture du réseau tridimensionnel gélifié.

Indépendamment de l'ajout de Tween 80, il a été montré que la T_{gel} diminuait de façon constante avec l'augmentation du pourcentage massique en organogélifiant et inversement jusqu'à atteindre la concentration critique de gélification à 2 % m/m et 37 °C). Ce comportement de gélification sous l'effet de la température est contraire au comportement des organogels conventionnels (sans inversion de phases) qui ont montré généralement une augmentation de la valeur de T_{gel} suivant l'augmentation du pourcentage massique en gélifiant (Liu *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2007). Ce phénomène peut être expliqué par une augmentation de la force des liaisons de faibles énergies, telles que les liaisons hydrogène, entraînant la formation du système pour un pourcentage massique plus élevé en organogélifiant et à de plus basses températures dans le cas des implants *in situ* formés par inversion de phases (Esposito *et al.*, 2017; Ghan *et al.*, 2020). Cette théorie est d'autant plus renforcée que la longueur de la liaison hydrogène de l'eau (phase aqueuse PBS, milieu de diffusion) augmente avec l'augmentation de température (Chaplin, 2007), ce qui aide à diminuer les interactions solvant organique-gélifiant en faveur des interactions eau-solvant organique pour aider à la formation du gel à faible pourcentage massique en organogélifiant (Lan and Rogers, 2015).

L'ajout de Tween 80 (23 % m/m) semble néanmoins avoir un effet sur la diminution de la fenêtre de gel (de 20-70 °C sans tensioactif à 20-64 °C avec tensioactif). De plus, les valeurs de T_{melt} augmentent avec l'augmentation du pourcentage massique en organogélifiant pour les organogels de Tween 80 (confirmation par rampe de température / rhéologie), ce qui est typique chez les organogels de 12-HSA (Carranca *et al.*, 2017; Kirilov *et al.*, 2014). En effet, l'introduction de Tween 80 perturberait les interactions entre les molécules de gélifiant en première instance. Mais, ce phénomène peut être compensé par l'augmentation du pourcentage massique en organogélifiant qui aide ainsi le réseau de gel à atteindre une stabilité thermique plus élevée. Ces

résultats paraissent en accord avec ce qui a été rapporté dans l'étude de Koocheki *et al.* En effet, ils ont rapporté que le Tween 80, tensioactif non-ionique hydrophile, augmente la miscibilité du gélifiant de l'implant, le PLGA. Ceci serait dû aux interactions entre les groupes carboxyliques libres du PLGA et les groupements polyéther du Tween 80. Cet effet contribue alors à empêcher la formation de la structure cristalline à plus grande échelle. Ainsi, à la membrane de l'implant, l'effet plastifiant du Tween 80 aide à réduire la tension interfaciale entre le polymère et la solution tampon améliorant l'entrée d'eau dans les organogels (Koocheki *et al.*, 2011). De plus, sachant que la formation du réseau gélifié de 12-HSA résulte de la dimérisation du groupe acide carboxylique et de la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les groupes hydroxyles secondaires, il est probable que l'ajout de tensioactif polaire perturbe la gélification ou cristallisation du polymère (Lan and Rogers, 2015). Ce type de comportement semble se rapprocher de celui des émulsions formés suivant un mécanisme de fibres remplies de fluide.

Néanmoins, ces deux types d'implants d'organogel se formant *in situ*, en utilisant la NMP comme solvant organique, ont permis de réduire les concentrations en gélifiant nécessaire à la formation d'un implant se formant *in situ* comparé aux études entreprises sur le système PLGA / NMP (Bode *et al.*, 2018; Enayati *et al.*, 2017; Koocheki *et al.*, 2011; Patki *et al.*, 2021). Cette plus grande flexibilité dans l'ajustement du pourcentage massique en organogélifiant permet à la fois de mieux contrôler la libération en substance active et l'effet de toxicité dépendante de la dose de certains polymères présents dans les systèmes d'administration de médicaments.

4.2.2 La résistance à la déformation des gels est augmentée par addition de molécules d'organogélifiant tandis que la présence de Tween 80 perturbe l'organisation du réseau gélifié

Dans un deuxième temps, une emphase particulière a été mise pour comprendre les propriétés rhéologiques d'écoulement thermique et dynamique des différentes formulations d'organogels selon le pourcentage massique en organogélifiant du système et l'ajout de tensioactif. Cette étude nous a ainsi permis de mieux appréhender les stress mécaniques que peut subir l'implant au niveau de sa structure considérant les propriétés biomécaniques de la peau.

Les valeurs de T_{gel} et T_{melt} ont été déterminées précédemment grâce à la méthode du tube inversé. Toutefois, pour obtenir plus de précisions sur ces valeurs et sur les réponses viscoélastiques des matériaux, les variations de modules de conservation G' (mesure de la composante élastique) et de perte G'' (mesure de la composante plastique) ont été évaluées selon une rampe de température. En effet, cette étude permet, lors d'une rampe de température suffisamment lente et de montée linéaire, d'identifier tout changement morphologique au sein du réseau de gel en complément de techniques microscopique et / ou de diffusion (Lan and Rogers, 2015; Patel, Babaahmadi, *et al.*, 2015; Patel, Dumlu, *et al.*, 2015). Il a été observé, comme attendu en comparaison avec les résultats obtenus par la méthode du tube inversé, la transition réversible de l'organogel de l'état cristallin (gel) à l'état liquide (sol) selon le chauffage ou le refroidissement des gels. Cette structuration / déstructuration du réseau fibrillaire auto-assemblé tridimensionnel est gouvernée par un réseau d'interactions de liaison hydrogène unidirectionnel (Mallia and Weiss, 2018). Les propriétés viscoélastiques (G' , G'') associées aux valeurs de T_{gel} et T_{melt} étaient dépendantes du pourcentage massique en organogélifiant. De plus, la force du gel, caractérisée par G' , augmentait en élevant le pourcentage massique en organogélifiant, et ce, de façon indépendante de la température à laquelle le G' maximum a été atteint pour chaque système. Ce facteur est d'autant plus important pour assurer l'implantation du gel et sa tenue après son application.

Pour tous les gels préparés à différent pourcentage massique en polymère, le retour à la structure gélifiée initiale, après les cycles chauffage-refroidissement, a été observé. De plus, les courbes d'écoulement des gels ont montré leur comportement non newtonien, rhéofluidifiant. Ce comportement correspond à la diminution de la viscosité apparente sous l'augmentation du taux de cisaillement. Par ailleurs, le comportement thixotropique des gels, souvent en association avec le comportement rhéofluidifiant, est une propriété d'amincissement en fonction du temps avec un retour vers la viscosité initiale après cycles de déstructuration / restructuration. Il a été noté également que la viscosité apparente au repos (sans cisaillement) était plus élevée chez les organogels 12-HSA que de 12-HSA Tween 80. Ces nouvelles observations ont ainsi été attribuées à la possibilité d'une interaction entre les molécules de tensioactif hydrophiles et les chaînes LMOG (liaisons hydrogène) perturbant l'assemblage du réseau fibrillaire formée par les molécules d'organogélifiant, comme c'est le cas pour d'autres systèmes de polymères sensibles à la température (Almeida *et al.*, 2012; Kirilov *et al.*, 2009; Koocheki *et al.*, 2011; Lan and Rogers,

2015). Des expérimentations complémentaires pour élucider le rôle du Tween 80 sur la cinétique de formation des chaînes de polymères par l'étude des organogels de 12-HSA à différentes proportions de Tween 80 seraient nécessaires pour conclure sur l'effet du Tween 80 dans ces implants d'organogel.

Considérant les mesures de balayage de fréquence dans le régime viscoélastique linéaire, les gels physiques peuvent être qualifiés de structures de type « solides » ou « liquide » en fonction du réarrangement dynamique de la structure sous cisaillement. Typiquement, pour tous les organogels avec ou sans Tween 80, leur comportement viscoélastique était dépendant du pourcentage massique en organogélifiant. Si bien que pour de faibles pourcentages massiques en gélifiant (2 et 4 % m/m), la quantité d'organogélifiant n'était pas suffisante pour conférer une résistance à la rupture élastique pour de faibles contraintes de cisaillement oscillatoire (comportement de type liquide). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Lan *et al.* associant l'augmentation de la force de résistance à la déformation sous cisaillement de leur système de 12-HSA à un pourcentage massique en organogélifiant plus élevé (Lan and Rogers, 2015). La morphologie du réseau tridimensionnel de fibres d'organogélifiants détermine donc leurs propriétés rhéologiques à plus grande échelle (Esposito *et al.*, 2017).

Au vu de ces résultats, le choix de la composition des organogels de 12-HSA est donc crucial pour correspondre aux propriétés mécaniques des tissus locaux. Ainsi, une légère variation de composition peut entraîner des changements au niveau physico-chimique et mécanique importants. Les propriétés de fluidification et thixotropie par cisaillement des organogels sont par ailleurs intéressantes du point de vue de l'implantation en modulant la forme pour atteindre un meilleur contact tissu-biomatériaux. La viscosité des organogels de 12-HSA plus élevée au repos que ceux contenant le Tween 80 devraient leur assurer un temps de résidence prolongée au site d'injection. Néanmoins, pour envisager une meilleure application clinique, des études au-delà du régime linéaire en utilisant la rhéologie oscillatoire à grande amplitude correspondant à des déformations importantes et / ou rapides seraient à envisager pour prédire la complexité du comportement mécanique des gels dans la peau (propriétés de dureté, comportement de fluidification et d'adoucissant).

4.2.3 L'ajout de Tween 80 diminue la capacité d'injectabilité et augmente la dégradation des organogels

Selon la composition du système (pourcentage massique en organogélifiant, ajout de 23 % m/m de Tween 80 dans le système), les forces requises pour l'extrusion de la formulation à travers une aiguille ont été évaluées via la mesure du débit d'injection. De par leur caractère rhéofluidifiant, les gels de 12-HSA possèdent une propriété intrinsèque leur permettant d'être facilement injectables au travers d'aiguilles fines ou longues compatibles avec des injections SC. Ce comportement a d'ailleurs permis l'injectabilité de nombreux gels pouvant contenir des liposomes (El Kechai *et al.*, 2015). En effet, leur injectabilité a été mise en évidence et se trouvait dans des zones attendues des débits usuels d'injection, lors des expériences de seringabilité, avec des formulations modèles à faible pourcentage massique en organogélifiant (4 % m/m, gel fluide) pour les organogels de 12-HSA / 12-HSA Tween 80 et à haut pourcentage massique en organogélifiant (10 % m/m, gel solide) pour les organogels de 12-HSA.

Comme attendu, le débit d'injection diminuait avec la diminution du diamètre de l'aiguille à cause de l'augmentation de la résistance hydrodynamique en accord avec la diminution du diamètre interne de l'aiguille. De plus, l'augmentation du pourcentage massique en 12-HSA contribuait également à la diminution du débit d'injection, ce qui peut être expliqué par la proximité des monomères augmentant la viscosité du gel en phase liquide. Ces systèmes hautement concentrés en polymère posent par ailleurs des problèmes de seringabilité / injectabilité et surtout quand ceux-ci sont entreposés à basse température, ce qui contribue à augmenter la viscosité significativement (Q. Zhang *et al.*, 2018). Au niveau des études rhéologiques, il a été observé que l'ajout de Tween 80 dans la phase huileuse du système à 4 % m/m en organogélifiant a permis de diminuer d'environ 3 fois la viscosité apparente au repos des gels par rapport à la même formulation sans tensioactif. Or, dans cette étude, l'ajout de Tween 80 contribue à fortement diminuer le débit d'injection. Par conséquent, le pourcentage massique en 12-HSA et le contenu hydrophile (le Tween 80 possédant une haute viscosité à température ambiante) peuvent être adaptés pour assurer l'injectabilité des implants se formant *in situ* à moindre douleur pour le patient et moduler l'interaction entre organogélifiant et tensioactif.

Ainsi, les données de rhéologie ne permettent pas de prédire la force requise d'injection des gels à elles seules, mais sont complémentaires pour prédire le comportement viscoélastique du gel sous écoulement.

Un autre paramètre important à prendre en considération, cette fois-ci qui influence directement le profil de libération de médicaments dans le système, est le comportement de dégradation des organogels. En effet, la libération de la substance active à partir de l'implant d'organogel est le résultat d'un processus physicochimique qui peut se retrouver rapidement complexe dépendamment de la composition du système. Pour les implants se formant *in situ* basés sur le PLGA, il a été constaté que ces derniers sont susceptibles à la fois à la libération en rafale de la substance active, ainsi qu'à la variabilité des dépôts formés modifiant la dégradation et la cinétique de relargage de la substance active (Enayati *et al.*, 2017; Makadia and Siegel, 2011).

De nombreux hydrogels, comme les matrices de PLGA, subissent une érosion massive médiée par hydrolyse et / ou sous l'action d'enzymes au niveau du site d'injection. Des dérivés du 12-HSA obtenus par l'hydrolyse de l'huile de ricin hydrogénée peuvent eux aussi être estérifiés et donc être propices à l'hydrolyse, comme c'est le cas pour le PLGA. L'hydrolyse du PLGA coupant les liaisons ester contribue ainsi à augmenter la mobilité des chaînes polymériques. Une étude portant sur l'effet d'une lipoprotéine lipase qui hydrolyse les triglycérides de leur huile végétale (en acides gras et les di-/monoglycérides) sur les organogels de 12-HSA *in vitro* a montré que les organogels subissaient une érosion de surface (Windorf, 2017). Le principe régissant l'organogélation reposant sur le retard de la dégradation des huiles, l'érosion de surface est attendue étant donné que la vitesse de diffusion de l'eau plus faible dans ce système qu'au sein des hydrogels. Dans le cas de l'érosion en surface, la perte de masse et la perte d'épaisseur sont concomitantes et peuvent être quasi-linéaires avec seulement une diminution négligeable du poids moléculaire du polymère dans toute la masse de polymère. Ceci permet donc une rétention contrôlée des propriétés mécaniques pendant le phénomène de dégradation et de pouvoir mieux contrôler la vitesse de libération de la substance active (Sommerfeld *et al.*, 2014).

Il existe très peu d'études systématiques qui évaluent l'effet de la composition des organogels sur les possibles mécanismes de dégradation et de gonflement de l'implant. Pourtant, il

est indéniable que le pourcentage massique de polymère ainsi que l'ajout de tensioactif influencent ces deux mécanismes de façon non négligeable et *in fine* le relargage de substance active. Dans notre étude, il a été remarqué que le gonflement des organogels (4 ou 10 % m/m, avec ou sans Tween 80) lors de leur injection dans du PBS (pH = 7,4 ; 37 °C) pendant 6 heures est suivi d'un processus de dégradation quasi-linéaire pour tous les gels, ce qui indique une érosion de surface. De plus, la diminution du pourcentage massique en 12-HSA et l'ajout de Tween 80 ont conduit à une dégradation accélérée des implants. Un tel comportement met en évidence l'accès limité de l'eau dans le système en raison d'un rempart généré par les molécules d'organogélifiant en surface. En effet, Dufresne *et al.* ont, par exemple, montré que la précipitation de l'organogélifiant en surface créait d'une barrière physique protégeant les liaisons ester de l'huile de la matrice de l'hydrolyse par la lipase (Dufresne *et al.*, 2012). De plus, Windorf *et al.* ont montré que leurs implants d'organogel basés sur le 12-HSA formaient des dépôts plus stables, avec une forme définie et reproductible en augmentant le pourcentage massique en 12-HSA, facilitant ainsi une dégradation plus uniforme (Windorf, 2017).

Bien que négligeable par rapport aux hydrogels et notamment les gels polyélectrolytes, le gonflement est un facteur à prendre en considération dans la dégradation des implants. Cette caractéristique intrigante est par ailleurs contrôlée selon les propriétés physicochimiques du gel et son environnement (ex : concentration en ions, présence de tensioactif, température, humidité). Selon la théorie du gonflement des hydrogels neutres, décrite par Flory-Rehner, un réseau immergé dans un bon solvant et chimiquement ou physiquement réticulé aura tendance à se disperser le plus loin possible, pour diminuer son énergie libre pour se rapprocher d'un équilibre stable. Cependant, une compétition s'en suit dans le système entre les forces osmotiques qui tendent à disperser les chaînes de polymère et les forces élastiques prenant en compte la réticulation du système et s'opposant au gonflement (Quesada-Pérez *et al.*, 2011). Le gonflement dépend donc du caractère hydrophile des chaînes de polymères et de l'assemblage moléculaire du réseau (liaisons hydrogène et dans une moindre mesure interactions de van der Waals pour le 12-HSA). Il a donc été postulé que la liaison du tensioactif au système a augmenté le gonflement du système par entrée d'eau provoquant un changement dans la dynamique d'assemblage des molécules de 12-HSA en surface se dispersant dans le tampon (celles-ci sont insolubles dans l'eau).

Les études *in vitro* actuelles se limitant seulement à l'hydrolyse du système ne permettent pas de refléter tous les facteurs pouvant influencer la dégradation des implants *in vivo*. En effet, Windorf *et al.* ont constaté dans leur étude *in vivo* que leurs implants se dégradèrent par fragmentation en dépôts de plus petites tailles et non pas par érosion de surface (étude *in vitro*) (Windorf, 2017). Des expérimentations plus approfondies *in vivo* sont donc requises pour appréhender le rôle de divers processus comme les dégradations métaboliques (ex : phagocytose, résorption dans le sang, drainage lymphatique) sur la dégradation des systèmes d'organogel dans l'organisme et les facteurs influençant le gonflement (salinité, pH, température, cations polyvalents) des gels.

4.2.4 Les organogels de 12-HSA Tween 80 favorisent une administration prolongée de l'acyclovir comparativement aux organogels de 12-HSA immobilisant le clotrimazole

Dans un troisième temps, la performance des organogels de 12-HSA pour la libération de deux substances actives modèles, l'une hydrophile, l'acyclovir ($\log P = -1,56$; solubilité dans l'eau à 37°C de 2,5 mg/mL et solubilité dans le Tween 80 de 27,9 mg/mL) et l'autre lipophile, le clotrimazole ($\log P = 4,1$; solubilité dans l'eau 0,00147 mg/mL), a été étudiée *in vitro* et *ex vivo* en utilisant les cellules de diffusion de Franz (statiques verticales). Les deux modèles de membranes utilisées pour la diffusion (*in vitro*) et la perméation (*ex vivo*) étaient des membranes artificielles inertes de cellulose régénérée et des tissus excisés de peau de porc au niveau du flanc (trois couches épiderme-derme-hypoderme), respectivement. Souvent en raison de la variété des facteurs influençant la libération de substance active (appareillage, conditions d'expérimentation), il est difficile de comparer des systèmes similaires d'administration entre eux dans la littérature. D'où l'importance de fixer ces paramètres dans l'expérimentation de façon à diminuer les sources de variabilités dans les données obtenues au niveau des profils de libération de chaque substance active.

Les tests de libération de l'acyclovir et du clotrimazole *in vitro* ont mis en évidence que la libération du médicament hydrophile dépendait du pourcentage massique en organogélifiant et des propriétés physicochimiques de la substance active. En effet, la formulation d'organogel et

l'augmentation du pourcentage massique en organogélifiant ont permis de diminuer la vitesse de libération de la substance active, et ce jusqu'à 10 jours. Ces résultats ont été corroborés *ex vivo* au niveau des valeurs de perméabilité apparente et au niveau de la modélisation de la cinétique de libération qui suivait le modèle de Korsmeyer-Peppas (mécanisme de diffusion quasi-fickienne) pour les 6 premières heures. Toutefois, le pourcentage massique en organogélifiant n'a eu aucun effet sur la libération d'acyclovir au niveau de l'étude *ex vivo*. Ceci peut être expliqué par le phénomène de dégradation de la matrice plus marquée pour ce gel contenant du Tween 80 comparé au gel de 12-HSA sans tensioactif, ce qui influence la libération *in vitro*. De plus, une variation au niveau de la forme de l'implant après injection dans la peau de la formulation comparée à un implant préformé (formulation injectée au préalable dans le PBS, *in vitro*) peut également se produire. Des dépôts de formes variables vont donc influencer la dégradation de l'implant et la libération conséquente en substance active. En effet, la pression exercée par le tissu sous-cutané peut entraîner des formes d'implant moins reproductibles et encore plus à faible viscosité. Ce constat a été partagé par les études menées par Windorf qui ont révélé que leur implant à faible viscosité entraînait une dégradation lente ou incomplète du dispositif en surface contrairement à leurs implants de consistance plus solides (Windorf, 2017).

Concernant la substance active lipophile, sa libération hors du système ne semblait pas dépendre de la composition des organogels au cours des études *in vitro*, ce qui n'était pas le cas *ex vivo*. En effet, la formulation d'organogel a permis de diminuer la perméation du clotrimazole comparé à la solution en médicament libre et la cinétique de libération suivait le modèle d'Higuchi (diffusion fickienne). Ce type de libération pour les substances actives lipophiles hors du réseau d'organogel de 12-HSA rejoint les conclusions amenées par Windorf selon lesquelles les molécules lipophiles dissoutes sont principalement libérées par diffusion et que l'érosion n'est pas indispensable à la libération de celles-ci (Windorf, 2017).

L'ensemble de ces résultats sont en accord avec les conclusions de l'étude d'Iwanaga *et al.* qui ont montré que les organogels pouvaient être des systèmes à libération contrôlée et retarder la libération de médicaments hydrophiles plus présents à l'état solide qui ont dû être dissous avant diffusion dans le réseau (Iwanaga *et al.*, 2012). L'acyclovir étant dans notre cas solubilisé dans le Tween 80, la diffusion de l'eau dans le système se produisant par érosion de surface est quand

même nécessaire pour la libération de l'acyclovir. Toutefois, des expérimentations complémentaires afin de s'assurer de la stabilité des formulations sont nécessaires. Ceci afin de vérifier l'absence de cristallisation de la substance active lors du refroidissement rapide de l'organogel contenant l'acyclovir dans le Tween 80 ainsi que l'absence de séparation de phase à l'entreposage. En effet, les molécules de Tween 80 possèdent des têtes hydrophiles très volumineuses et des queues hydrophobes non ramifiées, ce qui constitue un paramètre critique lors d'études portées sur la cristallisation de substances actives, bien que celles-ci étaient hydrophobes et dans des solutions aqueuses avec ou sans co-solvant (Chen *et al.*, 2015; Leontiev and Lazovskaya, 2019).

Au niveau des résultats de biodistribution de l'acyclovir et du clotrimazole suite à l'expérience de perméation, il a été observé que globalement les quantités résiduelles de médicaments étaient faibles, mais, régies par les propriétés physicochimiques de la substance active et du pourcentage massique en organogélifiant pour l'acyclovir. Ainsi, l'hypoderme semblerait agir comme un réservoir pour les substances lipophiles. Ce type de phénomène a, par ailleurs, déjà été constaté pour les timbres transdermiques de fentanyl (Oosten *et al.*, 2016). L'augmentation du pourcentage massique en organogélifiant a également permis d'augmenter la quantité résiduelle d'acyclovir dans la peau. Ce phénomène peut être expliqué par la formation potentielle de micelle, le 12-HSA étant capable de former des micelles tout comme le Tween 80. Ces assemblages micellaires permettraient ainsi de mettre en place d'un système réservoir au sein de ce système pour les substances actives hydrophiles (Bhadani *et al.*, 2017; Fameau *et al.*, 2012).

Bien que les études de libération *in vitro* ne puissent pas refléter complètement les études *ex vivo*, le contrôle de certains paramètres (ex : type de membrane) facilite la compréhension mécanismes de relargage en substance active et améliore ainsi les prédictions de performance *in vivo*.

Il faut savoir également que l'acyclovir et le clotrimazole ont été sélectionnés comme deux molécules modèles, hydrophile et hydrophobe, respectivement. Mais, la conception d'un nouveau système d'administration pour la voie cutanée et à libération prolongée de ces deux substances actives présente aussi un réel intérêt pharmaceutique.

Le clotrimazole est l'un des premiers médicaments dérivés de l'imidazole utilisé comme antifongique topique à large spectre dans les cas de candidoses superficielles / mucocutanées (notamment celles vulvo-vaginales et oropharyngées), dermatophytoses (ex : pied d'athlète) et de pityriasis versicolore (mycose cutanée). En plus de son activité antifongique en ciblant la biosynthèse de l'ergostérol, il est devenu un médicament d'intérêt au niveau pharmacologique dans de nombreuses pathologies. En effet, au niveau de certains cancers (mélanome, glioblastome), il inhibe la prolifération de cellules cancéreuses. Mais, il agit aussi sur d'autres pathologies comme la drépanocytose en réduisant la déshydratation des érythrocytes ainsi qu'au niveau du paludisme en produisant des dommages à la membrane des parasites (Crowley and Gallagher, 2014). Cependant, il est présentement utilisé seulement en application topique en raison de sa faible biodisponibilité orale causée par une induction rapide et puissante des enzymes microsomaux hépatiques après une administration IV augmentant ainsi le métabolisme tout en abolissant son efficacité (Groll *et al.*, 1998). Pour les infections systémiques, d'autres antifongiques azolés sont utilisés, tel que le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole, mais un de leurs graves effets indésirables est qu'ils sont susceptibles d'avoir des interactions médicamenteuses en affectant plusieurs enzymes du cytochrome P450. Le clotrimazole possède donc une tolérance systémique favorable compte tenu que seulement 3 % de la dose initiale est absorbé quand il est administré par la voie vaginale (Mendling *et al.*, 2020).

L'acyclovir est un médicament antiviral nucléosidique utilisé comme agent pour traiter les infections causées par les virus de l'herpès simplex (herpès génital, encéphalite herpétique) et de la varicelle-zona (Taylor, 2021). Il est également employé dans certains cas « d'usage hors indication » pour traiter par exemple la nécrose rétinienne aiguë ou encore en prophylaxie après l'exposition à la varicelle chez les patients atteints de virus de l'immunodéficience humaine. En inhibant la synthèse et la réplication de l'ADN viral après sa conversion par les enzymes virales cellulaires (thymidine kinase) en forme active triphosphate, la résistance à l'acyclovir demeure un sujet de préoccupation chez les virus déficients en thymidine kinase (O'Brien and Campoli-Richards, 1989). L'emploi de l'acyclovir, tout comme le clotrimazole sous forme orale, est limité à cause de sa faible biodisponibilité (15 à 30 %). Il est en conséquence réservé seulement à des lésions au niveau cutané et muqueux (O'Brien and Campoli-Richards, 1989; Taylor, 2021). Sinon, il est administré par voie IV à débit constant (pour éviter les lésions rénales) en cas d'atteinte

disséminée, viscérale ou du système nerveux central pour des durées allant jusqu'à 10 jours (Taylor, 2021).

En ce sens, de rares études ont récemment investigué l'administration transdermique de clotrimazole ou d'acyclovir à partir de formulations cutanées conventionnelles (ex : suspensions, gel) et de vecteurs d'administration à base de lipides ou de tensioactifs (ex : éthosomes, liposomes, microémulsions). Les propriétés physicochimiques de ces molécules, dont leur solubilité dans l'eau et leur poids moléculaire, limitent leur administration cutanée. Ainsi, certaines infections demeurent profondément envahissantes et disséminées dans des couches profondes de la peau avec des efficacités limitées de la part de ces traitements. Ceci serait dû à leur libération topique essentiellement. L'efficacité de perméation du clotrimazole et de l'acyclovir à travers la peau de différentes formes pharmaceutiques en comparaison aux formulations d'organogels développées a été recensée dans le tableau S1 (annexe 2). Les formulations de ce projet de thèse sont comparables au niveau de la quantité de médicament totale ayant pénétré à travers la peau (en prenant en compte le pourcentage de médicament libéré par rapport à sa masse initiale) aux formulations d'éthosomes / liposomes ultradéformables pour le clotrimazole et aux liposomes élastiques pour l'acyclovir. Ces formulations sont donc aussi efficaces que des formulations utilisant des vecteurs d'administration comme promoteurs d'absorption. De plus pour toutes ces formulations, les quantités de médicaments ont été libérées sur un laps de temps plus court que pour les organogels, ce qui permet d'envisager une tolérance plus élevée à la substance active libérée grâce à cette libération prolongée.

Le développement d'un nouveau système d'administration de médicaments est donc sujet à une connaissance approfondie de son mécanisme de fonctionnement et de ces interactions en milieu biologique. Au vu des propriétés des organogels de 12-HSA et des mécanismes impliqués dans la libération de la substance active qui ont été mis en évidence dans ce projet en association aux connaissances actuelles dans la littérature, il est possible de mettre en lumière certains paramètres de leur composition pouvant s'adapter à l'application cutanée visée. Un certain équilibre entre les différents facteurs de formulation influençant à la fois l'efficacité et la toxicité du traitement est donc à trouver pour maximiser l'efficacité thérapeutique de la substance active en s'adaptant aux conditions physiopathologiques du patient tout en minimisant les effets

indésirables. Les principaux facteurs influençant la libération de substances actives à prendre en considération pour le système d'organogels basés sur le 12-HSA sont répertoriés dans le tableau S2 (annexe 2).

4.2.5 Les implants d'organogel présentent une cytotoxicité cellulaire plus élevée en augmentant la quantité de 12-HSA au sein du système

Dans un dernier temps, la toxicité des implants d'organogel développés vis-à-vis des cellules a été testée en tant que test de biocompatibilité. La biocompatibilité des systèmes de libération de médicaments dans un environnement ou un site spécifique de son hôte tend à évaluer la stabilité relative de ces matériaux sans rejet ou destruction par celui-ci. De plus, le matériau doit être tolérant envers tous les systèmes biologiques présents lorsqu'ils sont au contact avec l'hôte directement ou indirectement. Parmi les tests de biocompatibilité, le test de cytotoxicité est l'un des tests les plus utilisés pour évaluer les effets des matériaux sur la croissance cellulaire, la reproduction et au niveau morphologique. En outre, *in vitro* si une toxicité est avérée, cela peut se refléter *in vivo* par une irritation entraînant une inflammation locale (ex : nécroses ou encore des fibroses) et / ou des réactions systémiques comme par exemple des œdèmes (Weijia Li *et al.*, 2015).

Dans le cas des organogels, les composants qui diffusent dans l'environnement ou les produits de dégradation potentiels ont été évalués par un test d'extrait (ISO 10 993-5) sur des cultures de fibroblastes en monocouche de cellules en deux dimensions (2D) ou trois dimensions (3D). Le test de MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2H-tétrazolium) utilisé permet de mesurer l'activité métabolique des cellules pour tester le taux de croissance cellulaire et la toxicité au niveau des cellules. Il est basé sur la conversion d'un sel de tétrazolium jaune en cristaux de formazan cristallin violet par les déshydrogénases mitochondriales au contact de cellules viables, ce qui entrainera une corrélation proportionnelle entre l'absorbance mesurée et l'activité métabolique des cellules. Dans l'article 3.3, la viabilité cellulaire en fonction du pourcentage massique en 12-HSA des gels formés avec ou sans agent tensioactif a été évaluée sur une culture de fibroblastes de prépuce humain.

Plusieurs paramètres justifient le choix des fibroblastes, dont le fait premièrement que des réactions immunologiques ou des phénomènes d'encapsulation de matériaux par fibrose sont souvent observés au niveau des implants. Ce phénomène de fibrose se produit *via* la synthèse abondante de matrice extracellulaire par les fibroblastes (Witherel *et al.*, 2019). Deuxièmement, les fibroblastes sont retrouvés à la frontière du derme profond et de l'hypoderme et sont apparentés aux adipocytes dans le sens où des cellules souches mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux peuvent se différencier en cellules de type fibroblaste (similarité au niveau morphologique et expression des protéines de surface cellulaire) (Hu *et al.*, 2014).

Un autre paramètre important à considérer lors des tests de cytotoxicité est le modèle de culture utilisé. En effet, les tests cytotoxiques sont effectués sur les cultures 2D conventionnellement, cependant la prédictibilité des effets toxiques *in vivo* est généralement faible. L'utilisation d'une culture 3D permet d'augmenter la complexité du criblage de formulation (interaction cellules-cellules, cellules-matrice extracellulaire) et potentiellement la fiabilité des mesures cytotoxiques par la formation d'échafaudage poreux de matrice de collagène avec une large taille de pores et une porosité élevée. Ce type de matrice permet donc un transport efficace des fluides tout en conservant des propriétés mécaniques et adhésives pertinentes pour mimer l'environnement de la matrice extracellulaire de la peau (Huyck *et al.*, 2012).

Une première attention avant d'étudier la toxicité à l'échelle cellulaire doit être de prendre en considération les diverses études de toxicité rapportées dans la littérature sur les composants de notre système.

Le 12-HSA est un excipient commercialisé sous diverses formes (ex : Kolliphor HS 15, Kolliphor RH 40, Casid HSA) utilisées au niveau pharmaceutique notamment comme solubilisant non ionique, ainsi qu'en cosmétique comme tensioactif, émoullient et épaississant, mais pas encore approuvé comme additif alimentaire pour structurer les huiles (utilisation en cosmétique voir annexe 3). Il est donc retrouvé dans des médicaments à usage parentéral et oral commercialisés soutenant ainsi son profil de sécurité acceptable (Strickley, 2004). Désormais, son utilisation s'étend à la création d'échafaudages biocompatibles pour la culture cellulaire en association avec

l'huile de soja pour aider à la prolifération et colonisation des cellules de type fibroblaste d'ovaire de hamster chinois (CHO) (Lukyanova *et al.*, 2010).

La NMP est utilisée dans des formulations approuvées par la FDA et notamment au niveau des implants *in situ* se formant par inversion de phase avec un profil de sécurité acceptable jusqu'à certaines concentrations. Au niveau de la voie parentérale, sa dose létale médiane (DL₅₀) pour une injection IV chez le rat est de 2.4 g / kg sans aucune donnée de toxicité pour des administrations par voie IV et SC (Bartsch *et al.*, 1976). Les données toxicologiques sont souvent contradictoires, mais une inflammation locale et des irritations indésirables sont fréquemment rapportées au niveau des études *in vivo* (Kempe and Mäder, 2012). De plus, dans les études conduites par Windorf, l'étendue des dommages cellulaires dépendait de l'effet de la durée de l'exposition au NMP et de sa concentration. Selon leurs résultats, les valeurs de concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) s'élevaient à 0,5 % v/v pour une exposition de 48 heures et à 2 % v/v pour une exposition de 2 heures sur la lignée cellulaire de fibroblastes humains (CCD-18co) avec leurs trois tests de viabilité cellulaire (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Sulforhodamine B et résazurine) (Windorf *et al.*, 2017). Au niveau de l'implant commercialisé Eligard[®], pour une dose de substance active à 30 mg et 211,5 mg de polymère, une quantité de 258,5 mg de NMP est nécessaire pour solubiliser ces deux composés. L'utilisation d'un organogel comprenant une phase huileuse pour former le gel permet ainsi de diminuer la quantité de NMP injecté à la même masse de matériaux en prenant en compte le polymère et l'huile (24 mg dans notre cas pour un implant à 4 % m/m d'organogélifiant avec 12 % de NMP m/m). En outre, la biocompatibilité des implants d'organogel utilisant la NMP (3 % m/m d'huile de carthame) et des organogélifiants dérivés de la tyrosine a été rapportée chez les rats avec une inflammation chronique minime et légère après 70 jours d'implantation sous-cutanée (Bastiat *et al.*, 2010).

Le polysorbate 80, en tant que tensioactif non ionique, n'est pas un composé inerte et peut induire des dommages membranaires ainsi qu'initier l'apoptose (Hua *et al.*, 2018). Il a par ailleurs été impliqué dans l'apparition d'événements indésirables systémiques (réactions d'hypersensibilité) ainsi qu'au site d'injection et de perfusion (Schwartzberg and Navari, 2018). Cependant, ce tensioactif a montré la plus faible cytotoxicité dans des cultures de fibroblastes humains avec une LC₅₀ de 210 µg/mL (test de MTT) par rapport à d'autres tensioactifs non ioniques

(Tween 60, Triton X-100) , anioniques (Texapon N40, Texapon K1298) et cationiques (chlorure de benzéthonium) (Arechabala *et al.*, 1999). Mais ces valeurs de viabilité cellulaire sont dépendantes de la dose, du temps de contact et dépendent également de la lignée cellulaire utilisée (Dirain *et al.*, 2019). Dans la base de données de la FDA, son activité maximale, qui est la quantité la plus élevée de l'excipient par dose unitaire dans chaque forme posologique dans laquelle il est utilisé et répertoriée dans la liste IID, est de 0.3 % m/v en injection SC.

Dans notre étude, l'influence de la composition et du pourcentage massique en organogélifiant a été observée au niveau des cultures 2D et 3D de fibroblastes. Les valeurs de concentration efficace médiane (EC₅₀), correspondant à la concentration de tolérance critique inhibant 50 % de la viabilité cellulaire qui peuvent aider à prédire la dose de départ pour les tests de létalité aiguë *in vivo*, ont été déterminées. Les valeurs d'EC₅₀ organogels à base de 12-HSA et de 12-HSA avec le tensioactif (Tween 80) ont été estimés à 1,5 et $5,3 \times 10^{-2}$ M pour les cultures cellulaires 2D et 0,8 et $6,3 \times 10^{-2}$ M, respectivement, pour les cultures matricielles 3D (chapitre 3.2). Comme mise en évidence par Huyk *et al.*, les sensibilités des formulations au niveau des valeurs d'EC₅₀ ne sont pas forcément identiques et dépendent du composé testé (Huyck *et al.*, 2012). Ces différences peuvent être expliquées par la configuration de la couche cellulaire compatible avec des mesures d'invasion et de prolifération qui peut être déterminée par conséquent de façon plus fiable et qui vont influencer la cytotoxicité des gels au contact des cellules (Huyck *et al.*, 2012). De plus, les valeurs d'EC₅₀ augmentent avec l'ajout de Tween 80 dans le système, ce qui est étonnant compte tenu de sa cytotoxicité avérée pour de telles concentrations (~22 % m/v dans le gel). Avec une concentration supérieure à la concentration micellaire critique du polysorbate 80 (~10 fois, avec une concentration micellaire critique de 0,014 à 40 °C) (Al-Koofee, 2013)), il se pourrait que les agrégats micellaires formés par le Tween 80 aident à solubiliser l'huile avec le 12-HSA et ne se retrouvent pas dans l'extrait prélevé en phase aqueuse, filtré et testé sur les cellules.

En comparaison avec les implants d'organogel étudiés par Windorf qui étaient composés de 12-HSA jusqu'à 6 % m/m, d'huile d'arachide et de NMP jusqu'à 14,3 % m/m, nos résultats paraissent contraires à leurs conclusions. En effet, selon leurs conclusions, leurs formulations sont considérées comme non-toxiques suite à leur test de cytotoxicité cellulaire à la Sulforhodamine B.

Ce test repose sur un mécanisme différent par rapport au MTT dans le sens où la viabilité cellulaire est proportionnelle à la capacité de la Sulforhodamine B à lier les composants protéiques cellulaires contrairement au MTT qui utilise l'activité métabolique des cellules. Par ailleurs, il est considéré comme un test plus fiable pour évaluer la viabilité cellulaire avec une meilleure linéarité et sensibilité sur une variété de lignées cellulaires que le test de MTT (MTS utilisé dans nos tests est le « test MTT en une étape ») (Keepers *et al.*, 1991; van Tonder *et al.*, 2015). De plus, leurs organogels à 6 % m/m (correspondant à une concentration molaire de $10,2 \times 10^{-2}$ M dans notre cas) ont été évalués une fois formés (la NMP ayant totalement diffusé) comme dans notre étude après 24 heures. La cytotoxicité plus élevée des organogels en fonction de l'augmentation du pourcentage massique en 12-HSA dans nos études peut être alors être expliqué à cause de l'huile minérale utilisée. En effet, l'huile minérale demeure un sujet de préoccupation chez les hommes notamment qui l'utiliserait en injection IM pour un rehaussement esthétique des membres supérieurs ainsi qu'au niveau de son accumulation dans l'organisme après administration orale, topique ou transdermique. L'huile minérale a une activité maximale de 162 mg / dose unitaire (film à libération prolongé) après administration transdermique, à ce jour dans la base de données de la FDA. L'huile minérale peut en outre provoquer des lésions granulomateuses, des ulcérations, une migration erratique de l'huile, une embolie pulmonaire après injection IM ou encore des granulomes dans le foie après une administration orale (Cravedi *et al.*, 2017; Nash *et al.*, 1996; Sisti *et al.*, 2020). Au niveau des résultats des tests de cytotoxicité rapportés dans la littérature, l'huile minérale chez une lignée de CHO a montré une diminution la croissance cellulaire à partir d'une concentration de 0,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ([European chemical agency](#)). Néanmoins, celle-ci est largement utilisée pour recouvrir les milieux de culture d'embryons, et bien que celle-ci soit sensible à la photooxydation et la peroxydation, aucun impact sur la qualité des embryons jusqu'à 3 jours n'a été observé (Labied *et al.*, 2019).

Au vu de ces résultats, le choix de la composition est donc crucial pour garantir l'innocuité de ce système qui est prometteur pour la délivrance de médicaments. Des expérimentations complémentaires sont donc nécessaires à deux niveaux. Tout d'abord, il faudrait utiliser une huile plus biocompatible, respectueuse de l'environnement, et non dérivée des animaux. Par exemple, une huile végétale pourrait être utilisée en substitution à l'huile minérale légère tout en étant vigilant à la polarité relative des huiles qui impacte le mécanisme de gélation (Lan and Rogers,

2015). Ensuite, il serait pertinent d'examiner la possibilité de l'induction de l'inflammation : *in vitro* des organogels en utilisant une co-culture fibroblastes / macrophages et *in vivo* suite à une exposition de courte et longue durée des implants. Ceci pourrait avoir, en effet, un impact notamment au niveau de la durée de vie de l'implant.

4.3. Les microaiguilles polymériques solubles dans l'eau pour l'administration de GHRP-6

La conception de timbres de microaiguilles pour la délivrance transdermique de médicaments est un processus complexe qui demande un équilibre entre la composition des polymères et le procédé de fabrication. Les microaiguilles produites doivent donc posséder des caractéristiques adaptées pour permettre l'administration de médicaments en clinique et leur commercialisation ultérieure, telles que : (i) une insertion dans la peau efficace des microaiguilles et relativement indolore, (ii) une résistance des matériaux à la rupture pour éviter les bris d'aiguille dans la peau, (iii) un dispositif limitant les fuites de substance active à l'extérieur de la peau, (iv) l'administration rapide de médicaments avec un profil pharmacocinétique adapté pour obtenir des résultats cliniques souhaitables et (v) faciliter l'auto-administration des soins par le patient.

Dans la plupart des articles, ces dispositifs se solubilisant dans la peau sont fabriqués par micro-moulage, une technique simple qui consiste à remplir le moule avec la matrice de polymère par centrifugation et / ou sous vide, ce qui peut nécessiter plusieurs étapes dépendamment de la technique utilisée. Néanmoins, un des objectifs pour permettre une fabrication à l'échelle industrielle des timbres de microaiguilles est d'utiliser une méthode de fabrication qui soit simple, rapide, efficace pour administrer la substance active et peu coûteuse. La fabrication des microaiguilles s'est donc effectuée par la coulée directe du pré-mélange de la solution de médicament et du polymère dans des moules de PDMS pour obtenir des timbres de 10 x 10 de microaiguilles de forme pyramidale à base carrée avec une hauteur de 800 μm et de 500 μm . Ce choix s'est fait en raison que ce type de fabrication permet d'assurer une diminution des étapes de fabrication comparée à des procédés sans pré-mélange ou qui utilise la centrifugation (Chu *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2018) (annexe 1 / figure S1).

Ces microaiguilles peuvent être produites à partir d'une large variété de polymères. La polyvinylpyrrolidone (PVP) et l'alcool polyvinylique (PVA), deux polymères biocompatibles approuvés par la FDA, ont été choisis comme matrice d'étude en raison de leurs divers avantages comme (i) leur solubilité dans l'eau, (ii) leur biodégradabilité pour le PVP (rapide élimination par les reins pour un poids moléculaire < 20 kDa), (iii) leur faible coût et (iv) pour leur association permettant d'atteindre une certaine résistance mécanique pour pénétrer la peau avec des hauteurs de microaiguilles et des profils de libération de médicaments contrôlables (Chen *et al.*, 2017; Guillot *et al.*, 2020; He *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019). L'association PVA/PVP a par ailleurs été employée pour formuler des microaiguilles permettant le suivi de la glycémie et la libération d'insuline, pour augmenter l'activité antibactérienne de la bésifloxane pour le traitement des infections oculaires, ainsi que pour le transport de nanoparticules photothermiques et / ou de médicaments anticancéreux dans le cas d'un traitement antitumoral contre la lignée de cellules de carcinome mammaires murins (4T1) (Guillot *et al.*, 2020; He *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019). La solubilité du PVP à température ambiante facilite sa préparation sans avoir besoin de solvant organique, tandis que la solubilité du PVA totalement hydrolysé nécessite l'emploi de haute température (Deshmukh *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2015). De plus, afin d'augmenter la flexibilité de la suspension et abaisser la température de transition vitreuse (T_g), l'emploi de plastifiants (ex : citrate de triéthyle / triméthyle) ou des températures élevées sont quelques fois requis pour le procédé de micro-moulage (Kim *et al.*, 2018; Moga *et al.*, 2013). Ceci peut par ailleurs constituer une contrainte notamment pour les médicaments sensibles à la température. Néanmoins, il a été observé qu'à mesure que la vitesse de traction augmente, la tension de surface et la viscosité des solutions diminuent et permettent ainsi d'augmenter le chargement de médicaments dans le système (Hsiao, 2019). L'ajustement de la pression négative sous vide à -100 KPa dans nos travaux a donc été un bon compromis pour maintenir la fabrication des microaiguilles à température ambiante tout en conservant des conditions douces pour maintenir l'activité biologique de la substance active tout au long du procédé.

Un des points essentiels de ce projet était l'utilisation des microaiguilles pour administrer un peptide modèle, le GHRP-6. Ce peptide a été choisi comme peptide modèle des dérivés d'azapeptides de GHRP-6 qui ont émergé afin de maintenir une bonne affinité et une sélectivité accrue envers le récepteur CD36 par rapport au récepteur GHS-R1a (Proulx *et al.*, 2012). En effet,

grâce à l'interaction du CD36 avec ces divers ligands, celui-ci peut moduler de multiples processus physiologiques et pathologiques tels que l'immunométabolisme des macrophages et la sécrétion de cytokines pro-/anti-inflammatoires. Ce rôle clé a, par ailleurs, été mis en évidence dans la prévention et la gestion de maladies chroniques inflammatoires comme l'athérosclérose (Fréreau *et al.*, 2020).

De plus, le GHRP-6 est l'un des membres de la famille des GHRPs (*growth hormone-releasing peptides*) qui libère l'hormone de croissance, et, en tant que tel, présente lui-même aussi un intérêt thérapeutique. Avec un profil d'innocuité favorable et un large éventail d'effets pharmacologiques découverts en préclinique, le GHRP-6 nourrit l'enthousiasme des recherches notamment comme candidat cardio- et cytoprotecteur potentiel au niveau de plusieurs axes de développement clinique (Berlanga-Acosta *et al.*, 2016). Cependant, les médicaments peptidiques possèdent une faible biodisponibilité orale causée principalement par une faible absorption épithéliale et sont soumis à un effet de premier passage hépatique élevé (faible pH et digestion enzymatique). En conséquence, ils sont souvent administrés par voie parentérale. Mais, cette voie invasive peut provoquer de la douleur et être très traumatisante notamment chez les enfants. De plus, la courte demi-vie plasmatique (quelques minutes) des peptides non-conjugués requiert des administrations plus fréquentes pour atteindre le bénéfice thérapeutique escompté (Di, 2015). La technologie de microaiguilles pourrait donc offrir une application des plus prometteuse en perçant la barrière du *stratum corneum* tout en s'affranchissant de l'exposition au tractus gastro-intestinal et des problèmes liés à la douleur ou à la sécurité associée aux aiguilles.

4.3.1 L'augmentation de la hauteur des microaiguilles accroît l'efficacité d'encapsulation du GHRP-6 dans la pointe des aiguilles

Un accent particulier a ensuite été porté sur l'évaluation du taux de chargement du GHRP-6 (poids moléculaire = 873 Da). L'évaluation de l'encapsulation du GHRP-6 dans le système est d'autant plus importante pour réduire les pertes liées à la fabrication et qu'une faible encapsulation de la substance active entrainera une mauvaise biodisponibilité de la substance active et donc de son efficacité thérapeutique. Dans ce processus de fabrication, le médicament a été pré-mélangé avec la solution de polymère pour assurer une distribution uniforme du médicament et cette

suspension a été chargée sélectivement dans les microaiguilles pour éviter un gaspillage de grandes quantités de GHRP-6 dans le support. Ce type de procédé utilisé par d'autres groupes de recherche a en effet eu un impact positif au niveau de la production des microaiguilles avec des pointes d'aiguille plus homogènes au niveau de la distribution du médicament par aiguille tout en réduisant les pertes de substance active pendant la fabrication (Chu *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). Dans notre étude, le taux de charge médicamenteuse dans les timbres était de $8 \pm 3 \%$ pour les timbres de hauteur de 800 μm et de $4 \pm 1 \%$ pour les timbres possédant une hauteur de 500 μm par rapport à la quantité initiale de GHRP-6 utilisée (annexe 1 / figure S2). Bien que le procédé génère beaucoup de perte de médicament, ces résultats semblent en accord avec ceux obtenus par Chen *et al.* rapportant un taux de chargement de 5 % pour la goséréline (masse initiale de 1,5 mg) (Chen *et al.*, 2017). En effet, en raison de la viscosité élevée, il demeure difficile de récupérer la substance active résiduelle sur le moule ou ayant séchée durant le procédé de remplissage sous vide. De plus, il est intéressant de noter que l'augmentation du taux de chargement en peptide dans les microaiguilles était dépendante du volume de la cavité pour les deux hauteurs d'aiguilles de 800 et 500 μm de 1.1 μL et 0.7 μL , respectivement. Ce constat rejoint les observations Chu *et al.* qui ont augmenté la capacité de chargement des microaiguilles en augmentant le volume de la cavité de chaque moule de microaiguilles employé (Chu *et al.*, 2010).

Bien que de nombreux avantages sont attribués aux microaiguilles se dissolvant dans la peau pour la délivrance de macromolécules comme la fabrication simple, peu coûteuse et la réduction des déchets médicaux au niveau du timbre en lui-même; ces avantages sont contrebalancés par la limite du développement de telles formulations notamment en laboratoire. En effet, certaines limites ont pu être mises en évidence dans notre système de microaiguilles, comme rapportées dans la littérature (Kim *et al.*, 2018; Ramadon *et al.*, 2021). D'une part, au niveau des quantités limitées de GHRP-6 chargé dans le système. D'autre part, au niveau de la perte de ce dernier pendant le procédé de fabrication à cause de la pression externe négative nécessaire à l'écoulement des suspensions de polymère (séchage) et des solutions très concentrées en substance active appliquées compte tenu du volume de la cavité de chaque microaiguille. Par ailleurs, les mêmes contraintes au niveau de l'encapsulation du médicament sont retrouvées au niveau des systèmes nanoparticulaires.

D'autres méthodes de fabrication de microaiguilles auraient pu être envisageables pour surmonter la faible capacité de chargement de médicament comme, par exemple, en utilisant des microaiguilles formant un hydrogel. Mais, la préparation de ce système est plus chronophage que les précédentes microaiguilles développées en raison de la préparation additionnelle d'un réservoir contenant la substance active et de la réticulation du polymère physique ou chimique. De plus, les microaiguilles formant un hydrogel permettent un relargage moins rapide en substance active en raison de la relaxation des chaînes polymères contrôlant la diffusion de la substance active (Turner *et al.*, 2021). Néanmoins, l'automatisation du procédé de fabrication des microaiguilles de par les progrès liés à l'impression 3D demeure une des meilleures solutions pour éviter la perte du médicament pendant le procédé. Ceci permettrait d'autant plus d'assurer la reproductibilité des propriétés mécaniques et la distribution uniforme du médicament pour une industrialisation facilitée de ce dispositif (Elahpour *et al.*, 2021). Bien que cette technologie est prometteuse en tant que technique rapide, évolutive et économique, elle reste limitée de par les matériaux pouvant être utilisés qui doivent être à la fois biocompatibles et imprimables (Elahpour *et al.*, 2021; Mao *et al.*, 2020).

4.3.2 Un faible ratio d'aspect (i.e, 2-3) et un rapport massique de PVP:PVA de 1:1 sont des conditions favorables à l'insertion efficace des microaiguilles pyramidales dans la peau

Un autre critère important dans la conception des microaiguille est l'aspect géométrique de la pointe des aiguilles. En effet, diverses études ont déjà fait état de son implication notamment au niveau de l'efficacité d'insertion des microaiguilles dans la peau et dans la douleur ressentie lors de l'insertion du dispositif. La dimension de chaque microaiguille et du réseau formé dans le timbre doit être par conséquent appropriée pour répondre adéquatement aux critères mentionnés précédemment.

Dans notre étude, la sélection de moules à forme pyramidale à base carrée s'est faite tout d'abord selon les études précédentes ayant rapporté que la résistance des microaiguilles pyramidales était plus élevée que les microaiguilles de type conique ayant un rapport hauteur/largeur plus élevé (Lee *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2017). Cette remarque est d'autant plus

pertinente que les polymères utilisés pour les microaiguilles se dissolvant dans la peau ont une résistance mécanique plus faible. Cependant, la dernière étude de Li *et al.* semble nuancer ces observations théoriques, car ils ont démontré qu'avec un angle au sommet et un rapport hauteur / largeur similaire, les microaiguilles pyramidales rectangulaires avaient une pénétration réduite dans la peau de rats en raison de leur hauteur d'aiguille plus petite (Li *et al.*, 2020). Un deuxième critère important à prendre en compte pour satisfaire les critères de résistance mécanique et l'efficacité de libération en substance active des microaiguilles est le rapport massique des deux polymères. En effet, le mélange entre la PVP K-12 (poids moléculaire = 3500-7000 Da) et le PVA (poids moléculaire = 10 000 Da) dans un rapport 1 :1 s'est avéré avoir un temps de séchage plus rapide que la PVP seule (< 3 jours) tout en produisant des microaiguilles gardant leur netteté d'origine et uniformité par rapport à leur moule d'origine. Babity *et al.* étaient par ailleurs arrivés aux mêmes conclusions au niveau de leurs microaiguilles de PVA / PVP dans ces mêmes conditions (rapport massique et poids moléculaires de PVA et PVP équivalent) (Babity *et al.*, 2020). De plus, selon les études de Lee *et al.*, les microaiguilles possédant un rapport massique de PVP / PVA de 1 :1 dans leurs microaiguilles (poids moléculaire du PVA et PVP = 10 000 Da) étaient les plus résistantes à l'insertion comparée aux microaiguilles avec une proportion en PVP plus élevée. Ceci leur a permis par la suite d'augmenter la libération de rhodamine (sonde fluorescente) ou de BSA-FITC encapsulées dans leurs microaiguilles après insertion de leurs timbres dans la peau de porc (Lee *et al.*, 2015)

Les dimensions détaillées de chaque timbre de microaiguilles mesurées par images de stéréomicroscopie sont présentées en annexe 1 / figure S2. Alors que les dimensions de base étaient, pour les deux microaiguilles, de 500 et de 800 μm situées entre $\pm 10\%$, la hauteur des microaiguilles a subi des pertes de 13 et 18 %, respectivement par rapport au moule d'origine. Ce phénomène a par ailleurs, déjà été observé précédemment dans les études de Babity *et al.*, qui ont attribué cette perte vraisemblablement à la perte en eau pendant le processus de séchage à cause de l'effet de l'humidité et du flux d'air sur le rétrécissement des microaiguilles (Babity *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2012). De plus, nos résultats au niveau des rapports d'aspects des microaiguilles étaient en accord avec ceux obtenus par Lee *et al.* qui ont obtenu 100 % d'insertion pour leurs microaiguilles de PVP-PVA (rapport massique de 1 :1). Les résultats de notre étude sont également en accord avec l'étude précédente de Lee *et al.* qui affirmait qu'une base relativement

large (c'est-à-dire 300 μm) et un petit rapport hauteur (c'est-à-dire 2) des microaiguilles de forme pyramidale peuvent contribuer à l'insertion (Lee *et al.*, 2008).

En continuité avec les analyses de géométrie, les performances mécaniques des microaiguilles les moins résistantes mécaniquement de 800 μm (ratio d'aspect le plus élevé) ont donc été réalisées pour évaluer leur résistance mécanique à pénétrer la peau (unité en N, newton). Les forces de compression tolérées étaient supérieures à 0,15 N / aiguille. Compte tenu des études cliniques de Hirobe *et al.*, celles-ci sont donc considérées comme étant capables de pénétrer la peau (annexe 1 / figure S3) (Hirobe *et al.*, 2015). Toutefois, afin de déterminer si les timbres étaient capables d'être insérés efficacement dans la peau, ils ont été appliqués par compression dans la peau de porc. Ces microaiguilles étaient chargées de Cy5 (poids moléculaire = 519 Da) en tant que molécule modèle pour démontrer également si les microaiguilles étaient capables de charger et libérer des substances de divers poids moléculaires. Le Cy5 a été sélectionné en raison de son faible coût, sa disponibilité, sa solubilité dans l'eau améliorée et ses propriétés de fluorescence proches de l'infrarouge utilisées notamment dans le domaine de l'imagerie biomédicale ($\lambda_{\text{excitation}}$ / $\lambda_{\text{émission}}$ 649/670 nm) (Chang *et al.*, 2019). Les microaiguilles ont été imagées par stéréomicroscopie à fluorescence, ce qui nous a permis de confirmer la présence du Cy5 dans la pointe de l'aiguille grâce au procédé de fabrication. Bien que 90 ± 6 % des microaiguilles aient pénétré la peau, 57 ± 21 % du Cy5 encapsulé a été introduit dans la peau (annexe 1 / figure S4). Cette variabilité plus élevée au niveau du pourcentage de substance active libérée peut être expliquée par la méthode appliquée pour ce calcul basé sur l'étude de Li *et al.* (Li *et al.*, 2019). En effet, la mesure de la fluorescence en surface peut varier selon la géométrie des aiguilles surtout si celles-ci sont cassées post-insertion, ce qui contribue à augmenter la quantité de la sonde fluorescente (quantifiée en intensité de fluorescence, unités arbitraires) dans le support. De plus, les coupes histologiques ont montré la présence du Cy5 à l'interface entre l'épiderme et le derme supérieur, ce qui confirme que ces dispositifs sont capables de s'affranchir de la barrière du *stratum corneum* (annexe 1 / figure S4).

L'ensemble de ces résultats au niveau de la capacité du dispositif à pénétrer la peau et à encapsuler des médicaments de différents poids moléculaires a donc pu montrer que ces dispositifs de microaiguilles sont donc favorables à une analyse *ex vivo* et *in vivo* par la suite.

4.3.3 Les timbres de microaiguilles de 800 µm augmentent la libération du GHRP-6 après 24 h post-application comparativement aux aiguilles plus courtes de 500 µm

Par la suite, la pénétration cutanée du GHRP-6 a été évaluée à partir des microaiguilles de deux hauteurs différentes (500 et 800 µm). Il n'existe à ce jour que de rares études concernant l'application des microaiguilles pour l'administration de peptides et encore moins qui évaluent systématiquement la quantité de substance active ayant diffusé à travers la peau dans des études *ex vivo*. L'efficacité de libération des peptides employés à travers la peau a donc été comparée à notre système de microaiguilles développé pour libérer le GHRP-6 (tableau S3, annexe 2). À cette fin, des méthodes analytiques sensibles et validées ont été développées pour quantifier le GHRP-6 dans différentes matrices par UPHLC/MS-MS (peau, plasma, microaiguilles). Il a été remarqué que dépendamment de la complexité de la matrice, différentes étapes de préparation sont nécessaires et que quelquefois les effets de matrice ne peuvent être corrigés sans l'emploi de courbes de calibration correspondantes en matrice et d'un étalon interne adapté. En effet, cette technique permet de compenser les effets de matrice dans l'échantillon (la matrice doit être facilement accessible) tout en évitant de démultiplier les étapes d'extraction et de lavages qui peuvent prendre du temps et causer des pertes de l'analyte étudié (Cortese *et al.*, 2020).

Les résultats de perméation cutanée des deux timbres de microaiguilles développés sont comparables aux formulations de microaiguilles libérant les tétrapeptide-3 (Gly–Gln–Pro–Arg, poids moléculaire = 457 Da) et hexapeptide (Val–Gly–Val–Ala–Pro–Gly, poids moléculaire = 499 Da) de faible poids moléculaire (en prenant en compte le pourcentage libéré par rapport à la masse initiale). Or, nos formulations contiennent du GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂, poids moléculaire = 873 Da) et se rapprochent plus en termes de poids moléculaire du peptide acétyl-hexapeptide-3 (AC–Glu–Glu–Met–Gln–Arg–Arg–NH₂, poids moléculaire = 889 Da) (Zhang *et al.*, 2014).

Les microaiguilles testées de 500 µm et surtout celles de 800 µm se dissolvant dans la peau permettraient donc une meilleure performance de perméation en peptide de haut poids moléculaire que les microaiguilles solides en se basant sur ce critère exclusivement. Néanmoins, il faut aussi

considérer que d'autres critères physicochimiques peuvent influencer la perméation de substance active.

Un des premiers critères est le temps d'administration. En effet, les microaiguilles solides de l'étude de Zhang *et al.* ont été appliquées 20 secondes en prétraitement avant le dépôt de la substance active dans le compartiment donneur. Tandis que les microaiguilles de polymères que nous avons développés ont été appliquées sur la peau pendant les 24 heures d'expérimentation afin de s'assurer de la solubilisation totale de toutes les microaiguilles. De plus, dans le cas des microaiguilles solides, le temps de fermeture de la peau après traitement par microaiguilles est à prendre en compte qui est de 2 heures sans occlusion indépendamment de la géométrie des aiguilles chez l'homme (Gupta *et al.*, 2011). Après fermeture, la diffusion se fait exclusivement par diffusion passive, ce qui est limité chez les peptides dans le cas d'une administration transdermique. Ce facteur a donc pu être critique dans le cas de leur étude.

Un deuxième critère repose sur les propriétés physicochimiques des peptides qui influencent l'absorption cutanée en plus du poids moléculaire (degré d'ionisation, coefficient de partage, interactions inter- et intramoléculaires) après l'étape de libération de leur véhicule. En effet, le GHRP-6 possède une hydrophilie moyenne de -1,2 (charge nette à pH 7 de 2.1) en grande partie dû aux groupements tryptophane alors que leur peptide acétyl-hexapeptide-3 possède une hydrophilie moyenne de 1.8 (charge nette à pH 7 de 1.0) dû à leurs résidus glutamine et arginine. En sachant que la peau est construite d'une alternance de structure à prédominance lipophile (*stratum corneum*, hypoderme) et hydrophile (épiderme viable, derme), les propriétés physicochimiques du GHRP-6 semblent lui conférer un certain avantage *vis-à-vis* de l'acétyl-hexapeptide-3.

Finalement, un des derniers critères est le mécanisme de libération de la substance active. Dans le cas des aiguilles se dissolvant dans la peau, la PVP se dissout en premier, ce qui permet dans un premier temps de libérer une partie de la substance active encapsulée. Dans un deuxième temps, le gonflement du PVA contribue à prolonger la libération de la substance active. Ce mécanisme de libération est donc dépendant du poids moléculaire de la substance active dans le réseau de maille formé par le PVA (Lee *et al.*, 2015). Pour les microaiguilles solides, le flux de

diffusion de la substance active dépend du temps d'ouverture des canaux formés lorsque la peau est percée par les aiguilles. Cependant, la libération de la substance active peut être prolongée par l'occlusion de la peau (Makvandi *et al.*, 2021).

4.4. Systèmes d'administration de médicaments invasifs et minimalement invasifs : entre efficacité et innocuité

Le développement de nouvelles formulations de microaiguilles pour l'administration transdermique de peptides et d'organogels injectables pour l'administration parentérale d'agents thérapeutiques est soumis à une étude extensive des paramètres de formulation influençant à la fois leur efficacité et toxicité. Ces différentes formulations doivent donc surmonter les limitations des systèmes d'administration transdermiques et parentéraux actuels au niveau de : (i) la douleur à l'injection, (ii) la fabrication qui doit être simple, peu coûteuse et transposable à l'échelle industrielle, (iii) la stabilité physicochimique et biologique des formulations, ainsi que de la substance active (ex : structure secondaire, agrégation et activité biologique) et (iv) l'amélioration de la biodisponibilité, de l'observance du patient et de la sécurité associées au traitement. Les avantages et les inconvénients de ces systèmes selon leurs propriétés déterminées dans ce projet et les connaissances actuelles sont résumés dans le tableau S4 (annexe 2).

Si l'objectif final est une administration par injection rapide, le système de microaiguilles se dissolvant dans la peau sera plus approprié. En effet, le flux de libération du médicament peut être ajusté selon la conception du système en encapsulant la substance active dans la couche de support (libération retardée) ou dans les pointes de microaiguilles (libération rapide immédiate \leq 1h). De plus, le temps de dissolution de chaque microaiguille peut être prolongé en augmentant la concentration en polymère ou en optant pour des polymères hydrosolubles, mais ayant une solubilité dans l'eau moins élevée que d'autres polymères (ex : amylopectine au lieu de la carboxyméthylcellulose) (Lee *et al.*, 2008). Également, si de plus fortes doses en substance active sont nécessaires, la géométrie des microaiguilles peut être modifiée pour avoir un volume de cavité de chaque microaiguille plus élevé (augmentation de la hauteur ou de la base des pointes). Mais, ces modifications sont limitées à l'effet de « bed nails » et à la douleur ressentie dans le cas de hauteur d'aiguille plus grande donc dans ce cas-ci une autre solution serait d'augmenter le nombre

de microaiguilles par timbre (Makvandi *et al.*, 2021). Dans certains cas comme la vaccination, l'usage de microaiguilles peut s'avérer d'autant plus utile que seulement de faibles doses sont nécessaires pour enclencher une réponse immunitaire rapide et robuste en comparaison à des injections standards par voie IM (Prausnitz *et al.*, 2009). Ceci est dû notamment à la présence du système immunitaire dans le derme.

Mais, si le but est une administration prolongée, le système d'organogel formant un implant *in situ* serait nécessaire en raison de leur stabilité en milieu biologique, leur force de résistance à la déformation (ex : cisaillement, température), et leur structure facilitant la faible adhésion de l'eau en surface contrairement au système d'hydrogel. De plus, comparativement aux microaiguilles se dissolvant dans la peau, le problème du taux de chargement en substance active dans le cas de ce système est négligeable. Cet implant gélifié à libération prolongée est néanmoins contrôlé par divers facteurs affectant la libération de la substance active chargée dans l'implant (tableau S2, annexe 2).

4.5. Perspectives

De nombreuses perspectives de recherche peuvent être proposées à la suite de cette thèse, d'une part, au niveau de l'évaluation de l'efficacité thérapeutique des formulations développées, et d'autre part, au niveau l'innocuité de ces systèmes.

4.5.1. Efficacité thérapeutique des formulations

Implant d'organogel se formant *in situ* :

Tout d'abord, d'un point de vue physicochimique, il est important d'approfondir les connaissances sur la structure des organogels formés selon leur composition (pourcentage massique en organogélifiant, type d'huile utilisé et ajout / pourcentage massique en tensioactif) et selon les propriétés physicochimiques de la substance active dans le système. Pour étudier ces facteurs à plusieurs niveaux, la microstructure des organogels pourrait donc être étudiée par des images de microscopie à force atomique et de microscopie électronique à balayage, en parallèle, d'expériences utilisant la diffraction des rayons X pour étudier plus en profondeur les structures d'assemblage d'organogels. Les interactions supramoléculaires régissant l'assemblage du système (hydrogène, empilement π - π) peuvent être mises en évidence par la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) en complément de la spectroscopie infrarouge. De plus, il serait également intéressant de vérifier dans quelle mesure les propriétés rhéologiques sont impactées par l'encapsulation de la substance active et si celle-ci, une fois libérée du système, conserve sa structure chimique et son activité biologique. Finalement, comme les mécanismes de dégradation *in vitro* ne reflètent qu'une infime partie des phénomènes se produisant *in vivo*, des études *in vivo* pourraient être menées afin de surveiller les mécanismes de dégradation de l'implant en utilisant par exemple l'imagerie par résonance magnétique. En effet, cette technique est adéquate pour surveiller le volume de l'implant, les variations au niveau de la forme de l'implant ainsi que pour localiser les éventuels dommages aux tissus ou une inflammation autour de l'implant.

Microaiguilles se dissolvant dans la peau :

Au vu des résultats encourageants de la libération du peptide GHRP-6 *ex vivo*, les perspectives de recherche concerneraient l'étude de la PK du GHRP-6 et des azapeptides administrés par les microaiguilles comparativement à une injection SC ou IV. Les dosages de peptides seraient effectués par la méthode développée par UHPLC/MS-MS. Des ajustements pourraient être nécessaires (préparation des échantillons, réglages des paramètres UHPLC et MS/MS) pour les azapeptides, bien que leurs structures soient dérivées du GHRP-6. Afin d'atteindre une libération prolongée du traitement, le peptide peut être inséré également dans le support. En effet, en insérant la substance active dans le support du timbre (mélange polymère et GHRP-6), la libération du peptide dépendra également de la vitesse de gonflement du polymère en surface, ce qui peut prendre plusieurs heures. D'autre part, des études de biodistribution du GHRP-6 ou des azapeptides marqués au sulfo-Cy5 permettraient de compléter l'étude PK grâce à un suivi de la sonde avec un système d'imagerie *in vivo* et un dosage des peptides marqués dans les organes des souris sacrifiées. Un système d'imagerie *in vivo* comme le système IVIS[®] Spectrum pourrait être utilisé à cet effet. Dans une plus large mesure, ces résultats pourront être transposés à l'étude de ce nouveau système d'administration dans la gestion de l'inflammation chronique, comme dans le cas de l'athérosclérose. Le modèle d'étude de souris déficientes en apolipoprotéine E serait, dans ce cas-ci, utilisé pour évaluer le gain en termes d'efficacité du traitement peptidique par microaiguilles pour diminuer les lésions d'athérosclérose comparativement à des injections SC conventionnelles. Dans une approche plus tournée vers l'application clinique des microaiguilles, il serait pertinent d'évaluer l'efficacité de libération de substance active en fonction de l'état pathologique de la peau qui peut varier selon les patients.

Dans une perspective d'association des deux systèmes, une combinaison de microaiguilles se dissolvant dans la peau encapsulant des nano-organogels serait prometteuse notamment pour administrer des substances actives lipophiles. Ainsi, ce type de système permettrait à la fois de charger de hautes doses en substance active et d'atteindre une libération prolongée des nano-formulations dans la peau qui seront ensuite absorbées par la microcirculation sanguine cutanée.

4.5.2. Inflammation / toxicité des formulations

Implant d'organogel se formant in situ :

Sachant que la dégradation de l'implant est conditionnée par sa biocompatibilité *in vivo*, des études complémentaires seraient requises. D'une part, l'évaluation de la biocompatibilité *in vitro* des implants d'organogel utilisant le 12-HSA pourrait être étayée en utilisant des huiles biocompatibles utilisées dans des solutions huileuses injectables (ex : huile de sésame, huile de soja). Ceci permettrait de s'assurer de la biocompatibilité du système pour des valeurs en pourcentage massique de l'organogélifiant plus élevée *in vitro*, en utilisant des études de cytotoxicité et en évaluant le potentiel pro-inflammatoire des implants (modèle de co-culture fibroblastes / macrophages 3D). De plus, sachant que la quantité d'huile dans l'implant injecté a une influence sur la toxicité (Svendsen and Aaes-Jørgensen, 1979), ce paramètre doit être évalué à la fois *in vitro* et *in vivo* pour établir un volume d'injection considéré sécuritaire pour les études cliniques. Afin de compléter les études *in vitro*, la biocompatibilité *in vivo* peut être évaluée en identifiant et en quantifiant les acteurs moléculaires / cellulaires de la réponse immunitaire innée et adaptative entourant l'implant. Ceci peut être réalisé, d'une part, par des études histologiques (immunohistochimie, technique (semi)-quantitative) ou encore en utilisant la cytométrie en flux pour quantifier les cellules de l'inflammation. D'autre part, la RMN peut être employée pour quantifier l'inflammation dans les tissus à l'échelle cellulaire puis être secondée par des tests de dosages immuno-enzymatique (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*) pour la quantification des cytokines et autres biomarqueurs de l'inflammation.

Microaiguilles se dissolvant dans la peau :

Les microaiguilles de PVA-PVP sont produites à partir de deux matériaux biocompatibles et approuvés par la FDA. Cependant, les microaiguilles se dissolvant dans la peau peuvent causer, lors d'application répétée, des érythèmes et des irritations locales à cause des matériaux utilisés (Ramadon *et al.*, 2021). Le potentiel inflammatoire de ces microaiguilles *in vivo* est donc à déterminer lors d'études d'innocuité à exposition unique ou répétée au timbre, ce qui peut être accompli par une évaluation histologique du tissu.

4.6. Conclusion générale

Le développement de nouvelles technologies d'administration de médicament doit s'effectuer en prenant en compte, leur facilité d'administration, ainsi que l'amélioration de l'efficacité et de la tolérance de ce nouveau système par rapport aux formulations déjà commercialisées.

Les hypothèses de recherche générales 1 et 2 évaluées dans cette thèse étaient que :

- Hypothèse 1 : Le contrôle des paramètres de composition pour les organogels se formant *in situ*, à savoir le pourcentage massique en organogélifiant et l'ajout de tensioactif, permet de mieux contrôler la cinétique de relargage de substances actives immobilisées dans les implants gélifiés et leur cytotoxicité.
- Hypothèse 2 : Lorsque des substances actives sont encapsulées dans des systèmes d'administration transdermique tels que les microaiguilles pyramidales se dissolvant dans la peau, l'ajustement de la hauteur des aiguilles permet de mieux contrôler la cinétique de libération de ces substances actives et donc, *in fine*, leurs biodisponibilités associées.

Les deux objectifs principaux de recherche étant de :

- Développer un organogel injectable formant un implant *in situ* pour déterminer l'effet de la composition de ce système (pourcentage massique en organogélifiant, ajout de tensioactif) sur la libération de substances actives hydrophile et lipophile, ainsi que sur la viabilité des fibroblastes de prépuce humain.
- Concevoir des timbres de microaiguilles hydrosolubles pour évaluer l'effet de la hauteur des aiguilles sur l'administration de peptide à travers la peau.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse valident l'hypothèse, les études *in vivo* de biodisponibilité étant une des perspectives de ce travail de recherche. Les résultats obtenus permettent de conclure sur l'intérêt des systèmes d'administration à base d'implants d'organogel se formant *in situ* ou de microaiguilles se dissolvant dans la peau en montrant que :

- Une augmentation du pourcentage massique en organogélifiant, le 12-HSA permet la formation d'un réseau tridimensionnel gélifié plus résistant sous l'effet de la température

ou d'une contrainte de cisaillement. Néanmoins, l'ajout de Tween 80 perturbe la dynamique d'assemblage à l'échelle moléculaire des molécules d'organogélifiant, résultant en une structure plus fluide.

- L'ajout de Tween 80 dans le système a conduit à une diminution de l'injectabilité des formulations et une augmentation de l'érosion du gel en surface. La nature des interactions à l'échelle moléculaire conditionne donc les propriétés des gels à l'échelle macroscopique, soit : leur comportement rhéologique, leur injectabilité, leur résistance mécanique et leur stabilité / dégradation.
- Les organogels de 12-HSA ont diminué significativement les taux de libération au long terme de l'acyclovir (médicament hydrophile), comparé aux formulations de clotrimazole (médicament lipophile) *in vitro* et *ex vivo*. Ceci favorise donc une libération prolongée de substance active de type hydrophile dans les systèmes d'organogel.
- Les effets cytotoxiques étaient plus élevés en augmentant la quantité de 12-HSA dans l'implant pour une sensibilité plus élevée pour le modèle de culture cellulaire 3D *vis-à-vis* du modèle 2D. Cependant, ces résultats semblent amplifiés par le type d'huile utilisé et son potentiel cytotoxique.
- Une hauteur plus grande des pointes de microaiguilles tout en gardant un ratio d'aspect petit (2-3) permet d'augmenter à la fois le taux d'encapsulation du peptide sélectionnée (GHRP-6) pendant l'étape de fabrication et sa libération. La hauteur des microaiguilles, finement contrôlée par le procédé de fabrication, peut donc contribuer à améliorer l'administration transdermique de peptide tel que le GHRP-6.

Essentiellement, cette étude permet de fournir une première exploitation des paramètres de composition du système, tels que le pourcentage massique en organogélifiant, l'effet d'additif tensioactif ou encore des dimensions géométriques, à ajuster pour obtenir à la fois un dispositif performant et sécuritaire. De plus, le procédé de fabrication simple et peu coûteux de ces technologies renforce leur chance de succès comme nouveaux systèmes d'administration de médicaments.

Le choix d'application des organogels se formant *in situ* et des microaiguilles se dissolvant dans la peau pour administrer des substances d'intérêt thérapeutique dépend donc de l'objectif final

souhaité. En effet, si le but recherché est une administration prolongée de substances actives, les systèmes d'organogel constitueront la meilleure option tandis que pour une administration rapide et sans douleur, les microaiguilles seront sélectionnées. L'administration des médicaments par voie transcutanée permet en plus d'entrevoir l'utilisation de ces deux systèmes pour une action ciblée au niveau des couches profondes de la peau pour des pathologies cutanées variées. Ces résultats prometteurs contribuent donc substantiellement au développement de deux nouveaux systèmes d'administration en permettant d'identifier la meilleure option selon l'application souhaitée (local ou systémique) tout en prenant en considération l'amélioration de l'observance thérapeutique des patients.

De nombreux défis attendent encore ces nouveaux systèmes d'administration pour garantir leur transposition à l'échelle industrielle, leur sécurité, leur efficacité ainsi que la transition des données *in vitro* aux phases préclinique et clinique. Cependant, ils offrent une nouvelle direction pour répondre au manque d'adhésion des patients aux médicaments en apportant de nouvelles options thérapeutiques adaptées à leur mode de vie et applicables dans de multiples domaines thérapeutiques.

Bibliographie

- Abraham, J., & Mathew, S. (2019). Merkel Cells: A Collective Review of Current Concepts. *Int J Appl Basic Med Res*, 9(1), 9-13. doi: 10.4103/ijabmr.IJABMR_34_18
- Abraira, V. E., & Ginty, D. D. (2013). The sensory neurons of touch. *Neuron*, 79(4), 618-639.
- Ahmed, A. R., Dashevsky, A., & Bodmeier, R. (2010). Drug release from and sterilization of *in situ* cubic phase forming monoglyceride drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm*, 75(3), 375-380. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.04.004
- Ahmed, T. A., Ibrahim, H. M., Ibrahim, F., Samy, A. M., Kaseem, A., Nutan, M. T., *et al.* (2012). Development of biodegradable *in situ* implant and microparticle injectable formulations for sustained delivery of haloperidol. *J Pharm Sci*, 101(10), 3753-3762. doi: 10.1002/jps.23250
- Ahmed, T. A., Ibrahim, H. M., Samy, A. M., Kaseem, A., Nutan, M. T. H., & Hussain, M. D. (2014). Biodegradable injectable *in situ* implants and microparticles for sustained release of montelukast: *in vitro* release, pharmacokinetics, and stability. *AAPS PharmSciTech*, 15(3), 772-780. doi: 10.1208/s12249-014-0101-3
- Al-Koofee, D. (2013). Effect of Temperature Changes on Critical Micelle Concentration for Tween Series Surfactant. *Global J Sci Front Res Chem*, 13. 1-8
- Alberts B, J. A., Lewis J, *et al.* (2002). Epidermis and Its Renewal by Stem Cells Molecular Biology of the Cell. (4th edition ed.): New York: Garland Science.
- Alkhouli, N., Mansfield, J., Green, E., Bell, J., Knight, B., Liversedge, N., *et al.* (2013). The mechanical properties of human adipose tissues and their relationships to the structure and composition of the extracellular matrix. *Am J Physiol Endocrinol and Metab*, 305(12), E1427-E1435. doi: 10.1152/ajpendo.00111.2013
- Alkilani, A. Z., McCrudden, M. T. C., & Donnelly, R. F. (2015). Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum. *Pharmaceutics*, 7(4), 438-470. doi: 10.3390/pharmaceutics7040438
- Almeida, B. C., Figueiredo, P., & Carvalho, A. T. P. (2019). Polycaprolactone Enzymatic Hydrolysis: A Mechanistic Study. *ACS Omega*, 4(4), 6769-6774. doi.org/10.1021/acsomega.9b00345
- Almeida, H., Helena Amaral, M., & Lobão, P. (2012). Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. *J Appl Pharm Sci*, 2(6), 1-10. doi: 10.7324/JAPS.2012.2609
- Andrews, S., Lee, J. W., & Prausnitz, M. (2011). Recovery of skin barrier after stratum corneum removal by microdermabrasion. *AAPS PharmSciTech*, 12(4), 1393-1400. doi: 10.1208/s12249-011-9715-x
- Arechabala, B., Coiffard, C., Rivalland, P., Coiffard, L. J. M., & Roeck-Holtzhauer, Y. D. (1999). Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol*, 19(3), 163-165. doi: 10.1002/(sici)1099-1263(199905/06)19:3<163::aid-jat561>3.0.co;2-h.
- Avcil, M., Akman, G., Klokckers, J., Jeong, D., & Çelik, A. (2020). Efficacy of bioactive peptides loaded on hyaluronic acid microneedle patches: A monocentric clinical study. *J Cosmet Dermatol*, 19(2), 328-337. doi: 10.1111/jocd.13009
- Baba, H., Ueno, Y., Hashida, M., & Yamashita, F. (2017). Quantitative prediction of ionization effect on human skin permeability. *Int J Pharm*, 522(1), 222-233. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.03.009

- Babity, S., Polomska, A. K., Couture, F., Bonmarin, M., Fehr, D., Detmar, M., *et al.* (2020). Rational design of a fluorescent microneedle tattoo for minimally invasive monitoring of lymphatic function. *J Control Release*, 327, 350-359. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.08.017
- Baker, L. B. (2019). Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin)*, 6(3), 211-259. doi: 10.1080/23328940.2019.1632145
- Banerjee, G., Damodaran, A., Devi, N., Dharmalingam, K., & Raman, G. (2004). Role of Keratinocytes in Antigen Presentation and Polarization of Human T Lymphocytes. *Scand J Immunol*, 59(4), 385-394. doi: 10.1111/j.0300-9475.2004.01394.x
- Barba, C., Alonso, C., Martí, M., Manich, A., & Coderch, L. (2016). Skin barrier modification with organic solvents. *Biochim Biophys Acta*, 1858(8), 1935-1943. doi:10.1016/j.bbamem.2016.05.009
- Baroli, B. (2006). Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications. *J Chem Tech & Biotech*, 81(4), 491-499. doi: 10.1002/jctb.1468
- Bartsch, W., Sponer, G., Dietmann, K., & Fuchs, G. (1976). Acute toxicity of various solvents in the mouse and rat. LD50 of ethanol, diethylacetamide, dimethylformamide, dimethylsulfoxide, glycerine, N-methylpyrrolidone, polyethylene glycol 400, 1,2-propanediol and Tween 20. *Arzneimittelforschung*, 26(8), 1581-1583.
- Bastiat, G., & Leroux, J. C. (2009). Pharmaceutical organogels prepared from aromatic amino acid derivatives. *J Mater Chem*, 19(23), 3867-3877.
- Bastiat, G., Plourde, F., Motulsky, A., Furtos, A., Dumont, Y., Quirion, R., *et al.* (2010). Tyrosine-based rivastigmine-loaded organogels in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomaterials*, 31(23), 6031-6038. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.009
- Batheja, P., Sheihet, L., Kohn, J., Singer, A. J., & Michniak-Kohn, B. (2011). Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: Formulation optimization and *in vitro* and *in vivo* skin distribution studies. *J Control Release*, 149(2), 159-167. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.10.005
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, 7(4), 452-464. doi: 10.1215/S1152851705000232
- Berlanga-Acosta, J., Guillen, G., Lopez-Mola, E., & Herrera-Martinez, L. (2016). Growth hormone releasing peptide-6 (GHRP-6) and other related secretagogue synthetic peptides: A mine of medical potentialities for unmet medical needs. *Integr Mol Med*, 3, 616-623. doi: 10.15761/IMM.1000213.
- Bernard, B., Recherche, L. O., & Zviak, C. (2006). La vie révélée du follicule de cheveu humain. doi: 10.1051/medsci/2006222138
- Bhadani, A., Iwabata, K., Sakai, K., Koura, S., Sakai, H., & Abe, M. (2017). Sustainable oleic and stearic acid based biodegradable surfactants. *RSC Adv*, 7(17), 10433-10442. doi: 10.1039/C6RA27036K
- Bikle, D. D. (2012). Vitamin D and the skin: Physiology and pathophysiology. *Rev Endocr Metab Disord*, 13(1), 3-19. doi: 10.1007/s11154-011-9194-0
- Bode, C., Kranz, H., Siepman, F., & Siepman, J. (2018). In-situ forming PLGA implants for intraocular dexamethasone delivery. *Int J Pharm*, 548(1), 337-348. doi: doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.07.013

- Bos, J. D., & Meinardi, M. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*, 9(3), 165-169. doi : 10.1034/j.1600-0625.2000.009003165.x
- Boulet, N., & Galitzky, J. (2020). La macro-architecture en lobules du tissu adipeux humain définit des niches influençant le devenir des cellules progénitrices. *Med Sci (Paris)*, 36(3), 197-200. doi : 10.1051/medsci/2020039
- Bouwstra, J. A., de Graaff, A., Gooris, G. S., Nijssse, J., Wiechers, J. W., & van Aelst, A. C. (2003). Water Distribution and Related Morphology in Human Stratum Corneum at Different Hydration Levels. *J Invest Dermatol*, 120(5), 750-758. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12128.x.
- Bragulla, H. H., & Homberger, D. G. (2009). Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214(4), 516-559. doi : 10.1111/j.1469-7580.2009.01066.x
- Braverman, I. M. (2000). The Cutaneous Microcirculation. *J Invest Dermatol*, Symposium Proceedings, 5(1), 3-9. doi: 10.1046/j.1087-0024.2000.00010.x.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*, 84(3), 539-549. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
- Briggaman, R. A., & Wheeler, C. E. (1975). The Epidermal-Dermal Junction. *J Invest Dermatol*, 65(1), 71-84. doi: 10.1111/1523-1747.ep12598050
- Brodbeck, K. J., DesNoyer, J. R., & McHugh, A. J. (1999). Phase inversion dynamics of PLGA solutions related to drug delivery: Part II. The role of solution thermodynamics and bath-side mass transfer. *J Control Release*, 62(3), 333-344. Doi: 10.1016/s0168-3659(99)00159-5
- Brown, M. B., Lenn, J., Evans, C., & Lim, S. (2015). Commercial and Regulatory Considerations in Transdermal and Dermal Medicines Development. In *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*, 243-257.
- Carranca, M., Martín Prieto, V., & Kirilov, P. (2017). Colloidal Dispersions of Gelled Lipid Nanoparticles (GLN): Concept and Potential Applications. *Gels*, 3(3), 33. doi : 10.3390/gels3030033
- Chang, X. H., Zhang, J., Wu, L. H., Peng, Y. K., Yang, X. Y., Li, X. L., *et al.* (2019). Research Progress of Near-Infrared Fluorescence Immunoassay. *Micromachines (Basel)*, 10(6), 422. doi: 10.3390/mi10060422
- Chaplin, M. (2007). Water's Hydrogen Bond Strength. *ArXiv*, 706.
- Chapman, S. J., & Walsh, A. (1989). Membrane-coating granules are acidic organelles which possess proton pumps. *J Invest Dermatol*, 93(4), 466-470. doi: 10.1111/1523-1747.ep12284032
- Charkoudian, N. (2003). Skin Blood Flow in Adult Human Thermoregulation: How It Works, When It Does Not, and Why. *Mayo Clinic Proceedings*, 78(5), 603-612. doi: 10.4065/78.5.603
- Chen, J., Ormes, J. D., Higgins, J. D., & Taylor, L. S. (2015). Impact of Surfactants on the Crystallization of Aqueous Suspensions of Celecoxib Amorphous Solid Dispersion Spray Dried Particles. *Mol Pharmaceutics*, 12(2), 533-541. doi : 10.1021/mp5006245
- Chen, M. Y., Chen, Y. Y., Tsai, H. T., Tzai, T. S., Chen, M. C., & Tsai, Y. S. (2017). Transdermal Delivery of Luteinizing Hormone-releasing Hormone with Chitosan Microneedles: A Promising Tool for Androgen Deprivation Therapy. *Anticancer Res*, 37(12), 6791-6797. 10.21873/anticancer.12139

- Chen, S., & Singh, J. (2005). Controlled delivery of testosterone from smart polymer solution based systems: *In vitro* evaluation. *Int J Pharm*, 295(1), 183-190. doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.02.023
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., *et al.* (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels *in situ*. *Biomaterials*, 21(21), 2155-2161. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00116-2
- Chiulan, I., Heggset, E. B., Voicu, Ş. I., & Chinga-Carrasco, G. (2021). Photopolymerization of Bio-Based Polymers in a Biomedical Engineering Perspective. *Biomacromolecules*, 22(5), 1795-1814. Doi: 10.1021/acs.biomac.0c01745
- Choe, C., Schleusener, J., Lademann, J., & Darvin, M. E. (2017). Keratin-water-NMF interaction as a three layer model in the human stratum corneum using *in vivo* confocal Raman microscopy. *Sci Rep*, 7(1), 15900.
- Choy, Y. B., & Prausnitz, M. R. (2011). The Rule of Five for Non-Oral Routes of Drug Delivery: Ophthalmic, Inhalation and Transdermal. *Pharm Res*, 28(5), 943-948. doi: 10.1007/s11095-010-0292-6
- Chu, L. Y., Choi, S. O., & Prausnitz, M. R. (2010). Fabrication of dissolving polymer microneedles for controlled drug encapsulation and delivery: Bubble and pedestal microneedle designs. *J Pharm Sci*, 99(10), 4228-4238. doi : 10.1002/jps.22140
- Co, E., & Marangoni, A. (2012). Organogels: An Alternative Edible Oil-Structuring Method. *J Am Oil Chem Soc*, 89, 749-780.
- Cobo, R., García-Piqueras, J., Cobo, J., & Vega, J. A. (2021). The Human Cutaneous Sensory Corpuscles: An Update. *J Clin Med*, 10(2), 227. doi: 10.3390/jcm10020227
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci*, 9(2), 191-200. doi: 10.5114/aoms.2013.33181
- Cogen, A. L., Nizet, V., & Gallo, R. L. (2008). Skin microbiota: a source of disease or defence? *Br J Dermatol*, 158(3), 442-455. doi: 10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x
- Cormier, M., Johnson, B., Ameri, M., Nyam, K., Libiran, L., Zhang, D. D., *et al.* (2004). Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system. *J Control Release*, 97(3), 503-511. doi: 10.1016/j.jconrel.2004.04.003
- Cortese, M., Gigliobianco, M. R., Magnoni, F., Censi, R., & Di Martino, P. (2020). Compensate for or Minimize Matrix Effects? Strategies for Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Technique: A Tutorial Review. *Molecules*, 25(13), 3047. doi : 10.3390/molecules25133047
- Couffin-Hoarau, A. C., Motulsky, A., Delmas, P., & Leroux, J. C. (2004). *In situ*-forming pharmaceutical organogels based on the self-assembly of L-alanine derivatives. *Pharm Res*, 21(3), 454-457.
- Cravedi, J.-P., Grob, K., Nygaard, U. C., & Alexander, J. (2017). Bioaccumulation and toxicity of mineral oil hydrocarbons in rats - specificity of different subclasses of a broad mixture relevant for human dietary exposures. *EFSA Supporting Publications*, 14(2), 1090E. doi: 10.2903/sp.efsa.2017.EN-1090
- Cross, S. E., Magnusson, B. M., Winckle, G., Anissimov, Y., & Roberts, M. S. (2003). Determination of the Effect of Lipophilicity on the *in vitro* Permeability and Tissue Reservoir Characteristics of Topically Applied Solutes in Human Skin Layers. *J Invest Dermatol*, 120(5), 759-764. doi: 0.1046/j.1523-1747.2003.12131.x
- Crowley, P. D., & Gallagher, H. C. (2014). Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol*, 117(3), 611-617. doi: 10.1111/jam.12554

- Curdy, C., Naik, A., Kalia, Y. N., Alberti, I., & Guy, R. H. (2004). Non-invasive assessment of the effect of formulation excipients on stratum corneum barrier function *in vivo*. *Int J Pharm*, 271(1-2), 251-256. doi : 10.1016/j.ijpharm.2003.11.016.
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., & Scott, T. (2013). UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*, 14(6), 12222-12248. doi: 10.3390/ijms140612222
- Dancik, Y., Jepps, O., & Roberts, M. (2008). Physiologically Based Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Skin. In *Dermal Absorption and Toxicity Assessment*. doi: 10.3109/9780849375927
- Deshmukh, K., Basheer Ahamed, M., Deshmukh, R. R., Khadheer Pasha, S. K., Bhagat, P. R., & Chidambaram, K. (2017). 3 - Biopolymer Composites With High Dielectric Performance: Interface Engineering. In K. K. Sadasivuni, D. Ponnamma, J. Kim, J. J. Cabibihan & M. A. AlMaadeed, Éditeurs, *Biopolymer Composites in Electronics*, 27-128. doi: 10.1016/B978-0-12-809261-3.00003-6
- Di, L. (2015). Strategic approaches to optimizing peptide ADME properties. *AAPS J*, 17(1), 134-143. doi: 10.1208/s12248-014-9687-3
- Dirain, C. O., Karnani, D. N., & Antonelli, P. J. (2019). Cytotoxicity of Ear Drop Excipients in Human and Mouse Tympanic Membrane Fibroblasts. *Otolaryngology Head Neck Surg*, 162(2), 204-210. doi: 10.1177/0194599819889701
- Dmitrieva, N. I., & Burg, M. B. (2011). Increased insensible water loss contributes to aging related dehydration. *PloS one*, 6(5), e20691-e20691. doi : 10.1096/fasebj.25.1_supplement.1079.3
- Dong, W. Y., Körber, M., López Esguerra, V., & Bodmeier, R. (2006). Stability of poly(D,L-lactide-co-glycolide) and leuprolide acetate in in-situ forming drug delivery systems. *J Control Release*, 115(2), 158-167. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.07.013
- Dragicevic-Curic, N., & Maibach, H. (2017). Percutaneous Penetration Enhancers Drug Penetration Into/Through the Skin: Methodology and General Considerations.
- Dufresne, M.-H., Marouf, E., Kränzlin, Y., Gauthier, M. A., & Leroux, J.-C. (2012). Lipase Is Essential for the Study of *in vitro* Release Kinetics from Organogels. *Mol Pharm*, 9(6), 1803-1811. doi: 10.1021/mp3001099
- Dunn RL, E. J., Cowsar DR, Vanderbilt DD. (1999). Biodegradable in-situ forming implants and methods of producing the same. Tolmar Therapeutics Inc. U.S. Patent 5990194A.
- Dunn RL, T. A., Southard GL, Rogers JA. (1997). Biodegradable polymer composition. Tolmar Therapeutics Inc. U.S. 5599552A.
- El Kechai, N., Bochot, A., Huang, N., Nguyen, Y., Ferrary, E., & Agnely, F. (2015). Effect of liposomes on rheological and syringeability properties of hyaluronic acid hydrogels intended for local injection of drugs. *Int J Pharm*, 487(1-2), 187-196. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.04.019
- Elahpour, N., Pahlevanzadeh, F., Kharaziha, M., Bakhsheshi-Rad, H. R., Ramakrishna, S., & Berto, F. (2021). 3D printed microneedles for transdermal drug delivery: A brief review of two decades. *Int J Pharm*, 597, 120301. doi: 10.1016/j.ijpharm.2021.120301
- Enayati, M., Mobedi, H., Hojjati-Emami, S., Mirzadeh, H., & Jafari-Nodoushan, M. (2017). *In situ* forming PLGA implant for 90 days controlled release of leuprolide acetate for treatment of prostate cancer. *Pol Adv Techn*, 28(7), 867-875. doi: 10.1002/pat.3991
- Escobar-Chávez, J. (2010). In *Current Technologies to Increase the Transdermal Delivery of Drugs*.

- Esposito, C. L., Kirilov, P., & Roullin, V. G. (2017). Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications. *J Control Release*, 271, 1-20. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.12.019
- Fameau, A.-L., Ventureira, J., Novales, B., & Douliez, J.-P. (2012). Foaming and emulsifying properties of fatty acids neutralized by tetrabutylammonium hydroxide. *Colloids Surf A: Physicochem and Eng Asp*, 403, 87-95. doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.03.059
- Fang, C., Aljuffali, I., Li, Y.-C., & Fang, J.-Y. (2014). Delivery and targeting of nanoparticles into hair follicles. *Ther deliv*, 5, 991-1006. doi: 10.4155/tde.14.61
- Fartasch, M., Bassukas, I. D., & Diepgkn, T. L. (1993). Structural relationship between epidermal lipid lamellae, lamellar bodies and desmosomes in human epidermis: an ultrastructural study. *Br J Dermatol*, 128(1), 1-9. doi: 10.1111/j.1365-2133.1993.tb00138.x
- Fernández, J., Etxeberria, A., & Sarasua, J.-R. (2012). Synthesis, structure and properties of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) statistical copolymers. *J Mech Behav Biomed*, 9, 100-112. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.01.003
- Findlay, M. W., & Gurtner, G. C. (2017). Chapter 35 - Engineering Niches for Skin and Wound Healing. In A. Vishwakarma & J. M. Karp (Eds.), *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*, Boston: Academic Press, 559-579.
- Fluhr, J. W., & Elias, P. M. (2002). Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. *Exog Dermatol*, 1(4), 163-175. doi: 10.1159/000066140
- Freeman, S. C., Sidharth Sonthalia. (2020). Histology, Keratohyalin Granules. Retrieved Updated 2020 Jul 3, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537049/>
- Frégeau, G., Sarduy, R., Elimam, H., Esposito, C. L., Mellal, K., Ménard, L., *et al.* (2020). Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 307, 52-62. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.06.010
- Fukushima, K., Ise, A., Morita, H., Hasegawa, R., Ito, Y., Sugioka, N., *et al.* (2011). Two-Layered Dissolving Microneedles for Percutaneous Delivery of Peptide/Protein Drugs in Rats. *Pharm Res*, 28(1), 7-21. doi: 10.1007/s11095-010-0097-7
- Ganceviciene, R., Liakou, A. I., Theodoridis, A., Makrantonaki, E., & Zouboulis, C. C. (2012). Skin anti-aging strategies. *Dermato Endocrinol*, 4(3), 308-319. doi: 10.4161/derm.22804
- Gao, Z. H., Crowley, W. R., Shukla, A. J., Johnson, J. R., & Reger, J. F. (1995). Controlled release of contraceptive steroids from biodegradable and injectable gel formulations: *in vivo* evaluation. *Pharm Res*, 12(6), 864-868. doi: 10.1023/a:1016261004230
- Garland, M. J., Migalska, K., Tuan-Mahmood, T.-M., Raghu Raj Singh, T., Majithija, R., Caffarel-Salvador, E., *et al.* (2012). Influence of skin model on *in vitro* performance of drug-loaded soluble microneedle arrays. *Inter J Pharm*, 434(1), 80-89. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.05.069.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2010). In *Concise Histology E-Book*: Elsevier Health Sciences.
- Gerstel, M. S. P., Virgil A. (1976). Drug delivery device. Alza Corp, U.S. patent US3964482A.
- Ghan, S. Y., Siow, L. F., Tan, C. P., Cheong, K. W., & Thoo, Y. Y. (2020). Influence of Soya Lecithin, Sorbitan and Glyceryl Monostearate on Physicochemical Properties of Organogels. *Food Biophys*, 15(3), 386-395.
- Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2020). Potential of Nanoparticles as Permeation Enhancers and Targeted Delivery Options for Skin: Advantages and Disadvantages. *Drug Des Devel Ther*, 14, 3271-3289. doi: 10.2147/DDDT.S264648

- Gibbs, N. K., & Norval, M. (2011). Urocanic Acid in the Skin: A Mixed Blessing? *J Invest Dermatol*, 131(1), 14-17. doi: 10.1038/jid.2010.276
- Gimeno, M., Pinczowski, P., Pérez, M., Giorello, A., Martínez, M. Á., Santamaría, J., *et al.* (2015). A controlled antibiotic release system to prevent orthopedic-implant associated infections: An *in vitro* study. *Eur J Pharm Biopharm*, 96, 264-271. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.08.007
- Glatte, P., Buchmann, S. J., Hijazi, M. M., Illigens, B. M.-W., & Siepmann, T. (2019). Architecture of the Cutaneous Autonomic Nervous System. *Front in Neurol*, 10(970). doi: 10.3389/fneur.2019.00970
- Grice, E. A., & Segre, J. A. (2011). The skin microbiome. *Nat Rev Microbiology*, 9(4), 244-253. doi: 10.1038/nrmicro2537
- Groll, A. H., Piscitelli, S. C., & Walsh, T. J. (1998). Clinical Pharmacology of Systemic Antifungal Agents: A Comprehensive Review of Agents in Clinical Use, Current Investigational Compounds, and Putative Targets for Antifungal Drug Development. In J. T. August, M. W. Anders, F. Murad & J. T. Coyle (Eds.), *Advances in Pharmacology* : Academic Press, 44, 343-500.
- Guillot, A. J., Cordeiro, A. S., Donnelly, R. F., Montesinos, M. C., Garrigues, T. M., & Melero, A. (2020). Microneedle-Based Delivery: An Overview of Current Applications and Trends. *Pharmaceutics*, 12(6). doi: 10.3390/pharmaceutics12060569
- Gunin, A. G., Petrov, V. V., Golubtzova, N. N., Vasilieva, O. V., & Kornilova, N. K. (2014). Age-related changes in angiogenesis in human dermis. *Exp Gerontol*, 55, 143-151. doi: 10.1016/j.exger.2014.04.010
- Gupta, J., Gill, H. S., Andrews, S. N., & Prausnitz, M. R. (2011). Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human subjects. *J Control Release*, 154(2), 148-155. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.021
- Gupta, J., Gill, H. S., Andrews, S. N., & Prausnitz, M. R. (2011). Kinetics of skin resealing after insertion of microneedles in human subjects. *J Control release*, 154(2), 148-155. doi:10.1016/j.jconrel.2011.05.021
- Hadgraft, J., Cordes, G., & Wolff, M. (1990). Prediction of the Transdermal Delivery of β -blockers. In N. Rietbrock (Ed.), *Die Haut als Transportorgan für Arzneistoffe*, Heidelberg: Steinkopff, 133-143.
- Hadgraft, J., Mateus, R., & Lane, M. E. (2015). Application of Spectroscopic Techniques to Interrogate Skin. In *Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery*, 41-55.
- Hafeez, F., & Maibach, H. (2013). Occlusion Effect on *in vivo* Percutaneous Penetration of Chemicals in Man and Monkey: Partition Coefficient Effects. *Skin Pharmacol Physiol*, 26(2), 85-91. doi:10.1159/000346273
- Haftek, M. (2015). Epidermal barrier disorders and corneodesmosome defects. *Cell Tissue res*, 360(3), 483-490. doi:10.1007/s00441-014-2019-1
- Haftek, M. (2017). Stratum Corneum Histopathology. In *Agache's Measuring the Skin: Non-invasive Investigations, Physiology, Normal Constants*, Cham: Springer International Publishing, P. Humbert, F. Fanian, H. I. Maibach & P. Agache (Eds.), 245-254.
- Hanson, K. M., Behne, M. J., Barry, N. P., Mauro, T. M., Gratton, E., & Clegg, R. M. (2002). Two-photon fluorescence lifetime imaging of the skin stratum corneum pH gradient. *Biophys J*, 83(3), 1682-1690. doi:10.1016/s0006-3495(02)73936-2

- Haque, T., & Talukder, M. M. U. (2018). Chemical Enhancer: A Simplistic Way to Modulate Barrier Function of the Stratum Corneum. *Adv Pharm Bull*, 8(2), 169-179. doi:10.15171/apb.2018.021
- Harvey, W., & Danks, A. (2010). The Use of the Minipig in the Safety Evaluation of Topical Drug Products.
- Hawley, A. E., Davis, S. S., & Illum, L. (1995). Targeting of colloids to lymph nodes: influence of lymphatic physiology and colloidal characteristics. *Adv Drug Deliv Rev*, 17(1), 129-148. doi: 10.1016/0169-409X(95)00045-9
- He, X., Sun, J., Zhuang, J., Xu, H., Liu, Y., & Wu, D. (2019). Microneedle System for Transdermal Drug and Vaccine Delivery: Devices, Safety, and Prospects. *Dose Response*, 17(4), 1559325819878585-1559325819878585. doi:10.1177/1559325819878585
- Heaf, J. G. (2007). The origin of the 1 x 73-m² body surface area normalization: problems and implications. *Clin Physiol Funct Imaging*, 27(3), 135-137. doi:10.1111/j.1475-097X.2006.00718.x
- Hellemans, L., Corstjens, H., Neven, A., Declercq, L., & Maes, D. (2003). Antioxidant Enzyme Activity in Human Stratum Corneum Shows Seasonal Variation with an Age-Dependent Recovery. *J Invest Dermatol*, 120(3), 434-439. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12056.x
- Henry, S., McAllister, D. V., Allen, M. G., & Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated Microneedles: A Novel Approach to Transdermal Drug Delivery. *J Pharm Sci*, 87(8), 922-925. doi: 10.1021/js980042+
- Herndon, T. O., Gonzalez, S., Gowrishankar, T. R., Anderson, R. R., & Weaver, J. C. (2004). Transdermal microconduits by microscission for drug delivery and sample acquisition. *BMC Med*, 2(1), 12. doi:10.1186/1741-7015-2-12
- Hines, D. J., & Kaplan, D. L. (2013). Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Crit rev Ther Drug*, 30(3), 257-276. doi:10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013006475
- Hirobe, S., Azukizawa, H., Hanafusa, T., Matsuo, K., Quan, Y.-S., Kamiyama, F., et al. (2015). Clinical study and stability assessment of a novel transcutaneous influenza vaccination using a dissolving microneedle patch. *Biomaterials*, 57, 50-58. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.04.007
- Hoath, S. B., & Leahy, D. G. (2003). The Organization of Human Epidermis: Functional Epidermal Units and Phi Proportionality. *J Invest Dermatol*, 121(6), 1440-1446. doi: 10.1046/j.1523-1747.2003.12606.x
- Holbrook, K. A. (1989). Biologic Structure and Function: Perspectives on Morphologic Approaches to the Study of the Granular Layer Keratinocyte. *J Invest Dermatol*, 92(4, Supplement), S84-S104. doi: 10.1038/jid.1989.36
- Hsiao, M.-H. Y., Hsiu-Feng; Liu, Ta-Jo; Wang, Jane. (2019). Drug Loading on Microneedles. *Adv Chem Eng Sci*, 9(2).
- Hu, B., Yan, H., Sun, Y., Chen, X., Sun, Y., Li, S., et al. (2020). Organogels based on amino acid derivatives and their optimization for drug release using response surface methodology. *Artif Cell Nanomed Biotech*, 48(1), 266-275. doi:10.1080/21691401.2019.1699833
- Hu, R., Ling, W., Xu, W., & Han, D. (2014). Fibroblast-Like Cells Differentiated from Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells for Vocal Fold Wound Healing. *Plos One*, 9(3), e92676. doi:10.1371/journal.pone.0092676
- Hua, T., Zhang, X., Tang, B., Chang, C., Liu, G., Feng, L., et al. (2018). Tween-20 transiently changes the surface morphology of PK-15 cells and improves PCV2 infection. *BMC Vet Res*, 14(1), 138-138. doi:10.1186/s12917-018-1457-5

- Hussain, J. N., Mantri, N., & Cohen, M. M. (2017). Working Up a Good Sweat - The Challenges of Standardising Sweat Collection for Metabolomics Analysis. *Clin Biochem Rev*, 38(1), 13-34
- Huyck, L., Ampe, C., & Van Troys, M. (2012). The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. *Assay Drug Dev Technol*, 10(4), 382-392. doi: 10.1089/adt.2011.391
- Idris, A., Man, Z., Maulud, A. S., & Khan, M. S. (2017). Effects of Phase Separation Behavior on Morphology and Performance of Polycarbonate Membranes. *Membranes (Basel)*, 7(2). doi:10.3390/membranes7020021
- Indermun, S., Lutge, R., Choonara, Y. E., Kumar, P., du Toit, L. C., Modi, G., *et al.* (2014). Current advances in the fabrication of microneedles for transdermal delivery. *J Control Release*, 185, 130-138. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.052
- Islam, S. (2011). Lipophilic and hydrophilic drug loaded PLA/PLGA in situ implants: Studies on thermal behavior of drug & polymer and observation of parameters influencing drug burst release with corresponding effects on loading efficiency & morphology of implants. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 3, 181–188.
- Ita, K. (2015). Transdermal Delivery of Drugs with Microneedles—Potential and Challenges. *Pharmaceutics*, 7(3), 90-105. doi: 10.3390/pharmaceutics7030090
- Iwanaga, K., Kawai, M., Miyazaki, M., & Kakemi, M. (2012). Application of organogels as oral controlled release formulations of hydrophilic drugs. *Int. J. Pharm*, 436(1–2), 869-872. doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.06.041
- Janssens, M., Smeden, J., Gooris, G., Bras, W., Portale, G., Caspers, P., *et al.* (2012). Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J Lipid Res*, 53. doi:10.1194/jlr.P030338
- Jeong, H.-R., Kim, J.-Y., Kim, S.-N., & Park, J.-H. (2018). Local dermal delivery of cyclosporin A, a hydrophobic and high molecular weight drug, using dissolving microneedles. *Eur J Pharm Biopharm*, 127, 237-243. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.02.014
- Jung, J. (2014). Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. *Toxicol Res*, 30(1), 1-5. doi:10.5487/TR.2014.30.1.001
- Jung, J. H., & Jin, S. G. (2021). Microneedle for transdermal drug delivery: current trends and fabrication. *J Pharm Invest*. doi:10.1007/s40005-021-00512-4
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem Rev*, 116(4), 2602-2663. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00346
- Kang, E. Y., Lih, E., Kim, I. H., Joung, Y. K., & Han, D. K. (2016). Effects of poly(L-lactide-ε-caprolactone) and magnesium hydroxide additives on physico-mechanical properties and degradation of poly(L-lactic acid). *Biomaterials Res*, 20(1), 7. doi:10.1186/s40824-016-0054-6
- Kanwar, N., & Sinha, V. R. (2019). *In situ* Forming Depot as Sustained-Release Drug Delivery Systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 36(2), 93-136. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.2018025013
- Kaplan, D. H., Igyártó, B. Z., & Gaspari, A. A. (2012). Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol*, 12(2), 114-124. doi:10.1038/nri3150
- Kaplan, S., Colak, M., Hosgoren, H., & Pirinccioglu, N. (2019). Design of l-Lysine-Based Organogelators and Their Applications in Drug Release Processes. *ACS omega*, 4(7), 12342-12356. doi:10.1021/acsomega.9b01086

- Kapoor, Y., Milewski, M., Dick, L., Zhang, J., Bothe, J. R., Gehrt, M., *et al.* (2019). Coated microneedles for transdermal delivery of a potent pharmaceutical peptide. *Biomed Microdevices*, 22(1), 7. doi:10.1007/s10544-019-0462-1
- Karande, P., & Mitragotri, S. (2009). Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim et Biophys Acta Biomembr*, 1788(11), 2362-2373. doi: 10.1016/j.bbmem.2009.08.015
- Karande, P., Jain, A., Ergun, K., Kispersky, V., & Mitragotri, S. (2005). Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(13), 4688-4693. doi:10.1073/pnas.0501176102
- Karsdal, M. A., Genovese, F., Madsen, E. A., Manon-Jensen, T., & Schuppan, D. (2016). Collagen and tissue turnover as a function of age: Implications for fibrosis. *J Hepatol*, 64(1), 103-109. doi: 10.1016/j.jhep.2015.08.014
- Keepers, Y. P., Pizao, P. E., Peters, G. J., van Ark-Otte, J., Winograd, B., & Pinedo, H. M. (1991). Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for *in vitro* chemosensitivity testing. *Eur J Cancer*, 27(7), 897-900. doi:10.1016/0277-5379(91)90142-z
- Kempe, S., & Mäder, K. (2012). *In situ* forming implants — an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J Control Release*, 161(2), 668-679. doi:10.1016/j.jconrel.2012.04.016
- Kendall, R. T., & Feghali-Bostwick, C. A. (2014). Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol*, 5, 123-123. doi:10.3389/fphar.2014.00123
- Kim, K. S., Ita, K., & Simon, L. (2015). Modelling of dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Theoretical and experimental aspects. *Eur J Pharm Sci*, 68, 137-143. doi: 10.1016/j.ejps.2014.12.008
- Kim, M. J., Park, S. C., Rizal, B., Guanés, G., Baek, S.-K., Park, J.-H., *et al.* (2018). Fabrication of Circular Obelisk-Type Multilayer Microneedles Using Micro-Milling and Spray Deposition. *Front Bioeng Biotechnol*, 6, 54-54. doi:10.3389/fbioe.2018.00054
- Kim, Y.-C., Park, J.-H., & Prausnitz, M. R. (2012). Microneedles for drug and vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 64(14), 1547-1568. doi: 10.1016/j.addr.2012.04.005
- Kirilov, P., Gauffre, F., Franceschi-Messant, S., Perez, E., & Rico-Lattes, I. (2009). Rheological characterization of a new type of colloidal dispersion based on nanoparticles of gelled oil. *J Phys Chem B*, 113(32), 11101-11108. doi: 10.1021/jp905260s
- Kirilov, P., Rum, S., Gilbert, E., Roussel, L., Salmon, D., Abdayem, R., *et al.* (2014). Aqueous dispersions of organogel nanoparticles - potential systems for cosmetic and dermo-cosmetic applications. *Inter J Cosmet Sci*, 36(4), 336-346. doi:10.1111/ics.12131
- Kirjavainen, M., Mönkkönen, J., Saukkosaari, M., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., & Urtti, A. (1999). Phospholipids affect stratum corneum lipid bilayer fluidity and drug partitioning into the bilayers. *J Control Release*, 58(2), 207-214. doi:10.1016/s0168-3659(98)00152-7
- Kirkby, M., Hutton, A. R. J., & Donnelly, R. F. (2020). Microneedle Mediated Transdermal Delivery of Protein, Peptide and Antibody Based Therapeutics: Current Status and Future Considerations. *Pharm Res*, 37(6), 117-117. doi:10.1007/s11095-020-02844-6
- Koocheki, S., Madaeni, S. S., & Niroomandi, P. (2011). Development of an enhanced formulation for delivering sustained release of buprenorphine hydrochloride. *Saudi Pharm J*, 19(4), 255-262. doi: 10.1016/j.jsps.2011.05.001
- Kudsi, O. Y., & Pomahac, B. (2018). Skin Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. Metin Akay (Ed), 6.

- Labied, S., Jouan, C., Wenders, F., Ravet, S., Gaspard, O., Thonon, F., *et al.* (2019). Comparison between paraffin and mineral oil covering on early human embryo culture: a prospective randomized study. *Syst Biol in Reprod Med*, 65(1), 81-86. doi:10.1080/19396368.2018.1492645
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H., & Finkel, P. (2006). Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*, 28(5), 359-370. doi:10.1111/j.1467-2494.2006.00344.x
- Lan, Y., & Rogers, M. A. (2015). 12-Hydroxystearic acid SAFiNs in aliphatic diols – a molecular oddity. *Cryst Eng Comm*, 17(42), 8031-8038. doi:10.1039/C5CE00652J
- Law, R. M., Ngo, M. A., & Maibach, H. I. (2020). Twenty Clinically Pertinent Factors/Observations for Percutaneous Absorption in Humans. *Am J Clin Dermatol*, 21(1), 85-95. doi:10.1007/s40257-019-00480-4
- Le Renard, P. E., Jordan, O., Faes, A., Petri-Fink, A., Hofmann, H., Rufenacht, D., *et al.* (2010). The *in vivo* performance of magnetic particle-loaded injectable, *in situ* gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. *Biomaterials*, 31(4), 691-705. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.091
- Lee, I. C., He, J.-S., Tsai, M.-T., & Lin, K.-C. (2015). Fabrication of a novel partially dissolving polymer microneedle patch for transdermal drug delivery. *J Mater Chem B*, 3(2), 276-285. doi:10.1039/C4TB01555J
- Lee, I. C., Wu, Y.-C., Tsai, S.-W., Chen, C.-H., & Wu, M.-H. (2017). Fabrication of two-layer dissolving polyvinylpyrrolidone microneedles with different molecular weights for *in vivo* insulin transdermal delivery. *RSC Adv*, 7(9), 5067-5075. doi:10.1039/C6RA27476E
- Lee, J. H. (2018). Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res*, 22(1), 27. doi:10.1186/s40824-018-0138-6
- Lee, J. W., Park, J.-H., & Prausnitz, M. R. (2008). Dissolving microneedles for transdermal drug delivery. *Biomaterials*, 29(13), 2113-2124. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.12.048
- Lee, S. H., Jeong, S. K., & Ahn, S. K. (2006). An update of the defensive barrier function of skin. *Yonsei Med J*, 47(3), 293-306. doi:10.3349/ymj.2006.47.3.293
- Lee, W. Y., Asadujjaman, M., & Jee, J.-P. (2019). Long acting injectable formulations: the state of the arts and challenges of poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere, hydrogel, organogel and liquid crystal. *J Pharm Invest*, 49(4), 459-476. doi:10.1007/s40005-019-00449-9
- Lehrer, R. I., Bevins, C. L., & Ganz, T. (2005). Defensins and Other Antimicrobial Peptides and Proteins. *Mucosal Immunol*, 95-110. doi:10.1016/B978-012491543-5/50010-3
- Leontiev, V. N., & Lazovskaya, O. I. (2019). Application of Spectral Methods to Study the Stability of Amiodarone Hydrochloride Micellar Solutions. *Journal of Applied Spectroscopy*, 85(6), 1071-1075. doi:10.1007/s10812-019-00761-0
- Leroux, A., Nguyen, T. N., Rangel, A., Cacciapuoti, I., Duprez, D., Castner, D. G., *et al.* (2020). Long-term hydrolytic degradation study of polycaprolactone films and fibers grafted with poly(sodium styrene sulfonate): Mechanism study and cell response. *Biointerphases*, 15(6), 061006. doi:10.1116/6.0000429
- Li, W., Terry, R. N., Tang, J., Feng, M. R., Schwendeman, S. P., & Prausnitz, M. R. (2019). Rapidly separable microneedle patch for the sustained release of a contraceptive. *Nat Biomed Eng*, 3(3), 220-229. doi:10.1038/s41551-018-0337-4
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the *in vitro* cytotoxicity testing of medical devices. *Biomed Rep*, 3(5), 617-620. doi:10.3892/br.2015.481

- Li, Y., Hu, X., Dong, Z., Chen, Y., Zhao, W., Wang, Y., *et al.* (2020). Dissolving Microneedle Arrays with Optimized Needle Geometry for Transcutaneous Immunization. *Eur J Pharm Sci*, 151, 105361. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105361
- Li, Z., Cao, J., Li, H., Liu, H., Han, F., Liu, Z., *et al.* (2016). Self-assembled drug delivery system based on low-molecular-weight bis-amide organogelator: synthesis, properties and *in vivo* evaluation. *Drug Deliv*, 23(8), 3168-3178. doi:10.3109/10717544.2016.1157841
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 46(1-3), 3-26. doi:10.1016/s0169-409x(00)00129-0
- Liu, C.-W., Su, M., Li, X.-L., Xue, T., Liu, N., Yin, J., *et al.* (2015). Multi-stimuli-responsive chiral organogels based on peptide derivatives. *Soft Matter*, 11(28), 5727-5737. doi:10.1039/C5SM00115C
- Liu, S., Wu, D., Quan, Y.-s., Kamiyama, F., Kusamori, K., Katsumi, H., *et al.* (2016). Improvement of Transdermal Delivery of Exendin-4 Using Novel Tip-Loaded Microneedle Arrays Fabricated from Hyaluronic Acid. *Mol Pharm*, 13(1), 272-279. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00765
- Liu, S., Yeo, D. C., Wiraja, C., Tey, H. L., Mrksich, M., & Xu, C. (2017). Peptide delivery with poly(ethylene glycol) diacrylate microneedles through swelling effect. *Bioeng Trans Med*, 2(3), 258-267. doi: 10.1002/btm2.10070
- Liu, X., Testa, B., & Fahr, A. (2011). Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation. *Pharm Res*, 28(5), 962-977. doi:10.1007/s11095-010-0303-7
- Lligadas, G., Ronda, J. C., Galià, M., & Cádiz, V. (2013). Renewable polymeric materials from vegetable oils: a perspective. *Mater Today*, 16(9), 337-343. doi: 10.1016/j.mattod.2013.08.016
- Lovászi, M., Szegedi, A., Zouboulis, C. C., & Töröcsik, D. (2017). Sebaceous-immunobiology is orchestrated by sebum lipids. *Dermato Endocrinol*, 9(1), e1375636-e1375636. doi:10.1080/19381980.2017.1375636
- Lukyanova, L., Franceschi-Messant, S., Vicendo, P., Perez, E., Rico-Lattes, I., & Weinkamer, R. (2010). Preparation and evaluation of microporous organogel scaffolds for cell viability and proliferation. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 79(1), 105-112. doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.03.044
- Lupi, F. R., Greco, V., Baldino, N., de Cindio, B., Fischer, P., & Gabriele, D. (2016). The effects of intermolecular interactions on the physical properties of organogels in edible oils. *J Colloid Interface Sci*, 483, 154-164. doi:10.1016/j.jcis.2016.08.009
- M.S. Roberts, S. E. C., M.A. Pellett. (2002). Skin Transport. In *Dermatological and transdermal formulations*, New York: Marcel Dekker, K. A. W. (Ed.), 89-195.
- Madan, M., Bajaj, A., Lewis, S., Udupa, N., & Baig, J. A. (2009). *In situ* forming polymeric drug delivery systems. *Indian J Pharm Sci*, 71(3), 242-251. doi:10.4103/0250-474x.56015
- Madhujith, T., & Sivakanthan, S. (2018). Oxidative Stability of Edible Plant Oils. In *Bioactive Molecules in Food*, Cham: Springer International Publishing, J.-M. Mérillon & K. G. Ramawat (Eds.), 1-23.
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, 3(3), 1377-1397. doi:10.3390/polym3031377

- Makrantonaki, E., Ganceviciene, R., & Zouboulis, C. (2011). An update on the role of the sebaceous gland in the pathogenesis of acne. *Dermato Endocrinol*, 3(1), 41-49. doi:10.4161/derm.3.1.13900
- Makvandi, P., Kirkby, M., Hutton, A. R. J., Shabani, M., Yiu, C. K. Y., Baghbantaraghdari, Z., *et al.* (2021). Engineering Microneedle Patches for Improved Penetration: Analysis, Skin Models and Factors Affecting Needle Insertion. *Nano Micro Lett*, 13(1), 93. doi:10.1007/s40820-021-00611-9
- Mallia, V. A., & Weiss, R. G. (2018). Structure-Property Comparison and Self-Assembly Studies of Molecular Gels Derived from (R)-12-Hydroxystearic Acid Derivatives as Low Molecular Mass Gelators Gels and Other Soft Amorphous Solids. *ACS Symp Ser Am Chem Soc*, 1296, 227-243.
- Mao, H., Yang, L., Zhu, H., Wu, L., Ji, P., Yang, J., *et al.* (2020). Recent advances and challenges in materials for 3D bioprinting. *Prog Nat Sci Mater Int*, 30(5), 618-634. doi: 10.1016/j.pnsc.2020.09.015
- Marieb, E., Hoehn, K., Lachaine, R., & Moussakova, L. (2014). In *Anatomie et physiologie humaines*: Pearson France, 9e.
- Martín-Alguacil, N., de Gaspar, I., Schober, J. M., & Pfaff, D. W. (2016). Somatosensation. In *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*, New York, NY: Springer New York, D. W. Pfaff & N. D. Volkow (Eds.), 863-902.
- Martini, M. C. (2011). *Introduction à la dermatopharmacie et à la cosmétologie: Éd. Médicales internationales*.
- McAllister, D. V., Wang, P. M., Davis, S. P., Park, J.-H., Canatella, P. J., Allen, M. G., *et al.* (2003). Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: Fabrication methods and transport studies. *PNAS*, 100(24), 13755-13760. doi:10.1073/pnas.2331316100
- McCrudden, M. T., Singh, T. R., Migalska, K., & Donnelly, R. F. (2013). Strategies for enhanced peptide and protein delivery. *Ther Deliv*, 4(5), 593-614. doi:10.4155/tde.13.31
- McHugh, A. J. (2005). The role of polymer membrane formation in sustained release drug delivery systems. *J Control Release*, 109(1), 211-221. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.09.038
- Mending, W., Atef El Shazly, M., & Zhang, L. (2020). Clotrimazole for Vulvovaginal Candidosis: More Than 45 Years of Clinical Experience. *Pharmaceuticals (Basel)*, 13(10). doi:10.3390/ph13100274
- Mitragotri, S. (2003). Modeling skin permeability to hydrophilic and hydrophobic solutes based on four permeation pathways. *J Control Release*, 86(1), 69-92. doi: 10.1016/S0168-3659(02)00321-8
- Mitragotri, S., Anissimov, Y. G., Bunge, A. L., Frasnich, H. F., Guy, R. H., Hadgraft, J., *et al.* (2011). Mathematical models of skin permeability: an overview. *Int J Pharm*, 418(1), 115-129. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.023
- Moga, K. A., Bickford, L. R., Geil, R. D., Dunn, S. S., Pandya, A. A., Wang, Y., *et al.* (2013). Rapidly-dissolvable microneedle patches via a highly scalable and reproducible soft lithography approach. *Adv Mater*, 25(36), 5060-5066. doi:10.1002/adma.201300526
- Mogilnicka, I., Bogucki, P., & Ufnal, M. (2020). Microbiota and Malodor-Etiology and Management. *Inter J Mol Sci*, 21(8), 2886. doi:10.3390/ijms21082886
- Morin, M., Ruzgas, T., Svedenag, P., Anderson, C. D., Ollmar, S., Engblom, J., *et al.* (2020). Skin hydration dynamics investigated by electrical impedance techniques *in vivo* and *in vitro*. *Sci. Rep*, 10(1), 17218. doi:10.1038/s41598-020-73684-y

- Motulsky, A., Lafleur, M., Couffin-Hoarau, A. C., Hoarau, D., Boury, F., Benoit, J. P., *et al.* (2005). Characterization and biocompatibility of organogels based on L-alanine for parenteral drug delivery implants. *Biomaterials*, 26(31), 6242-6253. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.004
- Muiznieks, L. D., & Keeley, F. W. (2013). Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1832(7), 866-875. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.11.022
- Mundstock, A., Abdayem, R., Pirot, F., & Haftek, M. (2014). Alteration of the Structure of Human Stratum Corneum Facilitates Transdermal Delivery. *Open Dermatol J*, 8, 72-79. doi:10.2174/1874372201408010072
- Murdan, S., Gregoriadis, G., & Florence, A. T. (1999). Sorbitan monostearate/polysorbate 20 organogels containing niosomes: a delivery vehicle for antigens? *Eur J Pharm Sci*, 8(3), 177-185. doi: 10.1016/S0928-0987(99)00014-7
- Murdan, S., van den Bergh, B., Gregoriadis, G., & Florence, A. T. (1999). Water-in-sorbitan monostearate organogels (water-in-oil gels). *J Pharm Sci*, 88(6), 615-619. doi:10.1021/js980343j
- Mutyambizi, K., Berger, C. L., & Edelson, R. L. (2009). The balance between immunity and tolerance: the role of Langerhans cells. *CMLS*, 66(5), 831-840. doi:10.1007/s00018-008-8470-y
- N'Da, D. D. (2014). Prodrug strategies for enhancing the percutaneous absorption of drugs. *Molecules (Basel)*, 19(12), 20780-20807. doi:10.3390/molecules191220780
- Nash, J. F., Gettings, S. D., Diembeck, W., Chudowski, M., & Kraus, A. L. (1996). A toxicological review of topical exposure to white mineral oils. *Food Chem Toxicol*, 34(2), 213-225. doi:10.1016/0278-6915(95)00106-9
- Neupane, R., Boddu, S. H. S., Renukuntla, J., Babu, R. J., & Tiwari, A. K. (2020). Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics*, 12(2). doi:10.3390/pharmaceutics12020152
- Ng, K. W., & Lau, W. M. (2015). Skin Deep: The Basics of Human Skin Structure and Drug Penetration. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, N. Dragicevic & H. I. Maibach (Eds.), 3-11.
- Nguyen, D. T., Orgill, D. P., & Murphy, G. F. (2009). 4 - The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration. In *Biomaterials for Treating Skin Loss*, Woodhead Publishing, D. Orgill & C. Blanco (Eds.), 25-57.
- Niu, X.-Q., Zhang, D.-P., Bian, Q., Feng, X.-F., Li, H., Rao, Y.-F., *et al.* (2019). Mechanism investigation of ethosomes transdermal permeation. *Inter J Pharm: X*, 1, 100027. doi: 10.1016/j.ijpx.2019.100027
- O'Brien, J. J., & Campoli-Richards, D. M. (1989). Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs*, 37(3), 233-309. doi:10.2165/00003495-198937030-00002
- Oosten, A. W., Abrantes, J. A., Jönsson, S., de Bruijn, P., Kuip, E. J. M., Falcão, A., *et al.* (2016). Treatment with subcutaneous and transdermal fentanyl: results from a population pharmacokinetic study in cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 72(4), 459-467. doi:10.1007/s00228-015-2005-x
- Oranges, T., Dini, V., & Romanelli, M. (2015). Skin Physiology of the Neonate and Infant: Clinical Implications. *Adv Wound Care*, 4(10), 587-595. doi:10.1089/wound.2015.0642

- Pandey, M., Belgamwar, V., Gattani, S., Surana, S., & Tekade, A. (2010). Pluronic lecithin organogel as a topical drug delivery system. *Drug Deliv*, 17(1), 38-47. doi:10.3109/10717540903508961
- Parent, M., Nouvel, C., Koerber, M., Sapin, A., Maincent, P., & Boudier, A. (2013). PLGA *in situ* implants formed by phase inversion: Critical physicochemical parameters to modulate drug release. *J Control Release*, 172(1), 292-304. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.08.024
- Pastore, M. N., Kalia, Y. N., Horstmann, M., & Roberts, M. S. (2015). Transdermal patches: history, development and pharmacology. *Br J Pharmacol*, 172(9), 2179-2209. doi:10.1111/bph.13059
- Patel, A. R., Babaahmadi, M., Lesaffer, A., & Dewettinck, K. (2015). Rheological Profiling of Organogels Prepared at Critical Gelling Concentrations of Natural Waxes in a Triacylglycerol Solvent. *J Agric and Food Chem*, 63(19), 4862-4869. doi:10.1021/acs.jafc.5b01548
- Patel, A. R., Dumlu, P., Vermeir, L., Lewille, B., Lesaffer, A., & Dewettinck, K. (2015). Rheological characterization of gel-in-oil-in-gel type structured emulsions. *Food Hydrocoll*, 46, 84-92. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.12.029
- Patel, R. B., Carlson, A. N., Solorio, L., & Exner, A. A. (2010). Characterization of formulation parameters affecting low molecular weight drug release from *in situ* forming drug delivery systems. *J Biomed Mater Res. Part A*, 94(2), 476-484. doi:10.1002/jbm.a.32724
- Patki, M., Palekar, S., Reznik, S., & Patel, K. (2021). Self-injectable extended release formulation of Remdesivir (SelfExRem): A potential formulation alternative for COVID-19 treatment. *Inter J Pharm*, 597, 120329-120329. doi:10.1016/j.ijpharm.2021.120329
- Patzelt, A., & Lademann, J. (2015). The Increasing Importance of the Hair Follicle Route in Dermal and Transdermal Drug Delivery. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Drug Manipulation Strategies and Vehicle Effects*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, N. Dragicevic & H. I. Maibach (Eds.), 43-53.
- Paudel, K. S., Milewski, M., Swadley, C. L., Brogden, N. K., Ghosh, P., & Stinchcomb, A. L. (2010). Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. *Ther deliv*, 1(1), 109-131. doi:10.4155/tde.10.16
- Pawlik, J., Łukowicz, K., Cholewa-Kowalska, K., & Osyczka, A. M. (2019). New insights into the PLGA and PCL blending: physico-mechanical properties and cell response. *Mater Res Express*, 6(8), 085344. doi:10.1088/2053-1591/ab2823
- Pellerin, L., Henry, J., Hsu, C. Y., Balica, S., Jean-Decoster, C., Méchin, M. C., *et al.* (2013). Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol*, 131(4), 1094-1102. doi:10.1016/j.jaci.2012.12.1566
- Peralta, M. F., Guzmán, M. L., Pérez, A. P., Apezteguia, G. A., Fórmica, M. L., Romero, E. L., *et al.* (2018). Liposomes can both enhance or reduce drugs penetration through the skin. *Sci Rep*, 8(1), 13253-13253. doi:10.1038/s41598-018-31693-y
- Picardo, M., Ottaviani, M., Camera, E., & Mastrofrancesco, A. (2009). Sebaceous gland lipids. *Dermato Endocrinol*, 1(2), 68-71. doi:10.4161/derm.1.2.8472
- Plourde, F., Motulsky, A., Couffin-Hoarau, A.-C., Hoarau, D., Ong, H., & Leroux, J.-C. (2005). First report on the efficacy of l-alanine-based *in situ*-forming implants for the long-term parenteral delivery of drugs. *J Control Release*, 108(2-3), 433-441. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.08.016
- Potter, A., Luengo, G., Santoprete, R., & Querleux, B. (2009). Stratum Corneum Biomechanics. In *Skin moisturization*, Ed 2nd, Chapter 16, 259-278.

- Prausnitz, M. R., & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol*, 26(11), 1261-1268. doi:10.1038/nbt.1504
- Prausnitz, M. R., Mikszta, J. A., Cormier, M., & Andrianov, A. K. (2009). Microneedle-based vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol*, 333, 369-393. doi:10.1007/978-3-540-92165-3_18
- Prost-squarcioni, C., Fraitag, S., Heller, M., & Boehm, N. (2008). Histologie fonctionnelle du derme. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 135(1, Part 3), 5-20. doi: 10.1016/S0151-9638(08)70206-0
- Proulx, C., Picard, É., Boeglin, D., Pohankova, P., Chemtob, S., Ong, H., *et al.* (2012). Azapeptide analogues of the growth hormone releasing peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a. *J Med Chem*, 55(14), 6502-6511. doi:10.1021/jm300557t
- Pugh, W. J., Roberts, M. S., & Hadgraft, J. (1996). Epidermal permeability — Penetrant structure relationships: 3. The effect of hydrogen bonding interactions and molecular size on diffusion across the stratum corneum. *Inter J Pharm*, 138(2), 149-165. doi: 10.1016/0378-5173(96)04533-4
- Pyo, S. M., & Maibach, H. I. (2019). Skin Metabolism: Relevance of Skin Enzymes for Rational Drug Design. *Skin Pharmacol and Physiol*, 32(5), 283-294. doi:10.1159/000501732
- Quesada-Pérez, M., Alberto, M., Forcada, J., & Hidalgo-Alvarez, R. (2011). Gel swelling theories: The classical formalism and recent approaches. *Soft Matter*, 7, 10536-10547. doi:10.1039/C1SM06031G
- Quindlen, J. C., Lai, V. K., & Barocas, V. H. (2015). Multiscale Mechanical Model of the Pacinian Corpuscle Shows Depth and Anisotropy Contribute to the Receptor's Characteristic Response to Indentation. *Plos Computat Biol*, 11(9), e1004370-e1004370. doi:10.1371/journal.pcbi.1004370
- Quinn, H. L., Bonham, L., Hughes, C. M., & Donnelly, R. F. (2015). Design of a Dissolving Microneedle Platform for Transdermal Delivery of a Fixed-Dose Combination of Cardiovascular Drugs. *J Pharm Sci*, 104(10), 3490-3500. doi: 10.1002/jps.24563
- Rahnfeld, L., & Luciani, P. (2020). Injectable Lipid-Based Depot Formulations: Where Do We Stand? *Pharmaceutics*, 12(6). doi:10.3390/pharmaceutics12060567
- Ramadan, D., McCrudden, M. T. C., Courtenay, A. J., & Donnelly, R. F. (2021). Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv Trans Res*. doi:10.1007/s13346-021-00909-6
- Rawlings, A. V., & Harding, C. R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther*, 17 Suppl 1, 43-48. doi:10.1111/j.1396-0296.2004.04s1005.x
- Raymond, A.-A., de Peredo, A. G., Stella, A., Ishida-Yamamoto, A., Bouyssie, D., Serre, G., *et al.* (2008). Lamellar Bodies of Human Epidermis: Proteomics Characterization by High Throughput Mass Spectrometry and Possible Involvement of CLIP-170 in their Trafficking/Secretion. *MCP*, 7(11), 2151-2175. doi: 10.1074/mcp.M700334-MCP200
- Reznik, M. (1996). [Structure and functions of the cutaneous nervous system]. *Pathol Biol (Paris)*, 44(10), 831-837
- Richardson, M. (2003). Understanding the structure and function of the skin. *Nurs Times*, 99(31), 46-48
- Roberts, M., & Anissimov, Y. (2005). Mathematical Models in Percutaneous Absorption. Percutaneous Absorption. *COCIS*, 17(3), 166-172. doi:10.1201/9780849359033.ch1
- Roig-Rosello, E., & Rousselle, P. (2020). The Human Epidermal Basement Membrane: A Shaped and Cell Instructive Platform That Aging Slowly Alters. *Biomolecules*, 10(12), 1607

- Romay, M., Diban, N., & Urtiaga, A. (2021). Thermodynamic Modeling and Validation of the Temperature Influence in Ternary Phase Polymer Systems. *Polymers (Basel)*, 13(5). doi:10.3390/polym13050678
- Rosso, A., Almouazen, E., Pontes, J., Andretto, V., Leroux, M., Romasko, E., *et al.* (2021). Supersaturable self-microemulsifying delivery systems: an approach to enhance oral bioavailability of benzimidazole anticancer drugs. *Drug Deliv Trans Res*, 11(2), 675-691. doi:10.1007/s13346-021-00904-x
- Ruela, A. L. M. e. a. (2016). Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. *Brazilian J Pharm Sci* [online]. 52, 527-544. doi: 10.1590/S1984-82502016000300018.
- Santos, A., Sinn Aw, M., Bariana, M., Kumeria, T., Wang, Y., & Losic, D. (2014). Drug-releasing implants: current progress, challenges and perspectives. *J Mater Chem B*, 2(37), 6157-6182. doi:10.1039/C4TB00548A
- Sappey, P. C. (1894). *Traité d'anatomie générale*: Battaille.
- Sato, K., & Dobson, R. L. (1970). Regional and Individual Variations in the Function of the Human Eccrine Sweat Gland. *J Invest Dermatol*, 54(6), 443-449. doi: 10.1111/1523-1747.ep12259272
- Schaefer, H., & Filaquier, C. (1992). Skin metabolism. *Pathol Biol (Paris)*, 40(2), 196-204.
- Schittny, A., Huwyler, J., & Puchkov, M. (2020). Mechanisms of increased bioavailability through amorphous solid dispersions: a review. *Drug deliv*, 27(1), 110-127. doi:10.1080/10717544.2019.1704940
- Schlegel, V., & Leray, E. (2018). From Medical Prescription to Patient Compliance: A Qualitative Insight into the Neurologist-Patient Relationship in Multiple Sclerosis. *Inter JMS Care*, 20(6), 279-286. doi:10.7224/1537-2073.2017-043
- Schneider, M., Stracke, F., Hansen, S., & Schaefer, U. F. (2009). Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. *Dermato Endocrinol*, 1(4), 197-206. doi:10.4161/derm.1.4.9501
- Schoellhammer, C. M., Blankschtein, D., & Langer, R. (2014). Skin permeabilization for transdermal drug delivery: recent advances and future prospects. *Expert Opin Drug Deliv*, 11(3), 393-407. doi:10.1517/17425247.2014.875528
- Schwartzberg, L. S., & Navari, R. M. (2018). Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Adv Ther*, 35(6), 754-767. doi:10.1007/s12325-018-0707-z
- Shaker JL, D. L. (Updated 2018 Jan 19). Calcium and Phosphate Homeostasis. In *Endotext* [Internet]: South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc, A. B. Feingold KR, Boyce A, *et al.* (Ed.).
- Shu, M., Wang, Y., Yu, J., Kuo, S., Coda, A., Jiang, Y., *et al.* (2013). Fermentation of *Propionibacterium acnes*, a Commensal Bacterium in the Human Skin Microbiome, as Skin Probiotics against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Plos One*, 8(2), e55380. doi:10.1371/journal.pone.0055380
- Silver, F. H., Freeman, J. W., & DeVore, D. (2001). Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. *Skin Res Technol*, 7(1), 18-23. doi:10.1034/j.1600-0846.2001.007001018.x
- Siraj, N., Shabbir, M. A., Ahmad, T., Sajjad, A., Khan, M. R., Khan, M. I., *et al.* (2015). Organogelators as a Saturated Fat Replacer for Structuring Edible Oils. *Inter J Food Prop*, 18(9), 1973-1989. doi:10.1080/10942912.2014.951891

- Sisti, A., Huayllani, M. T., Restrepo, D. J., Boczar, D., Manrique, O. J., Broer, P. N., *et al.* (2020). Oil injection for cosmetic enhancement of the upper extremities: a case report and review of literature. *Acta Biomed*, 91(3), e2020082-e2020082. doi:10.23750/abm.v91i3.8533
- Sommerfeld, S. D., Zhang, Z., Costache, M. C., Vega, S. L., & Kohn, J. (2014). Enzymatic surface erosion of high tensile strength polycarbonates based on natural phenols. *Biomacromolecules*, 15(3), 830-836. doi:10.1021/bm4016539
- Song, R., Murphy, M., Li, C., Ting, K., Soo, C., & Zheng, Z. (2018). Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug design, development and therapy*, 12, 3117-3145. doi:10.2147/DDDT.S165440
- Stanish, W. D., McCormack, R., Forriol, F., Mohtadi, N., Pelet, S., Desnoyers, J., *et al.* (2013). Novel scaffold-based BST-CarGel treatment results in superior cartilage repair compared with microfracture in a randomized controlled trial. *J Bone Joint Surg Am*, 95(18), 1640-1650. doi:10.2106/jbjs.L.01345
- Steinert, P. M., & Marekov, L. N. (1995). The Proteins Elafin, Filaggrin, Keratin Intermediate Filaments, Loricrin, and Small Proline-rich Proteins 1 and 2 Are Isodipeptide Cross-linked Components of the Human Epidermal Cornified Cell Envelope (*). *J Biol Chem*, 270(30), 17702-17711. doi: 10.1074/jbc.270.30.17702
- Stenn, K. S., & Paus, R. (2001). Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev*, 81(1), 449-494. doi:10.1152/physrev.2001.81.1.449
- Strickley, R. G. (2004). Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res*, 21(2), 201-230. doi:10.1023/b:pham.0000016235.32639.23
- Suh, M. S., Kastellorizios, M., Tipnis, N., Zou, Y., Wang, Y., Choi, S., *et al.* (2021). Effect of implant formation on drug release kinetics of *in situ* forming implants. *Inter J Pharm*, 592, 120105. doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.120105
- Suresh, P., & Paul, S. (2011). Ion-paired Drug Delivery: An Avenue for Bioavailability Improvement. *Sierra Leone J Biomed Res*, 3. doi:10.4314/sljbr.v3i2.71806
- Suzuki, M., Saito, H., Shirai, H., & Hanabusa, K. (2007). Supramolecular organogel formation triggered by acid-base interaction in two-component system consisting of l-lysine derivative and aliphatic acids. *New J Chem*, 31(9), 1654-1660. doi:10.1039/B705888H
- Svarc, F., & Hermida, L. (2020). Chapter 3 - Transdermal and bioactive nanocarriers for skin care. In *Nanocosmetics*, Elsevier, A. Nanda, S. Nanda, T. A. Nguyen, S. Rajendran & Y. Slimani (Eds.), 35-58.
- Svendsen, O., & Aaes-Jørgensen, T. (1979). Studies on the Fate of Vegetable Oil after Intramuscular Injection into Experimental Animals. *Acta Pharmacol et Toxicol*, 45(5), 352-378. doi: 10.1111/j.1600-0773.1979.tb02404.x
- Szabo, G. (1967). The regional anatomy of the human integument with special reference to the distribution of hair follicles, sweat glands and melanocytes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Series B, Biological Sciences*, 252(779), 447-485. doi:10.1098/rstb.1967.0029
- Tagami, H. (2008). Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Inter J of Cosmet Sci*, 30(6), 413-434. doi: 10.1111/j.1468-2494.2008.00459.x
- Taylor, M. G., V. (2021). Acyclovir. StatPearls [Internet], 2021 Jan, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542180/>
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. *Experientia Suppl*, 101, 133-164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Teichmann, A., Jacobi, U., Weigmann, H. J., Sterry, W., & Lademann, J. (2005). Reservoir Function of the Stratum corneum: Development of an *in vivo* Method to Quantitatively

- Determine the Stratum corneum Reservoir for Topically Applied Substances. *Skin Pharmacol Physiol*, 18(2), 75-80. doi:10.1159/000083707
- Thakur, R. R. S., McMillan, H. L., & Jones, D. S. (2014). Solvent induced phase inversion-based *in situ* forming controlled release drug delivery implants. *J Control Release*, 176, 8-23. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.12.020
- Thody, A. J., & Shuster, S. (1989). Control and function of sebaceous glands. *Physiol Rev*, 69(2), 383-416. doi:10.1152/physrev.1989.69.2.383
- Tomal, W., & Ortyl, J. (2020). Water-Soluble Photoinitiators in Biomedical Applications. *Polymers*, 12(5), 1073. doi:10.3390/polym12051073
- Turner, J. G., White, L. R., Estrela, P., & Leese, H. S. (2021). Hydrogel-Forming Microneedles: Current Advancements and Future Trends. *Macromol Biosci*, 21(2), 2000307. doi: 10.1002/mabi.202000307
- Ulery, B. D., Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2011). Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci. B, Polym Phys*, 49(12), 832-864. doi:10.1002/polb.22259
- Van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes*, 8, 47-47. doi:10.1186/s13104-015-1000-8
- Viguerie, N., Montastier, E., Maoret, J.-J., Roussel, B., Combes, M., Valle, C., *et al.* (2012). Determinants of Human Adipose Tissue Gene Expression: Impact of Diet, Sex, Metabolic Status, and Cis Genetic Regulation. *Plos Genet*, 8(9), e1002959. doi:10.1371/journal.pgen.1002959
- Vintiloiu, A., Lafleur, M., Bastiat, G., & Leroux, J.-C. (2008). *In situ*-Forming Oleogel Implant for Rivastigmine Delivery. *Pharm Res*, 25(4), 845-852. doi:10.1007/s11095-007-9384-3
- Vitorino, C., Sousa, J., & Pais, A. (2015). Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities. *Curr Pharma Des*, 21. doi:10.2174/1381612821666150428124053
- Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable Polymers. *Materials*, 2(2), 307-344. doi:10.3390/ma2020307
- Waghule, T., Singhvi, G., Dubey, S. K., Pandey, M. M., Gupta, G., Singh, M., *et al.* (2019). Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomed Pharmacother*, 109, 1249-1258. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.078
- Walloe, L. (2015). Arterio-venous anastomoses in the human skin and their role in temperature control. *Temperature (Austin)*, 3(1), 92-103. doi:10.1080/23328940.2015.1088502
- Wang, D., Zhao, J., Liu, X., Sun, F., Zhou, Y., Teng, L., *et al.* (2014). Parenteral thermo-sensitive organogel for schizophrenia therapy, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Eur J Pharm Sci*, 60, 40-48. doi: 10.1016/j.ejps.2014.04.020
- Wang, M., Hu, L., & Xu, C. (2017). Recent advances in the design of polymeric microneedles for transdermal drug delivery and biosensing. *Lab on a Chip*, 17(8), 1373-1387. doi:10.1039/C7LC00016B
- Wang, Q. L., Zhu, D. D., Liu, X. B., Chen, B. Z., & Guo, X. D. (2016). Microneedles with Controlled Bubble Sizes and Drug Distributions for Efficient Transdermal Drug Delivery. *Sci Rep*, 6(1), 38755. doi:10.1038/srep38755
- Wei, J. C. J., Edwards, G. A., Martin, D. J., Huang, H., Crichton, M. L., & Kendall, M. A. F. (2017). Allometric scaling of skin thickness, elasticity, viscoelasticity to mass for micro-medical device translation: from mice, rats, rabbits, pigs to humans. *Sci Rep*, 7(1), 15885-15885. doi:10.1038/s41598-017-15830-7

- Wen, H., Jung, H., & Li, X. (2015). Drug Delivery Approaches in Addressing Clinical Pharmacology-Related Issues: Opportunities and Challenges. *AAPS J*, 17(6), 1327-1340. doi:10.1208/s12248-015-9814-9
- Wertz, P. W. (2018). Lipids and the Permeability and Antimicrobial Barriers of the Skin. *J Lipids*, 2018, 5954034-5954034. doi:10.1155/2018/5954034
- Wester, R. C., Noonan, P. K., & Maibach, H. I. (1977). Frequency of application on percutaneous absorption of hydrocortisone. *Arch Dermatol*, 113(5), 620-622
- Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *Am J Infect Control*, 34(10, Supplement), S98-S110. doi: 10.1016/j.ajic.2006.05.295
- Williams, A. (2003). *Transdermal and Topical Drug Delivery from Theory to Clinical Practice*: Pharmaceutical Press.
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2012). Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 128-137. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.032
- Windorf, M. (2017). 12-Hydroxystearic acid-based *in situ* forming organogels: Development and characterization Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Wischke, C., & Schwendeman, S. P. (2012). Degradable Polymeric Carriers for Parenteral Controlled Drug Delivery. In *Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery*, Boston, MA: Springer US, J. Siepmann, R. A. Siegel & M. J. Rathbone (Eds.), 171-228.
- Witherel, C. E., Ababayehu, D., Barker, T. H., & Spiller, K. L. (2019). Macrophage and Fibroblast Interactions in Biomaterial-Mediated Fibrosis. *Adv Healthc Mater*, 8(4), e1801451-e1801451. doi:10.1002/adhm.201801451
- Wright, J. C., & Burgess, D. J. (2012). *Long Acting Injections and Implants*: Springer New York.
- Xie, J., Yao, B., Han, Y., Huang, S., & Fu, X. (2016). Skin appendage-derived stem cells: cell biology and potential for wound repair. *J Burns Trauma*, 4, 38-38. doi:10.1186/s41038-016-0064-6
- Xie, X., Pascual, C., Lieu, C., Oh, S., Wang, J., Zou, B., *et al.* (2017). Analgesic Microneedle Patch for Neuropathic Pain Therapy. *ACS Nano*, 11(1), 395-406. doi:10.1021/acsnano.6b06104
- Yamamoto, A., Takenouchi, K., & Ito, M. (1995). Impaired water barrier function in acne vulgaris. *Arch Dermatol Res*, 287(2), 214-218. doi:10.1007/bf01262335
- Yan, L., Raphael, A. P., Zhu, X., Wang, B., Chen, W., Tang, T., *et al.* (2014). Nanocomposite-Strengthened Dissolving Microneedles for Improved Transdermal Delivery to Human Skin. *Adv Healthc Mater*, 3(4), 555-564. doi: 10.1002/adhm.201300312
- Yang, J., Liu, X., Fu, Y., & Song, Y. (2019). Recent advances of microneedles for biomedical applications: drug delivery and beyond. *Acta Pharm Sin B*, 9(3), 469-483. doi:10.1016/j.apsb.2019.03.007
- Yang, S., Feng, Y., Zhang, L., Chen, N., Yuan, W., & Jin, T. (2012). A scalable fabrication process of polymer microneedles. *International journal of nanomedicine*, 7, 1415-1422. doi:10.2147/IJN.S28511
- Ye, L., Wu, J., Cohen, P., Kazak, L., Khandekar, M. J., Jedrychowski, M. P., *et al.* (2013). Fat cells directly sense temperature to activate thermogenesis. *PNAS*, 110(30), 12480-12485. doi:10.1073/pnas.1310261110
- Yoneda, K., McBride, O. W., Korge, B. P., Kim, I. G., & Steinert, P. M. (1992). The cornified cell envelope: lorcin and transglutaminases. *J Dermatol*, 19(11), 761-764. doi:10.1111/j.1346-8138.1992.tb03776.x

- Yousef H, A. M., Sharma S. (2020). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Retrieved 2020 Jul 27, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Zhang, Q., Fassihi, M. A., & Fassihi, R. (2018). Delivery Considerations of Highly Viscous Polymeric Fluids Mimicking Concentrated Biopharmaceuticals: Assessment of Injectability via Measurement of Total Work Done “WT”. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1520-1528. doi:10.1208/s12249-018-0963-x
- Zhang, Q., Grice, J. E., Li, P., Jepps, O. G., Wang, G. J., & Roberts, M. S. (2009). Skin solubility determines maximum transepidermal flux for similar size molecules. *Pharm Res*, 26(8), 1974-1985. doi:10.1007/s11095-009-9912-4
- Zhang, S., Qiu, Y., & Gao, Y. (2014). Enhanced delivery of hydrophilic peptides *in vitro* by transdermal microneedle pretreatment. *Acta Pharm Sin B*, 4(1), 100-104. doi:10.1016/j.apsb.2013.12.011
- Zhang, X., Yang, L., Zhang, C., Liu, D., Meng, S., Zhang, W., *et al.* (2019). Effect of Polymer Permeability and Solvent Removal Rate on *In situ* Forming Implants: Drug Burst Release and Microstructure. *Pharmaceutics*, 11(10), 520. doi:10.3390/pharmaceutics11100520
- Zhao, X., Birchall, J. C., Coulman, S. A., Tatovic, D., Singh, R. K., Wen, L., *et al.* (2016). Microneedle delivery of autoantigen for immunotherapy in type 1 diabetes. *J Control Release*, 223, 178-187. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.040
- Zhao, X., Coulman, S. A., Hanna, S. J., Wong, F. S., Dayan, C. M., & Birchall, J. C. (2017). Formulation of hydrophobic peptides for skin delivery via coated microneedles. *J Control Release*, 265, 2-13. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.03.015
- Zoudani, E. L., & Soltani, M. (2020). A new computational method of modeling and evaluation of dissolving microneedle for drug delivery applications: Extension to theoretical modeling of a novel design of microneedle (array in array) for efficient drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, 150, 105339. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105339
- 3, Overview of Vitamin D. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, *et al.*, editors. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. (2011). Washington (DC): National Academies Press (US). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56061/>

Annexe 2 : Informations complémentaires du chapitre 4 - Discussion

Tableau S1 Comparaison de différentes formulations pour la libération d'acyclovir et de clotrimazole par les voies transdermique et parentérale

	Type de formulation	Concentration en substance active	Indication thérapeutique	Type de peau	Conclusion générale de l'étude	Références
Clotrimazole	Microémulsion	0,1 mg / g 640 mg / cm ² déposés sur la peau	Sporotrichose	Peau de porc <i>ex vivo</i>	Flux de perméation à travers la peau de 2,843 ± 0,679 µg / cm ² / h avec un temps de latence de (3,706 ± 2,450 h) pour 6 heures.	(Ferreira <i>et al.</i> , 2020)
	Éthosomes et liposomes (ET ₄) ultradéformables (TT ₃)	10 mg / mL 2,5 mg / cm ² déposés sur la peau	Candidose	Peau de rat <i>ex vivo</i>	Flux de perméation à travers la peau de 56,25 ± 5,49 µg / cm ² / h avec un temps de latence de 0,9 heure pour la formulation ET ₄ et 52,16 ± 3,84 µg / cm ² / h avec un temps de latence de 1 heure pour 24 heures. Les efficacités d'encapsulation étaient pour ET ₄ de 68,73 ± 1,4 % et pour TT ₃ de 65,51 ± 1,7 %.	(Maheshwari <i>et al.</i> , 2012)
	Gel avec des promoteurs d'absorption (5 % m/v)	0,1 mg / g 0,06 mg / cm ² déposé sur la peau	Candidose et Aspergillose	Peau de rat <i>ex vivo</i>	Flux de perméation à travers la peau jusqu'à 0,41 ± 0,15 µg / cm ² / h pour le promoteur d'absorption polyoxyethylene 2-oleyl ether de 4 à 16 heures.	(Cho <i>et al.</i> , 2009)
	Suspensions avec des promoteurs d'absorption (1 % m/v)	10 mg / mL 7.5 mg / cm ² déposés sur la peau	N/A (drogue modèle)	Peau humaine <i>ex vivo</i>	Flux de perméation à travers la peau jusqu'à 3,9 ± 0,8 µg / cm ² / h pour la formulation contenant du propylène glycol / éthanol / Transkarbam* comme promoteur d'absorption de 10 à 50 heures.	(Hrabálek <i>et al.</i> , 2006)
	Gel de transférosomes (CTM-TF)	10 mg / mL 0,4 mg / cm ² déposé sur la peau	Candidose	<i>In vivo</i> peau humaine	Comparaison entre la formulation commerciale de Canesten® et le gel de CTM-TF. Les paramètres pharmacocinétiques atteignaient pour les AUC / Cmax / Tmax : 2314 ± 107 ng.h.mL ⁻¹ / 297 ± 10,5 ng.mL ⁻¹ / 10 ± 0,8 h et 1348 ± 97 ng.h.mL ⁻¹ / 188 ± 8,7 ng.mL ⁻¹ / 6,5 ± 0,56 h ⁻¹ pour le CTM-CF et le Canesten®, respectivement. <i>À titre indicatif, ces formulations ont été testées in vitro sur des membranes de cellophane aux mêmes concentrations (10 mg/mL). Les flux de perméation atteignaient 88,9 and 73,2 µg / cm² / h pour 24 heures pour le CTM-CF et le Canesten®, respectivement.</i>	(Alyoussef alkrad <i>et al.</i> , 2020)
	Implants d'organogel de 12-HSA à 4 et 10	1 mg / mL 0,4 mg / cm ² déposé sur la peau	N/A (drogue modèle)	Peau de porc <i>ex vivo</i>	Flux de perméation de 11,8 ± 1,1 µg / cm ² / h pour la formulation à 4 % m/m et 15,1 ± 1,8 µg / cm ² / h pour la formulation à 10 % m/m sur une durée de 6 heures. Les quantités cumulatives totales pénétrées de clotrimazole étaient	(Cloé L. Esposito <i>et al.</i> , 2020)

	% m/m en organogélifiant				de 272 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et 255 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour les formulations à 10 et 4% m/m en organogélifiant, respectivement pour 72 heures.	
Acyclovir	Solution d'acyclovir avec des promoteurs d'absorption (0,1 ou 0,5 % m/v) / iontophorèse	1 mg/mL 1,7 mg / cm ² déposés sur la peau	Infections à l'herpès simple	Peau porc <i>ex vivo</i>	de Les quantités cumulatives totales ayant pénétré à travers la peau des diverses formulations après 7 heures variées entre 0,17 ± 0,11 et 0,74 ± 0,32 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour une diffusion passive et entre 7,48 ± 0,44 et 27,77 ± 2,99 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour une diffusion active par iontophorèse avec ou sans lipopeptide promoteur d'absorption.	(Nicoli <i>et al.</i> , 2010)
	Microémulsion contenant des promoteurs d'absorption (1, 2,5 ou 5 % m/m)	3 mg 1,1 mg / cm ² déposés sur la peau	Infections à l'herpès simplex	Peau souris <i>ex vivo</i>	de Les quantités cumulatives totales maximales ayant pénétré à travers la peau après 24 heures étaient de ~900 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour la formulation contenant du transcutool comme promoteur d'absorption.	(Shishu <i>et al.</i> , 2009)
	SNEDDS**	50 mg 28,4 mg / cm ² déposés sur la peau (<i>ex vivo</i>) 10mg/kg de poids corporel/ cm ² (<i>in vivo</i>)	Infections à l'herpès simplex	Peau de rat <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	de Les quantités cumulatives totales maximales ayant pénétré à travers la peau après 24 heures étaient de 8933 ± 741 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$. Comparaison entre la formulation SNEDDS et Zovirax®. Les paramètres pharmacocinétiques atteignaient pour les AUC / Cmax / Tmax : 11234,1 ± 1312,6 ng.h.mL ⁻¹ / 993 ± 101 ng.mL ⁻¹ / 240 ± 30 h ⁻¹ pour la formulation SNEDDS et 5718,3 ± 811,2 ng.h.mL ⁻¹ / 410 ± 651 ng.mL ⁻¹ / 180 ± 30 h ⁻¹ pour le Zovirax®.	(Almehmady and Ali, 2021)
	Liposomes (conventionnels ou élastiques)	1 mg/mL 0,5 mg / cm ² déposé sur la peau (<i>ex vivo</i>) 0,2 mg / cm ² déposé sur la peau (<i>in vivo</i>)	Infections à l'herpès simplex	Peau de rat <i>ex vivo</i> et <i>in vivo</i>	de Flux de perméation à travers la peau jusqu'à 6,2 ± 1,8 $\mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$ pour la formulation de liposomes élastiques en 24 heures avec un temps de latence de 0,6 heure. Les efficacités d'encapsulation étaient pour les liposomes élastiques de 43,1 ± 1,8 % et pour les liposomes conventionnels de 66,4 ± 0,4 %. Les paramètres pharmacocinétiques atteignaient pour les AUC/ Cmax : 1394 ± 41 ng.h.mL ⁻¹ / 82 ± 11,9 ng.mL ⁻¹ pour la formulation de liposomes conventionnels et 3456 ± 117 ng.h.mL ⁻¹ / 192 ± 10 ng.mL ⁻¹ pour la formulation de liposomes élastiques.	(Jain <i>et al.</i> , 2008)
	Implants d'organogel de 12-HSA T80 à 4 et 10 % m/m en organogélifiant	1 mg/mL 0,4 mg / cm ² déposé sur la peau	N/A (drogue modèle)	Peau de porc <i>ex vivo</i>	de Flux de perméation de 4,5 ± 0,6 $\mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$ pour la formulation à 4% m/m et 5,0 ± 0,2 $\mu\text{g} / \text{cm}^2 / \text{h}$ pour la formulation à 10% m/m sur une durée de 6 heures. Les quantités cumulatives totales pénétrées de clotrimazole étaient de 313 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ et 288 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$ pour les formulations à 10 et 4% m/m en organogélifiant, respectivement pour 240 heures.	(Cloé L. Esposito <i>et al.</i> , 2020)

*le sel d'acide carbamique de l'ester dodécylque d'acide oméga-aminocaproïque, **SNEDDS : self-nanoemulsifying drug delivery system

Tableau S2 Considérations à prendre en compte pour favoriser une libération prolongée de l'implant *in situ* à base de 12-HSA, en se basant sur les études de Esposito *et al.*, 2020 et Windorf, 2017.

Composition du système	Organogélifiant	L'augmentation de la concentration en 12-HSA diminue l'effet de libération en rafale <i>via</i> la diminution de la taille des pores en surface de l'implant grâce à un mécanisme d'agrégation de fibrilles d'organogélifiant. Cette augmentation permet de produire des dépôts plus stables, uniformes et reproductibles.
	Solvant organique	Les solvants organiques employés doivent être miscible dans l'eau, les huiles et être capable de solubiliser le 12-HSA pour favoriser des formulations monophasiques plus stables et injectables. La diffusion du solvant organique hors du système cause un effet de « libération en rafale » initial. Cela peut causer la formation d'un second dépôt dans le cas de substances actives lipophiles qui peuvent précipiter au contact du fluide tissulaire aqueux. Ils doivent être biocompatibles, non toxiques et non irritants pour éviter les réactions inflammatoires diminuant la tolérance de l'implant.
	Huile	L'emploi d'huiles biodégradables et biocompatibles. La dégradation des huiles végétales par les lipoprotéines lipases va influencer notamment le relargage des substances actives hydrophiles ou très lipophiles. Une augmentation du volume de l'huile pourrait donc retarder leur libération. De plus des facteurs physiologiques (obésité, insuline) régulent l'activité de ces lipases.
	Ajout de tensioactif	L'ajout de tensioactif augmente la viscosité du système liquide injectable en dissociant les interactions organogélifiant-NMP maintenant le système en phase liquide. Cet ajout doit être contrôlé, car il influence aussi la formation et stabilisation du réseau gélifié au niveau des interactions gélifiant-gélifiant.
	Substance active	Les substances actives lipophiles seront libérées plus rapidement (par diffusion) que les substances actives hydrophiles qui nécessitent la dégradation du système et leur solubilisation éventuelle. En effet, dans le cas de substance active lipophile, le taux de libération dépendrait donc de la taille des molécules qui diffuse dans le système avec un coefficient de diffusion proportionnelle au rayon hydrodynamique de la substance active (relation de Stokes-Einstein). Les molécules très lipophiles vont donc diffuser très lentement, car leur partage favorise l'huile plutôt que les fluides tissulaires aqueux. Cependant les molécules très lipophiles et de large poids moléculaire sont rapidement absorbées par le système lymphatique (Diao and Meibohm, 2013).

Injectabilité	Forme de l'implant	<p>Les formes de l'implant doivent éviter de s'étaler post-injection pour favoriser la reproductibilité du dépôt et donc une dégradation plus uniforme et prévisible (Suh <i>et al.</i>, 2021). Une des forces de ce système d'organogel parmi les autres implants se formant <i>in situ</i> réside d'ailleurs en leur résistance à la déformation qui peut s'expliquer par leur viscosité complexe et au refroidissement rapide du système formant un réseau organisé et moins étendu post-injection.</p> <p>Divers paramètres sont donc à prendre en compte :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Le volume injecté.</u> Un volume de l'implant plus important permet d'augmenter la dose en substance active sans impact majeur au niveau de la dégradation comme pour le PLGA (autocatalyse du système). 2. <u>La vitesse d'injection.</u> La vitesse d'injection doit être contrôlée, car elle influence la forme de l'implant et donc sa surface. En effet, pour un volume donné, plus la surface volumique est élevée plus l'érosion de surface est importante. Ce phénomène entraîne un raccourcissement des voies de diffusion de la substance active et augmente donc les taux de libération de la substance active et notamment celles hydrophiles. 3. <u>Site d'injection.</u> Dépendamment du site d'injection, le degré de catabolisme, la vitesse du transport du site d'administration vers la lymphe (fonction absorbante) ou vers les capillaires sanguins diffèrera ainsi que la réponse immunitaire, qui peut être plus ou moins prononcée, ce qui peut entraîner une dégradation rapide de l'implant (Richter <i>et al.</i>, 2012). De plus, l'implant doit garder une certaine souplesse pour correspondre aux propriétés mécaniques des tissus et éviter une réaction de corps étranger limitant sa durée de vie (Carnicer-Lombarte <i>et al.</i>, 2019).
	Viscosité	<p>Les formulations doivent posséder une faible viscosité à l'injection pour éviter les douleurs au site d'injection (réactions inflammatoires, saignements). Cela peut être réduit par (i) l'ajout d'un solvant organique déstabilisant le réseau d'organogel, (ii) de faibles volumes d'injection, (iii) une faible vitesse d'injection et (iv) une faible concentration en organogélifiant. Dû à la faible microviscosité (i.e. la viscosité à l'échelle moléculaire) des organogels, Windorf <i>et al.</i> ont remarqué que la cinétique de libération des molécules de NMP était indépendante de la concentration en organogélifiant et de la quantité de NMP sous 4 heures libérant 80 % du NMP dans le système. Celui-ci peut donc être utilisé pour augmenter la concentration en organogélifiant tout en gardant une viscosité acceptable pour l'injection et une certaine balance pour éviter les irritations locales avec de grandes quantités de solvants organiques.</p>

Tableau S3 Comparaison de différentes formulations pour la libération transdermique de peptides thérapeutiques par microaiguilles

Type de MNs	Substance active	Types de matériaux	Concentration en substance active	Indication thérapeutique	Type de peau	Conclusion générale de l'étude	Références
MNs solides	– Tétrapeptide-3 – Acétyl hexapeptide-3 – Oxytocin – hexapeptide	Silicium	– Tétrapeptide-3 : 41 mg/mL et 18,6 mg/cm ² déposés sur la peau – Acétyl hexapeptide-3 : 80 mg/mL et 36,4 mg/cm ² déposés sur la peau – Oxytocin : 91 mg/mL et 41,2 mg/cm ² déposés sur la peau – Hexapeptide : 45 mg/mL et 20,5 mg/cm ² déposés sur la peau	N/A, peptide modèle	<i>Ex vivo</i> peau de porc	Les quantités cumulatives totales maximales ayant pénétré à travers la peau après 24 heures étaient de : – Tétrapeptide-3 : ~ 8,7 mg/ cm ² (46,8 %) – Acétyl hexapeptide-3 : ~ 9,9 mg/ cm ² (27,2 %) – Oxytocin : ~ 6,7 mg/ cm ² (16,2 %) – Hexapeptide : ~ 8,9 mg/ cm ² (43,4 %).	(Zhang, Qiu <i>et al.</i> 2014)
MNs se dissolvant dans la peau	GHRP-6	PVA/PVP	2,5 mg / timbre avec 8 ± 3 % et 4 ± 1 % de chargement pour les MNs de 800 et 500 µm de hauteur, respectivement –75,3 µg/cm ² déposés sur la peau pour le patch de 800 µm –42,8 µg/cm ² déposés sur la peau pour le patch de 800 µm	N/A, peptide modèle	<i>Ex vivo</i> peau de porc	Les quantités cumulatives totales maximales ayant pénétré à travers la peau après 24 heures étaient de : – MNs de 800 µm : ~ 46,8 µg/ cm ² (62,1 %) – MNs de 500 µm : ~ 20,0 µg/ cm ² (46,7 %).	(Esposito, Ac <i>et al.</i> 2021)

Tableau S4 Avantages et inconvénients des systèmes de microaiguilles se dissolvant dans la peau et des implants d'organogel *in situ* en fonction de l'effet désiré local ou systémique

Type de système		Effet désiré local	Effet désiré systémique
Microaiguilles se dissolvant dans la peau	Avantages	<ul style="list-style-type: none"> – Évite la barrière du <i>stratum corneum</i>. – Ajustement de la hauteur pour le ciblage du tissu cutané. – Dissolution rapide qui entraîne une réponse thérapeutique rapide au traitement. 	<ul style="list-style-type: none"> – Moins invasives que les injections parentérales. – Libération rapide qui favorise un taux d'absorption et une activité pharmacologique rapide.
	Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> – Formulations faiblement concentrées. – Durée d'administration sur la peau du système qui peut être prolongée compte tenu de la vitesse de dissolution des microaiguilles. – Polymères peuvent causer des érythèmes et s'accumuler au niveau hépatique / lymphatique lors d'application répétée (Ramadon <i>et al.</i>, 2021). 	
Implant d'organogel se formant <i>in situ</i>	Avantages	<ul style="list-style-type: none"> – Évite la barrière du <i>stratum corneum</i>. – Peut atteindre une encapsulation locale élevée en substance active, ce qui diminue la fréquence d'administration du traitement. – Injection localisée qui peut diminuer les doses requises pour obtenir l'effet thérapeutique escompté et réduire les effets indésirables systémiques. 	<ul style="list-style-type: none"> – Peut atteindre une encapsulation locale élevée en substance active qui est libérée après l'effet de libération en rafale de façon prolongée et donc augmente la biodisponibilité à long terme tout en diminuant la fréquence d'administration du traitement.
	Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> – Toxicité des solvants organiques et de certaines huiles qui limitent leur utilisation et le volume de l'implant injecté. De plus, la dégradation du système peut être accélérée selon la réponse locale inflammatoire, ce qui peut entraîner des effets indésirables supplémentaires locaux et systémiques. – Profil de libération complexe dans le cas de substance active lipophile, car l'effet de libération en rafale peut induire une précipitation de la molécule lipophile hors du système sous forme de dépôt (Windorf <i>et al.</i>, 2017). 	

Annexe 3 : Quatrième étude : Preparation, characterization and evaluation of organogel-based lipstick formulations : application in Cosmetics

Article accepté dans gels 7(3), 97 (2021)

Cloé L. Esposito¹ and Plamen Kirilov^{2,*}

¹ Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada ;

² Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université de Lyon (UCBL), Biologie Tissulaire et Ingénierie Thérapeutique UMR 5305 et Vecteurs Colloïdaux et Transport Tissulaire, 8 Avenue Rockefeller, CEDEX 08, 69373 Lyon, France.

*Correspondence to Plamen Kirilov, PhD, Université de Lyon (UCBL), Lyon, France.

E-mail : plamen.kirilov@univ-lyon1.fr

Contribution des auteurs

Cloé L. Esposito

Méthodologie, validation des résultats, analyse formelle, rédaction – préparation du brouillon original, rédaction-révision et édition, visualisation

Plamen Kirilov

Conceptualisation du projet, méthodologie, partie expérimentale, visualisation, validation des résultats, ressources, rédaction-révision et édition, gestion de projet, supervision

RÉSUMÉ

Le dibenzylidène-D-sorbitol (DBS) et l'acide 12-hydroxystéarique (12-HSA) sont bien connus comme organogélifiants de bas poids moléculaire (LMOGs, *low molecular weight organogelators*) capables de gélifier une phase liquide organique. Compte tenu de leurs propriétés chimiques et physiques uniques, nous avons évalué leurs effets potentiels dans de nouvelles formulations de rouges à lèvres grâce à des tests de discrimination, des études utilisant le facteur de protection solaire (SPF, *sun protection factor*) *in vitro* ainsi que des analyses thermiques, mécaniques et de texture. Le DBS et le 12-HSA ont été utilisés pour formuler quatre types de rouges à lèvres : L1 (1% DBS), L2 (10% 12-HSA), L3 (1.5% DBS) et L4 (contrôle, pas de LMOG). Les rouges à lèvres ont été testés pour la perception sensorielle avec un panel de seize personnes non entraînées. Les formules de LMOGs présentaient un facteur de protection UVA (UVA-PF) et un SPF *in vitro* plus élevés, et plus particulièrement le rouge à lèvres à base de 12-HSA. En ce qui concerne les propriétés thermiques, le rouge à lèvres à base de 12-HSA et ceux sans LMOG étaient plus sensibles à la chaleur que les rouges à lèvres thermorésistants à base de DBS. Les résultats ont également montré les propriétés viscoélastiques et thermiquement réversibles des LMOGs et leur effet d'augmentation des valeurs de « *pay-off* ». En général, l'analyse de texture a indiqué que le rouge à lèvres à base de 12-HSA était significativement plus difficile à plier par rapport au témoin, tandis que les autres formulations sont devenues plus molles et plus faciles à plier tout au long de l'étude de stabilité. Ce travail suggère l'utilisation potentielle des LMOG en tant qu'agent structurant pour les rouges à lèvres, ouvrant la voie à des compositions alternatives photoprotectrices et durables.

Mots-clés : LMOGs ; organogels; rouges à lèvres; formulation; photoprotection; analyse physico-chimique

ABSTRACT

1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol (DBS) and 12-hydroxystearic acid (12-HSA) are well-known as low-molecular-weight organogelators (LMOGs) capable of gelling an organic liquid phase. Considering their unique chemical and physical properties, we assessed their potential effects in new lipstick formulations by discrimination testing;) *in vitro* measurements of the sun protection factor (SPF); and thermal, mechanical and texture analyzes. DBS and 12-HSA were used to formulate four types of lipsticks: L1 (1% DBS), L2 (10% 12-HSA), L3 (1.5% DBS) and L4 (control, no LMOGs). The lipsticks were tested for sensory perception with an untrained panel of 16 consumers. LMOG formulations exhibited higher UVA protection factor (UVA-PF) and *in vitro* SPF, particularly in the 12-HSA-based lipstick. Regarding thermal properties, the 12-HSA-based lipstick and those without LMOGs were more heat-amenable compared to thermoresistant DBS-based lipsticks. The results also showed the viscoelastic and thermally reversible properties of LMOGs and their effect of increasing pay-off values. In general, the texture analysis indicated that 12-HSA-based lipstick was significantly harder to bend compared to control, while the other formulations became softer and easier to bend throughout the stability study. This work suggests the potential use of LMOGs as a structuring agent for lipsticks, paving the way towards more photoprotective and sustainable alternatives.

KEYWORDS

LMOGs; organogels; lipsticks; formulation; photoprotection; physicochemical analysis

1. INTRODUCTION

Over the past few years, lipsticks have gained significant popularity as one of the most attractive small luxury items, and sometimes even used as an economic indicator, following “the lipstick effect” observed in economic recessions [1]. Enhancing one’s attractiveness and appearance through lipstick relates to a wide range of colors used to fulfill customers’ needs and expectations across generations and countries [2]. While makeup trends are constantly evolving, lipstick trends are shifting in response to an increase in consumers’ personal care demands for natural, sustainable and organic cosmetics [3]. Lipsticks are commonly composed of several different components, such as vegetable oils (castor oil, almond oil), mineral derivatives (Vaseline oil, white petrolatum), pigments and waxes, which are not only used for aesthetic purposes but can also act as bioactive agents in extreme weather, e.g., UV protection [4,5]. Consequently, acceptable lipstick formulations should meet the following criteria: (1) thermal stability with a melting point generally within 55–75 °C and humidity variation to extreme maxima [6]; (2) dermatologically safe; (3) pleasant smell and taste; (4) softening at lip temperature (32 °C); (5) sufficient mechanical and physical properties with strength to maintain its structural integrity [7]; and (6) improved appearance without any defaults (air bubbles, cracks, sweating occurring during preparation steps).

Waxes are widely used in cosmetic products due to their viscoelastic, thermal and mechanical properties offering a broad range of industrial applications (in the cosmetics, pharmaceutical and agri-foods sectors) [8]. Since a wide variety of waxes derived from animal or plants are affected by environmental concerns, customers are switching to vegan-friendly and natural renewable cosmetics. Therefore, vegetable-based low molecular organogelators (LMOGs) and natural waxes have become an important alternative strategy to replace trans and saturated fats as structuring agents of edible oils [9,10]. 12-Hydroxystearic acid (12-HSA) is derived from naturally occurring ricinoleic acid, a hydroxylated fatty acid, present at 90% in castor oil and listed as a renewable source [11]. 12-HSA can form a self-assembled fibrillar network (SAFiN) upon the interaction of fibrillar crystals via non-covalent bonds such as van der Waals interactions, π - π stacking bonds and hydrogen bonds, as well as produce firm gels at a low concentration of 1% *w/w* [12]. Given its high melting point of 76 °C, viscoelastic properties offering better spreadability and its ability to stabilize active molecules such as UVB blockers in sunscreen [13], 12-HSA has been used in

cosmetic applications but is as-yet relatively unexplored for lipsticks. 1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol (DBS) is a well-known organogelator that has been in use for over 100 years, which is employed in personal care products owing to its high melting point of 225 °C and can be a suitable thickener agent in the organic phase [14]. DBS esters have been developed for lipsticks; compared to waxes and pasty compounds, they exhibited less transparency, glossy effects, stability and strength, among others, than DBS derivatives [15]. These LMOGs system permit: (1) thermoreversibility and thermostability, offering many advantages in drug delivery and long-term shelf-life systems [16]; (2) particular mechanical strength and flexibility due to their viscoelastic properties [12]; and (3) low-cost and simple preparation allowing large-scale production [16]. Moreover, the viscosity of the lipsticks has to be tunable to a high enough degree to maintain the stability of their structural network, while possessing a shear-thinning effect under mechanical stress during applications onto the lips [17]. Various studies have characterized the rheological, mechanical, physical stability and thermal behaviour of these LMOGs from diverse formulations [14,18,19]. For instance, Toro-Vasquez *et al.* studied the influence of an organogelator derived from stearic and (R)-12-hydroxystearic acid on crystalline microstructure organization and its rheological properties at two cooling rates (1 and 20 °C/min) [19]. The authors noted that the gelator structure influenced the gel microstructural organization through weak intermolecular interactions which, on a large scale, could affect its rheological properties (viscoelasticity and thixotropy). Lai *et al.* investigated the viscoelastic properties, network microstructure and morphology of DBS-based organogels using scanning electron microscopy, polarized optical microscopy, and rheology [18]. The results showed that both temperature and organogelator concentration influenced the self-assembly of DBS organogel networks. Finally, the stability was related to the thermodynamic equilibrium and was higher with high storage modulus, G' . However, the investigation of different LMOGs' physicochemical properties on the mechanical and thermal properties of lipsticks has not yet been performed.

Descriptive sensory analysis is an extremely useful tool in sensory science for obtaining both the qualitative and quantitative perceptions of a group of panelists [20]. Although sensory analysis is well established in cosmetics as a single methodology to compare different formulations according to their sensory attributes, there are few articles combining texture analysis and sensory analysis [21,22]. The purpose of this study was to use LMOGs as a substitute structuring agent to replace

part of the large amounts of waxes in lipsticks. LMOG-based formulations were compared to non-LMOG lipsticks, which instead contained waxes commonly used in lipsticks; these were characterized by descriptive sensory (spreadability, hardness, greasiness, opacity and glossiness) and textural analyses (hardness, stiffness, firmness and pay-off). Furthermore, the *in vitro* protection factor (SPF) as well as the rheological and thermal behavior of the different lipstick formulations were investigated.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

12-HSA and DBS organogelators with 99% purity were obtained from Casid[®] Vertellus (Greensboro, NC, USA) and Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA), respectively. Vegetable and vaseline oils were bought from, respectively, BASF (Coptis, Lavallois-Perret, France), and Gattefossé (Saint-Priest, France). White petrolatum and beeswax were bought from Sigma-Aldrich. Nesatol and pigments were a gift from our industrial partners. Demineralized water was used for the lipstick preparations.

2.2. Preparation of Organogel Lipsticks

Lipsticks were formulated by the moulding method using a mixture of natural ingredients reported in Table 1. Firstly, LMOGs (Figure S1) and/or waxes were added into the oily phase, homogenized using a high-speed homogenizer) at a speed of 500 rpm [6]. The phase A was heated to either 125 °C or 200 °C when formulated with DBS. Phase B was composed of beeswax and pigments and heated at 100 °C to ensure the dispersion of pigments prediluted in Nesatol. Phase B components were added to phase A at the same temperature and homogenized together. Then, the mixture, still hot, was poured into a lipstick mold, kept at room temperature and away from direct sunlight. The resulting formulations are represented in Figure S1.

2.3. *In vitro* Sun Protection Factor (SPF) Test Method

SPF was measured with a spectrophotometer (UV 2000 S, Labsphere, Bures sur Yvette, France) to analyze UV transmittance of samples. The lipsticks in the amount of 1.3 mg/cm² were spread on

polymethyl methacrylate plates (5 cm × 5 cm × 0.3 cm, Helioscience, Marseille) uniformly on their roughened surface, following the procedures present in ISO 24443:2012 [23]. Glycerin (15 µL) was used for the blank scan to calibrate the spectrophotometer before UV transmittance measurements. PMMA plates (n = 3 per sample) were then kept in a dark room for 15 min at 25 °C. Six different locations were measured for each sample and transmittance spectrum was measured in the range from UVB (290–320) to UVA (320–400 nm) at 1 nm intervals to determine the SPF value of each sample. *In vitro* evaluations of SPF and UVA-PF were calculated using the following equations [23]:

$$SPF_{in\ vitro} = \frac{\int_{290}^{400} E(\lambda) I(\lambda) d(\lambda)}{\int_{290}^{400} E(\lambda) I(\lambda) 10^{-A_0(\lambda)} d(\lambda)} \quad (1)$$

where E_λ is the erythema action spectrum at wavelength λ , I_λ is the spectral irradiance of the UV source at wavelength λ , $A_0(\lambda)$ is the mean monochromatic absorbance measurements per plate of the test product layer before UV exposure at wavelength λ and d_λ is the wavelength step (1 nm).

Each sample was exposed to the UV exposure dose, which is the initial UVA-PF (UVA-PF₀) [23] value multiplied by a factor 1.2 (J/cm²):

$$UVA - PF = \frac{\int_{320}^{400} P(\lambda) I(\lambda) d(\lambda)}{\int_{320}^{400} P(\lambda) I(\lambda) 10^{-A_e(\lambda)C} d(\lambda)} \quad (2)$$

where P_λ is the persistent pigment darkening (PPD) action spectrum, A_e is the mean monochromatic absorbance measurements plate of the test product after UV exposure and C is the coefficient adjustment determined using the SPF label (SPF *in vitro* adj [23] generated by the UV-2000's software version 1.10).

2.4. Mechanical Properties

The mechanical properties of samples were evaluated by compression testing (bending and needle probe penetration tests) or tension–compression tests (cycle count test). Samples were kept at 25 °C and 45 °C for 24 h before testing. Visual inspection and measurements were taken at day 1, 2 weeks, 4 weeks, and 8 weeks using a texture analyzer (Ta.XT+; Texture Technologies Corp., Hamilton, MA/Stable Microsystems, Godalming, Surrey, UK). All samples had an inner diameter

of 9 mm and a height of 35 mm. All measurements were carried out with six lipsticks of each type. The data (force, distance) were recorded using Exponent Stable Micro Systems software (version 8). The maximum force value, which provides the hardness of the sample, is the force required to bend the sample until it broke off at the base and for a defined distance, and this gives an indication of the brittleness of the sample. The stiffness of the sample was evaluated with the gradient of the slope during the bending action (Figure S2).

Bending test: Measurements to determine the bending force and stiffness were made using a hemispherical blade coming down at 3 mm away from the tip of the horizontally clamped sample (rolled out to its maximum length). The test and target type were set to “compression” mode and “distance”, respectively. All measurements were carried out at a trigger force of 20 g; pre-test, test and post-test speeds of 1.0, 1.0 and 10.0 mm s⁻¹, respectively; and a target value of 10 mm.

Needle probe penetration tests: This method for testing lipstick hardness and firmness is adopted from the ASTM Standard Method of test D1321-10 using a 2 mm needle probe (TA39). Measurements were performed in the following conditions: (1) the test and target type were also set on “compression” mode and “distance”, respectively; (2) a penetration depth of 10 mm; (3) a trigger force of 5 g; (4) a pre-test, test and post-test speeds of 1.0, 2.0 and 10.0 mm s⁻¹, respectively. Before the test, each lipstick was centered under the needle probe to facilitate its penetration.

Cycle count test: Pay-off test aims to determine the mass released while applying a lipstick. Pay-off is often used as an indirect measure of how well a product works from a consumer’s perspective. Briefly, a 1 cm portion of lipstick was removed, and the tip was rubbed on a piece of paper to obtain a homogeneous flat lipstick tip. The experimental setup consisted of a slot arrangement having a TTC vertical friction rig for holding the lipstick perpendicular to the paper strip (~7 cm wide) fixed at a stationary vertical plate to create a flat surface and separated with a 5 mm distance. The cycle count test was performed for 3 cycles with a speed of 5 mm s⁻¹ and a deformation distance of 60 mm. Each lipstick was pre-weighed and reweighed after the test, in order to calculate the pay-off value.

2.5. Thermal Properties

Melting point: The melting points of the lipsticks were determined by the drop-ball method (ASTM D127). Lipstick samples (2 g) were poured into a thin-walled capillary of hard glass, about 20 cm long, with an internal diameter of 0.6 mm and sealed at both ends. Each tube was dipped into a glass beaker containing water and a thermometer, and water was heated at a rate of 1 °C/min until the temperature reached 95 °C. A stainless steel ball with a diameter of 0.5 mm (1 g) was put on the surface of the lipstick. The transition temperature at which the material forms a liquid and the ball reaches the bottom is considered as the melting point (T_m).

2.6. Rheological Studies

For the rheological characterization of the lipsticks, a temperature ramp test was conducted in a stress-controlled rheometer (AR 1000, TA Instruments, New Castle, DE, USA) with parallel plate geometry (8 mm diameter and 0.7 mm gap). In order to prevent slippage of samples, both lower and upper plates were covered with sandpaper (the viscoelastic response of the sample was not affected by this layer). The rheometer was equipped with a Peltier plate regulating the temperature within ± 0.1 °C of the set value. The sample preparation steps were conducted as reported by Pan *et al.* [7]. Briefly, each uniform lipstick slice was placed between the two plates. To prevent dehydration and to maintain humidity of the sample, a thin layer of paraffin oil was placed at its surface and moist pieces of cotton were placed around each slice. The linear viscoelastic region (LVR) was determined thanks to an isothermal strain sweep ($0.001\% < \gamma < 100\%$) at a fixed angular frequency ($\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$) to identify linear and non-linear regions. Within the LVR, the dynamic storage or elastic modulus (G') and loss or viscous modulus (G'') are independent of the strain amplitude (1%). The temperature ramp test was performed in the LVR at the temperature range of 20–150 °C for all lipsticks, according to a melting point study at a heating rate of 1 °C min^{-1} and at a frequency of 1 Hz. This test aimed to evaluate the dynamic storage or elastic modulus (G'), loss or viscous modulus (G'') and the loss tangent $\tan \delta$ during temperature variation.

2.7. Sensory Analysis

Sixteen female participants aged between 18 and 25 years who frequently used lipstick products were recruited for sensory evaluation. The overall sensory analysis was performed at room

temperature (25 ± 2 °C/60% RH \pm 5%). The samples were evaluated in randomized order and lipstick identified anonymously. Sensory analysis consisted of a nine-point hedonic scale (1–9) whereby sensory attributes spreadability, hardness, opacity, glossy and greasy effects were evaluated. Five designed lipsticks formulations (Table 1) were evaluated by the panel of female participants. A commercial lipstick (REF, L’Oréal Nude, TD023, Color Riche 235) was included to test the sensitivity of the recruited panels. Each panelist filled out questionnaires with parameters scored between 1 and 9, where 9 represented the highest intensity of the parameter.

2.8. Statistical Analysis

Analysis of variance was performed on the *in vitro* SPF, mechanical / rheological properties and pay-off using Graphpad Prism 7.0 and for sensory data using PanelCheck V1.4.2 software. The difference of SPF among lipstick formulations was analyzed for significance using one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison post hoc test. Regarding mechanical profiles and pay-off test, statistical tests were performed by paired t-test and/or one-way ANOVA followed by Tukey test. The difference of Tgel or T_m^{rheology} among lipstick formulations was analyzed for significance using the Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post hoc test. For sensory analysis, Friedman’s two-way ANOVA followed by Fisher’s LSD test was used with panelist and product effect interactions as variation factors. Principal component analysis (PCA) was applied to establish the relationship between attributes and lipsticks along with mean ratings of attributes from the sensory panel vs. those from the texturometer. A value of $p < 0.05$ was regarded as significant, and data were represented as average value \pm SD.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of Organogelators on *in vitro* SPF and UVA-PF

In vitro SPF and UVA-PF were evaluated in all lipstick formulations. Since some organogels have “self-healing” or thixotropic properties, the formulations were able to easily spread and form a protective film layer over the skin rapidly when the pressure was withdrawn. In Figure 1A, the photoprotection efficiency of lipsticks is depicted through the UV-absorbing profile of L1, L2, L3, L4 and L5 formulations in the UVB (290–320 nm), UVA II (320–340 nm) and UVA I (340–400

nm). L2 formulation containing 10% 12-HSA as organogelator showed higher UV-absorbing ability in comparison with the other formulations containing DBS as organogelator (L1 and L3) or no organogelator (L4, L5). This difference in absorbance intensity could be related to the optical properties of the sticks, and in particular to their diffusing capacity. Indeed, organogels contained 10 wt% of 12-HSA, which made them very diffusing (transfused aspect) and increased their capacity to absorb the UV radiation [24].

In addition, within the absorbance range from 0.2 to 0.6, the UV-absorbing capacity of formulations containing DBS was greater than lipsticks without organogelator. Many studies emphasized that the level of protection provided by a formulation may not depend only on SPF but also on its absorption spectrum and UVA-PF [25]. Indeed, UVA is involved among others in the UV-induced immunosuppression, in the generation of DNA damage and in cellular signaling pathways that regulate responses to DNA damage in melanocytes [26]. Regulatory guidelines in the European Union recommend a minimum UVA-PF/SPF ratio of at least 1:3 and an *in vitro* critical wavelength (CW) ≥ 370 nm [27]. All formulations were in agreement with these regulations except for L4 and L5 formulations, which failed to provide a broad-spectrum filter. *In vitro* SPF and UVA-PF were calculated to be, respectively, in the range 290–400 nm (Figure 1B) and 320–400 nm (Figure 1C), indicating that formulations with LMOGs, and more particularly, the 12-HSA formulation, had the highest SPF compared with the others. On the other hand, SPF and UVA-PF of L3 were higher than L1 with an improvement of SPF value (15.0%) due to its higher DBS content, but this enhancement was statistically not significant. In light of these results, organogelators can offer photoprotective effects in the manner of UV filters based on their physical structure through non-covalent interactions. However, SPF-15 or higher is the recommended blocking strength to prevent risk of cancer or skin ageing [28]. To some extent, the combined use of natural broad-spectrum sunscreens should be considered for further investigations. Nevertheless, these findings provide additional evidence of the photoprotective effect of 12-HSA that appeared to increase the UVB radiation absorption of a sunscreen formulation of gelled particles containing an immobilized organic filter (2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate) due to the formulation diffusing capacity related to their viscous consistency [13].

3.2. Instrumental Texture Analysis (Hardness, Stiffness, Firmness and Pay-Off) and Stability Studies

Lipstick instrumental attributes (hardness, stiffness and firmness) obtained by texture profile analysis (TPA) were reported based on the measurement of the maximum force to compress the lipstick. The effect of lipstick ingredients, storage temperature and storage time during TPA were evaluated (Figure 2). Hardness depends generally on the type and amount of waxes in the formulation [21], the oil polarity [29] and the oil:wax ratio [30]. In all lipstick formulations, the oil:wax ratio was constant for L1 and L4 formulations but lower than $L2 < L3$ due to the addition of white petrolatum. Generally, hardness of L2 at 25 °C and L3 at 25 / 45 °C did not change significantly over 12 weeks. However, L2 at 45 °C, and L1 and L4 formulations at 25 / 45 °C became softer after 12 weeks ($p < 0.05$) (Figure 2A). Furthermore, the difference in hardness between L1 at 25 °C and 45 °C at weeks 4 and 8, L3 at 25 °C and 45 °C at weeks 4 and 12, as well as for L4 at 25 °C and 45 °C during the whole study was statistically significant and attributable to softer lipsticks at 45 °C ($p < 0.05$). L4 was statistically significantly weakened and easier to bend than the other formulations. A commercial formulation (L5) was also tested in a single time point on day 1 and at both temperatures, as a reference formulation. Hardness of L5 was similar to L3 at 25 °C ($p > 0.05$) and closest to L4 at 45 °C. Acceptable solid lipsticks for the consumers should achieve at least 30 gram-force (gf) at 20 °C for 8.1 and 12.7 mm diameter stick, as reported for current patented lipsticks [31–33]. Consequently, hardness values of all lipsticks were considered acceptable since values were above those of the commercial formulation or above 30 gf at 25 °C. The material properties of DBS organogels (L1 and L3) and especially the formulation without organogelator (L4) were also affected by higher temperatures. Indeed, at higher temperatures waxes become softer and are responsible for weak network strength [34]. Interestingly, the presence of LMOG as well as higher organogelator concentration increased thermal stability of the global network. These results were previously confirmed in different studies reported by Esposito *et al.*, wherein 12-HSA-based organogels heated up above Tgel temperature undergo a molecular reorganization due to disruption of physical interactions between organogelator molecules [16].

Stiffness of the sample refers to its ability to resist elastic deformation during the bending action and is dependent on the elastic modulus (Young's modulus). At 25 °C and 45 °C, L4 was the less stiff lipstick throughout the study (Figure 2B). At 25 °C, the stiffness of L1 and L2 were generally

higher compared to the others, meaning they were less flexible, whereas L3 values were closest to the control. At 45 °C, L4 became less stiff over the weeks, indicating that these lipsticks containing no DBS possess the greasier and lubricant properties of than those of wax/oils formulation [35]. Lastly, firmness of the lipsticks was also affected by the presence of LMOG molecules and especially their weak physical interactions with the oily phase in the gel network structure, as reported [36]. This mechanical property is an important parameter that can play a role in tuning pay-off, friction and softness [35]. L3 exhibited the highest firmness and values remained constant compared to all other lipsticks over 12 weeks at 25 °C (Figure 2C). L4 values at 25 and 45 °C were significantly lower than L1–L3 lipsticks ($p < 0.0001$), suggesting that L4 and even L5 (having the lowest firmness values at day 1) were the softest lipsticks during the study. This finding could be explained as the temperature increases near their melting point temperature. At 45 °C, L1 and L3 formulations exhibited significantly softer texture throughout the weeks ($p < 0.05$). As expected, the presence and higher concentration of LMOGs enhance firmness. However, as temperature increased, the firmness of LMOG-based formulations with low organogelator concentration decreased, probably due to oil losses from the network [37].

From a consumer's point of view, a lipstick product must comply with desired mechanical strength and pay-off characteristics to withstand the quality standard and requirement for an easy-glide application. Regarding requirements, the lipstick should have at least a pay-off of 0.0001 gm/cm² [38]. Although a lower pay-off results in low amount of product attributes (color, durability, coverage) transferred, a balanced low/high pay-off needs to be considered to reduce product consumption and undesired sensation (waxy buildup). In addition, photoprotective formulations have to fulfil various requirements such as a high pay-off and a firm consistency with respect to their efficient photoprotective capacity [39]. L2 > L3 > L1 showed the higher pay-off to fabric results, whereas L4 < L5 had lower amounts transferred on paper during the experiments ($p < 0.0001$) (Figure 3). However, it should be noted that all pay-off lipsticks had passed the minimum requirement. The higher pay-off values between LMOG-based and "classical" lipstick formulations could be explained by a higher frictional force change attributed to gel samples [40].

Considering the overall mechanical attributes, LMOGs have great potential to replace part of waxes in lipstick formulations and to contribute to attaining the desired textural properties for photoprotective cosmetics.

3.3. The Combined Use of Thermal and Rheological Analyses on the Dynamic Structure Network of Lipsticks

The temperature sweeps are displayed in Figure 4 and were performed in LVR regime to assess the effect of organogel-based lipsticks between 15 °C and 150 °C on the dynamic elastic behaviour (G') and the dynamic viscous behaviour (G''). The organogel-based lipsticks exhibited thermoreversibility and viscoelastic properties. According to the classical viscoelasticity theory, the initial rise in G' is due to 3D network formation, while onset sol-gel phase transition (T_{gel}) of each lipstick can be estimated from the abrupt increase in G' . Indeed, T_{gel} is determined by the G'/G'' crossover point from $G' < G''$ to $G' > G''$ of each cooling curve. A crossover point of G' and G'' is identified as the gel melting point (T_m). Upon cooling, the resulting disordered fluid-like state of the gel undergoes a sol-gel transition generating a viscoelastic solid-like structure of crystalline organogelator molecules [12]. L1 and L3 showed a crossover point at high temperatures underlying a more stable network with highest melting stability [7,41], while L2 and especially L4 and L5 were more heat amenable and prone to soften at low temperature.

T_{gel} and T_{melt} values determined in the rheological study were compared to T_m values obtained from melting point and are displayed in Table 2. The T_m values determined by melting point and rheology were in close agreement and were related to the breakage of particle interactions holding up the 3D structure. It was also noted a small but significant increase in the T_{gel} value (p value < 0.05) and in a maximal G' of 12.9 times, with the addition of DBS organogelator at 1.5% (w/w) in the lipstick network (L3), compared with the control (L4) (Table 2). Higher G' values are typically associated with stronger a three-dimensional gelled network [42].

The gelation point can also be observed with the $\tan \delta$ (i.e., G''/G' , damping coefficient) at $\tan (\delta) = 1$, as a simple indicator. Figure S3 show the loss tangent curves of the lipstick formulations (L1 to L5). At temperatures lower than 50 °C for L2, L4 and L5 or 129 °C for DBS-based lipsticks, respectively, $\tan (\delta) < 1$, indicating that the sample behaves in a manner more similar to a solid

with elastic properties, while at $\tan(\delta) > 1$ the organogels are viscous liquid. When comparing gelation points obtained during the heating and cooling ramp test, there was a significant decrease ($p < 0.05$) in gelation points for L1, L2, L3, L4 and L5 formulations (14.5, 13.04, 3.47, 0.99 and 12.5%, respectively) for cooling compared to heating sweep. This difference between gelation point values during melting and crystallization processes highlights the hysteresis effect [42] and may be due to the heat dissolution of waxes and LMOGs clusters during the heating process [44], delayed kinetically by hydrogen-bond breaking. Nevertheless, all samples showed acceptable thermal stability and could be considered as heat-resistant lipsticks.

3.4. Relationships between Descriptive Sensory and Instrumental Analysis of Organogel-Based Lipsticks

All organogel-based formulations (L1–L3), as well as control (L4) and a commercial formulation (L5), have been evaluated for sensorial attributes as response with a panel of consumers. This quantitative description analysis (QDA) aimed to (i) characterize the sensory properties profile of the produced lipsticks and (ii) perform a principal component analysis (PCA) for mapping the main similarities and differences between samples and their sensory attributes. All tested attributes, spreadability, hardness, opacity, glossiness and greasiness, were tested by assessors through an objective evaluation and scored following the intensity of each attribute for each product (corresponding to a numerical value between 0 and 9). The performance of the panel was evaluated through different criteria: consensus (individual product evaluation) and discrimination between product and attributes. F-values and p -values, according to two-way ANOVA followed by Fishier LSD post hoc test, were appropriate to measure discrimination power and are reported in Table 3. Regarding panelist effect and attribute discrimination, panelists were able to significantly discriminate attributes reaching a consensus (p -values < 0.001), while all attributes were considered discriminating (p -values < 0.001) among the formulations. From mean \pm standard deviation values (Table 3) and spider-plot of the evaluated attributes for each formulation (Figure 5A), greasiness and glossiness sensory attributes are the most discriminative ones, varying from 1.0 to 7.8 and 1.0 to 7.5, respectively. The L2 lipstick formulation showed a low glossiness effect compared to the other L1 and L3 DBS-based formulations. L3 lipstick containing the highest amount of vaseline oil (48.5% w/w) compared to other ingredients such as white petroleum (L1) and organogelator (L2) was assessed as the least greasy formulation. Medium desired greasiness was achieved for

LMOG-based formulations (L1–L2) with an average of 5.6 points. All lipsticks expressed a good spreadability with non-significantly different values ranging from 6.7 to 8.1 points. The hardest and softest lipsticks were L2 and L1/L4, respectively, which was in agreement with texture analysis, except for L1 at day 1. This exception may have been caused by the lack of ingredients to provide a soft touch, despite a consensus reached between panelists with low value variability.

The PCA was also performed on both sensory and instrumentals of pick-up sensory properties (hardness, firmness, stiffness) data [45], to facilitate the selection of raw materials to formulate desired lipsticks (Figures 5B,C and S4). The two principal components (PC1 and PC2) accounted for 93.1% of the total variance between samples. The plot used to read PCA scores of each sample (represented as dots) allows the identification of the positioning of the sensory attributes and the identification of the more relevant sensory descriptors close to + 1 and –1, and thus contributes mostly to PC (Figure 5B). As observed in Figure 5B, the glossy aspect (–0.969) contributed negatively to PC1, while hardness (0.750) contributed positively. Moreover, spreadability (0.791) contributed positively to PC2 whereas greasy effects (–0.859) contributed negatively. According to Buehler *et al.*, correlation between two variables and two component analysis is shown as a vector, which indicates the strength of the relationships following the vector length and whether the correlation is positive or negative according to its direction [46]. Since the main attributes are identified, the loading plot (Figure 5C) displays more information about the relationships between sensory descriptors and lipstick formulations. It seems there is a covariance between different sensory attributes. Indeed, a higher hardness is generally associated with a lower glossy effect, as is observed for L2. It is also interesting to notice that all formulations are different from each other's and do not form a cluster. L2 and L3 formulations are less related to greasy effect, while L3, L1 and L4 are related to glossiness.

Another loading plot (Figure S4) was performed combining both texture characteristics and sensory descriptors, with numerical variables represented as lines and dotted lines, respectively. All instrumental analysis—hardness (0.973), firmness (0.792), stiffness (0.907) and hardness from sensory analysis (0.657)—contributed positively to PC1, while opacity (–0.831) and the glossy effect (–0.630) contributed negatively (Figure S4A). Furthermore, instrumental hardness is essentially correlated positively with firmness. According to the representation in Figure S4B,

formulations can be split into two different clusters of sensory and instrumental attributes: (1) L2 is characterized by instrumental measures, primarily hardness and firmness, while L4 is negatively correlated to these parameters; (2) L1 and L3 are much more related to firmness, and to some extent glossiness. Overall, the main discriminative attributes for the analyzed lipsticks were greasiness and glossiness. The experimental and sensory hardness parameters were in total agreement for the hardest and softest formulation.

4. CONCLUSION

The main objective of this study was to evaluate the effect of LMOGs, as a substitute alternative to replace part of waxes, on the thermal, rheological, sensory and performance (textural and photoprotection efficiency) properties of the lipstick formulations. Despite growing concerns about lip cancer and the importance of photoprotection, there is still a need for novel strategies to design LMOG lipsticks. Indeed, the *in vitro* SPF experiments showed that LMOGs and especially the 12-HSA lipstick formulation significantly increase *in vitro* SPF and UVA-PF compared to lipsticks based on waxes. The thermal properties of lipstick could be determined in agreement for the two methods employed (rheology, melting point) and showed that DBS-based organogels were more heat stable, which is directly correlated to the resistance of the organogel structure to deformation. Furthermore, all organogels displayed typical viscoelastic and hysteresis behaviour, that may be explained by the difference in the dynamic structure organization and disorganization through hydrogen bonding of the gel network.

Regarding texture characteristics, 12-HSA-based lipstick was significantly harder to bend than the control formulation (without organogelator) and stable at 25 °C, while other lipsticks (except L3) generally became softer for both temperatures throughout the long-term study (12 weeks). Finally, we found that the higher firmness was correlated to the presence and the increase in concentration of LMOGs at 25–45 °C. Any future investigations of the effect of LMOG lipsticks on friction during tribological studies will provide a potential correlation of glide (lubricating properties) with other sensory factors. By combining sensory attributes (glossy) and instrumental parameters (hardness, firmness), we were able to cluster the formulations. Considering the overall mechanical, thermal and photoprotection attributes, LMOG-based formulations have great potential to replace

part of waxes in lipsticks, while offering tunable textural parameters to target a large number of customers.

Credit authorship contribution statement

Conceptualization, P.K.; methodology, C.L.E. and P.K.; validation, C.L.E. and P.K.; formal analysis, C.L.E.; investigation, P.K.; resources, P.K.; data curation, P.K.; writing – original draft preparation, C.L.E.; writing-review and editing, C.L.E. and P.K., visualization, C.L.E. and P.K.; supervision, P.K.; project administration, P.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding : This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement : Not applicable.

Informed Consent Statement : Not applicable.

Data Availability Statement : The study did not report any data.

Conflicts of Interest : The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hill, S.E.; Rodeheffer, C.D.; Griskevicius, V.; Durante, K.; White, A.E. Boosting beauty in an economic decline: Mating, spending, and the lipstick effect. *J. Pers. Soc. Psychol.* **2012**, *103*, 275–291.
2. Stephen, I.D.; McKeegan, A.M. Lip colour affects perceived sex typicality and attractiveness of human faces. *Perception* **2010**, *39*, 1104–1110.
3. Amberg, N.; Fogarassy, C. Communication green consumer behavior in the cosmetics market. *Resources* **2019**, *8*, 137–155.
4. Gfeller, C.F.; Wanser, R.; Mahalingam, H.; Moore, D.J.; Wang, X.; Lin, C.B.; Shanga, G.; Grove, G.; Rawlings A.V. A series of *in vitro* and human studies of a novel lip cream formulation for protecting against environmental triggers of recurrent herpes labialis. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* **2019**, *12*, 193–208.
5. Westfall, A.; Sigurdson, G.T.; Giusti, M.M.; Antioxidant, U.V. protection, and antiphotaging properties of anthocyanin-pigmented lipstick formulations. *J. Cosmet. Sci.* **2019**, *70*, 63–76.
6. Poucher, W.A.; Butler, H. *Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps: Volume 3: Cosmetics*; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012.
7. Pan, S.; Germann, N. Thermal and mechanical properties of industrial benchmark lipstick prototypes. *Thermochim. Acta* **2019**, *679*, 178332–178338.
8. Chuberre, B.; Araviiskaia, E.; Bieber, T.; Barbaud, A. Mineral oils and waxes in cosmetics: An overview mainly based on the current European regulations and the safety profile of these compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2019**, *33*, 5–14.
9. Mandu, C.; Arellano, D.; Santana, M.H.; Fernandes, G. Waxes used as structuring agents for food organogels: A review. *Grasas y Aceites* **2020**, *71*, 344–345.
10. Siraj, N.; Shabbir, M.A.; Ahmad, T.; Sajjad, A.; Khan, M.R.; Khan, M.I.; Butt, M.S. Organogelators as a saturated fat replacer for structuring edible oils. *Int. J. Food Prop.* **2015**, *18*, 1973–1989.
11. Mutlu, H.; Meier, M.A.R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2010**, *112*, 10–30.
12. Co, E.; Marangoni, A. Organogels: An alternative edible oil-structuring method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 749–780.

13. Kirilov, P.; Rum, S.; Gilbert, E.; Roussel, L.; Salmon, D.; Abdayem, R.; Serre, C.; Villa, C.; Haftek, M.; Falson, F.; Pirot, F. Aqueous dispersions of organogel nanoparticles—Potential systems for cosmetic and dermo-cosmetic applications. *Int. J. Cosmetic. Sci.* **2014**, *36*, 336–346.
14. Okesola, B.; Vieira, V.; Cornwell, D.; Whitelaw, N.; Smith, D. 1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol (DBS) and its derivatives—Efficient, versatile and industrially-relevant low-molecular-weight gelators with over 100 years of history and a bright future. *Soft Matter*. **2015**, *11*, 4768–4787.
15. Luukas, T.; Malle, G. Compounds of Dibenzylidene Sorbitol Ester Type, Process of Preparation, Use, Compositions Comprising Them and Cosmetic Treatment Method. WO Patent 10,743, L'oréal, Asnières-sur-Seine, 08/15/2013.
16. Esposito, C.L.; Kirilov, P.; Roullin, V.G. Organogels, promising drug delivery systems: An update of state-of-the-art and recent applications. *J. Control. Release* **2017**, *271*, 1–20.
17. Pan, S.; Germann, N. Mechanical response of industrial benchmark lipsticks under large-scale deformations. *Acta Mech.* **2020**, *231*, 3031–3042.
18. Lai, W.-C.; Wu, C.-H. Studies on the self-assembly of neat DBS and DBS/PPG organogels. *J. Appl. Polym. Sci.* **2010**, *115*, 1113–1119.
19. Toro-Vazquez, J.F.; Morales-Rueda, J.; Torres-Martínez, A.; Charó-Alonso, M.A.; Mallia, V.A.; Weiss, R.G. Cooling rate effects on the microstructure, solid content, and rheological properties of organogels of amides derived from stearic and (R)-12-hydroxystearic acid in vegetable oil. *Langmuir* **2013**, *29*, 7642–7654.
20. Yap, K.C.; Aminah, A. Sensory analysis of lipstick. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2011**, *33*, 245–250.
21. Kasparaviciene, G.; Savickas, A.; Kalveniene, Z.; Velziene, S.; Kubiliene, L.; Bernatoniene, J. Evaluation of beeswax influence on physical properties of lipstick using instrumental and sensory methods. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* **2016**, *3*, 1–8.
22. Vieira, G.S.; Lavarde, M.; Fréville, V.; Rocha-Filho, P.A.; Pensé-Lhéritier, A.-M. Combining sensory and texturometer parameters to characterize different type of cosmetic ingredients. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 156–166.
23. International Standards Organization, C. Determination of Sunscreen UVA Photoprotection *In vitro*. ISO 24443:2012 [Publication Date: June, 2012]. Available online: <https://www.iso.org/standard/46522.html> (11/10/2020).

24. Chaouat, C.; Kirilov, P.; Franceschi-Massant, S.; Perez, E.; Giraud, I.; Rico-Lattes, I. Nanoparticles of gelled sunscreen oil: Elaboration and physicochemical characterization. *Jorn. Com. Español Deterg.* **2012**, *24*, 94–101.
25. Moyal, D.D.; Fourtanier, A.M. Broad-spectrum sunscreens provide better protection from solar ultraviolet–simulated radiation and natural sunlight–induced immunosuppression in human beings. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2008**, *58*, S149–S154,.
26. Khan, A.Q.; Travers, J.B.; Kemp, M.G. Roles of UVA radiation and DNA damage responses in melanoma pathogenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **2018**, *59*, 438–460.
27. Pelizzo, M.; Zattra, E.; Nicolosi, P.; Peserico, A.; Garoli, D.; Alaibac, M. *In vitro* evaluation of sunscreens: An update for the clinicians. *ISRN Dermatol.* **2012**, 1–10.
28. Dale Wilson, B.; Moon, S.; Armstrong, F. Comprehensive review of ultraviolet radiation and the current status on sunscreens. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2012**, *5*, 18–23.
29. Imai, T.; Nakamura, K.; Shibata, M. Relationship between the hardness of an oil–wax gel and the surface structure of the wax crystals. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2001**, *194*, 233–237.
30. Huynh, A.; Maktabi, B.; Reddy, C.M.; O’Neil, G.W.; Chandler, M.; Baki, G. Evaluation of alkenones, a renewably sourced, plant-derived wax as a structuring agent for lipsticks. *Int. J. Cosmetic Sci.* **2020**, *42*, 146–155.
31. Bui, H.S.; El-Khoury, R.J. Solid Lipstick Composition Having Improved Hardness. WO Patent 193,415, L’Oréal, Alexandria, Virginia, USA, 12/23/2015.
32. Bui, H.S.; Kanji, M. Emulsion Lipstick Composition. WO Patent 077,889, L’Oréal, Alexandria, Virginia, USA 07/08/2010.
33. Roberto, C.; Ferrari, V.; Mattox, B.; Pinzon, C.O.; Thau, P. Cosmetic Composition Comprising Hetero Polymers and a Solid Substance and Method of Using Same. WO Patent 20022047608A3, L’Oréal SA, Paris, France, 06/24/2002.
34. McIntosh, K.; Smith, A.; Young, L.; Leitch, M.; Tiwari, A.; Reddy, C.; O’Neil, G.; Liberatore, M.; Chandler, M.; Baki, G. Alkenones as a Promising Green Alternative for Waxes in Cosmetics and Personal Care Products. *Cosmetics* **2018**, *5*, 34–42.
35. Richard, C.; Tille-Salmon, B.; Mofid, Y. Contribution to interplay between a delamination test and a sensory analysis of mid-range lipsticks. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2016**, *38*, 100–108.

36. Ghan, S.Y.; Siow, L.F.; Tan, C.P.; Cheong, K.W.; Thoo, Y.Y. Influence of Soya Lecithin, Sorbitan and Glyceryl Monostearate on Physicochemical Properties of Organogels. *Food Biophys.* **2020**, *15*, 386–395.
37. Martinez, R.M.; Rosado, C.; Velasco, M.V.R.; Lannes, S.C.S.; Baby, A.R. Main features and applications of organogels in cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2019**, *41*, 109–117.
38. *A Consumer Voice Report. Lipsticks More to Them Than the Colour and the Cream*; Consumer Voice: 2014, Ontario, ON, Canada, pp. 7–12.
39. Maier, H.; Schaubberger, G.; Brunnhofer, K.; Hönigsmann, H. Assessment of thickness of photoprotective lipsticks and frequency of reapplication: Results from a laboratory test and a field experiment. *Br. J. Dermatol.* **2003**, *148*, 763–769.
40. Shinomiya, K.; Okawara, H.; Kikuchi, K.; Mayama, H.; Nonomura, Y. Friction dynamics of hydrogel substrates with a fractal surface: Effects of thickness. *ACS Omega* **2020**, *5*, 16406–16412.
41. Tavernier, I.; Doan, C.D.; Van de Walle, D.; Danthine, S.; Rimaux, T.; Dewettinck, K. Sequential crystallization of high and low melting waxes to improve oil structuring in wax-based oleogels. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 12113–12125.
42. Patel, A.R.; Mankoc, B.; Bin Sintang, M.D.; Lesaffer, A.; Dewettinck, K. Fumed silica-based organogels and ‘aqueous-organic’ bigels. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 9703–9708.
43. Carranca, M.; Martín Prieto, V.; Kirilov, P. Colloidal Dispersions of Gelled Lipid Nanoparticles (GLN): Concept and Potential Applications. *Gels* **2017**, *3*, 33–45.
44. Rocha, J.C.B.; Lopes, J.D.; Mascarenhas, M.C.N.; Arellano, D.B.; Guerreiro, L.M.R.; da Cunha, R.L. Thermal and rheological properties of organogels formed by sugarcane or candelilla wax in soybean oil. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 318–323.
45. Civille, G.; Dus, C. Evaluating tactile properties of skincare products: A descriptive analysis technique. *Cosmet. Toilet.* **1991**, *106*, 83–88.
46. Buehler, D. M.; Versteegh, M. A.; Matson, K. D.; Tieleman, B. I. One problem, many solutions: simple statistical approaches help unravel the complexity of the immune system in an ecological context. *PloS One* **2011**, *6*, e18592.

Legends to figures

Figure 1. Ultraviolet photoprotective performance of lipsticks. UV absorbance spectra profile (A), *in vitro* SPF (B) and UVA protection factor (UVA–PF), critical wavelength (λ_{cr}) (C) SPF, λ_{cr} and UVA–PF values are expressed as mean \pm SD of six experimental measurements per lipsticks. An asterisk indicates a statistical difference between formulations, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, one-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparisons post hoc test for (B). Bars that do not share similar letters denote statistical significance, $p < 0.05$.

Figure 2. Mechanical profiles of lipsticks. Hardness (A), stiffness (B) and firmness (C) during stability studies carried out for 1, 28, 56, and 84 days, at 25 and 45 °C. Force values are expressed as mean \pm SD of $n = 6$ lipsticks per group. Different lower-case letters indicate a significant difference for hardness, firmness or stiffness between days of the same formulation at 25 °C and different capital letters indicate a significant difference among different days of the same formulation at 45 °C (one-way ANOVA, $p < 0.05$). Asterisk indicates a statistical difference between 25 and 45 °C for the same formulation in the same day. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$, paired t-test.

Figure 3. Pay-off to fabric of lipsticks (expressed in mg, mean \pm SD, $n = 6$). An asterisk indicates a statistical difference between formulations. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, One-way ANOVA followed by Tukey’s multiple comparison test. Bars that do not share similar letters denote statistical significance, $p < 0.05$.

Figure 4. Temperature sweep experiments. Heating (A) and cooling (B) cycles for lipsticks L1 (blue squares), L2 (red circles), L3 (green triangles), L4 (purple diamonds) and L5 (black cross). Linear elastic (G') and viscous (G'') moduli are shown as plain and open symbols, respectively. Each temperature ramp was performed with a heating rate of 1 °C min^{-1} , at a fixed angular frequency of 1 rad s^{-1} and a 1% strain within the LVR regime.

Figure 5. Sensory evaluation results of the produced and commercial lipsticks after application. Spider-plot (A), correlation loadings of the principal component analysis (PCA) for all the sensory

attributes (B), and biplot representation of PCA illustrating relationship between attributes and formulations (C).

Table 1. The set of component formulations and functional categories of their ingredients.

Ingredients	Functional Category	Quantity (% <i>w/w</i>)				
		L1	L2	L3	L4	L5
Phase A						
Vaseline oil	Occlusive agent	0	40	48.5	0	
Castor oil	Moisturizer	14	20	20	15	
Almond oil	Emollient	45	20	20	45	L'Oréal Nude, TD023, Color Riche 235
White petrolatum	Lubricant	30	-	-	30	
DBS	LMOG	1	-	1.5	-	
12-HSA	LMOG	-	10	-	-	
Phase B						
Beeswax	Thickening agent	5	5	5	5	
Pigments	Colouring	5	5	5	5	

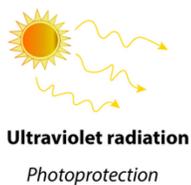
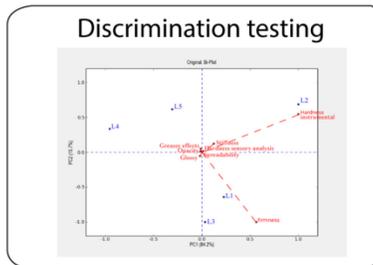
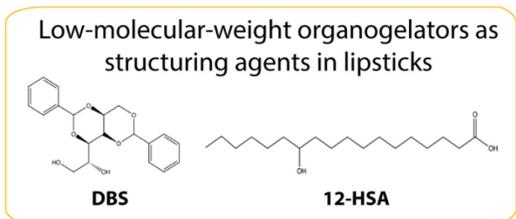
Table 2. Gelling (Tgel), melting (Tm) temperatures obtained with rheology (determined as reported) [16,43], melting point technique and maximum G' recordings of lipstick formulations.

Formulations	Tgel (°C)	Tm _{rheology} (°C)	Tm _{melting point} (°C)	Maximum G' Value (Pa)	Temperature at Which Max. G' Value Was Recorded (°C)
L1	119.6 ± 0.5	120.3 ± 0.6	>95	10,502	32
L2	61.8 ± 0.7	62.1 ± 0.4	62	6985	32
L3	127.2 ± 1.1	127.5 ± 0.5	>95	12,398	63
L4	50.7 ± 0.4	50.6 ± 0.7	49	963	37
L5	56.6 ± 0.4	55.7 ± 0.6	54	1295	36

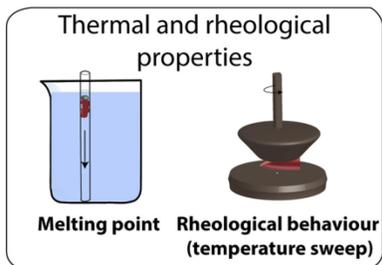
Table 3. Results of two-way ANOVA and Fisher’s LSD test examining the influence of product effects according to panel responses.

Formulations	Effects	Statistics	Attributes				
			Spreadability	Hardness	Opacity	Glossiness	Greasiness
L1		Means	7.1	4.3	4.2	7.1	5.6
		SD	0.64	0.92	1.43	0.87	1.64
L2		Means	8.1	8.1	3.3	1.0	5.5
		SD	0.82	0.82	1.01	0.0	1.77
L3		Means	8.1	6.1	4.3	7.5	1.0
		SD	0.82	1.33	0.92	1.09	0.0
L4		Means	6.7	4.3	6.3	7.0	7.8
		SD	1.01	1.24	1.13	1.09	1.24
L5		Means	7.9	6.8	7.1	4.0	7.5
		SD	0.96	1.15	0.64	1.53	1.37
	Panellist	F value	11.22	13.89	10.24	7.35	9.77
	Product		27.11	125.87	103.04	257.85	176.16
	Panellist	<i>p</i> value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Product		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Graphical abstract



Step 2



Step 1

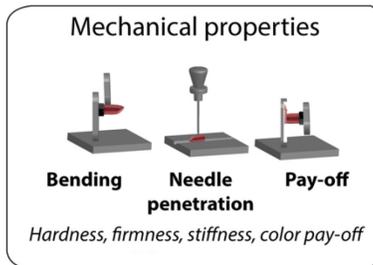
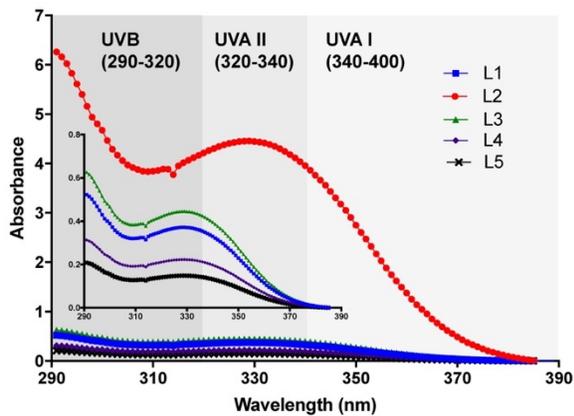
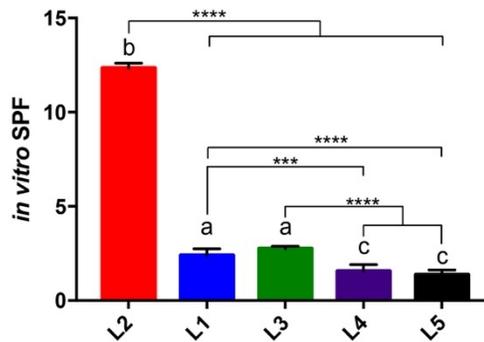


Figure 1.

(A)



(B)



(C)

Ingredient	λ_{cr} (nm)	UVA-PF
L1	371.8 ± 0.8	3.52 ± 0.09
L2	377.2 ± 0.8	39.33 ± 0.87
L3	377.1 ± 0.7	4.13 ± 0.08
L4	362.8 ± 0.6	1.99 ± 0.09
L5	356.4 ± 0.6	1.44 ± 0.07

Figure 2.

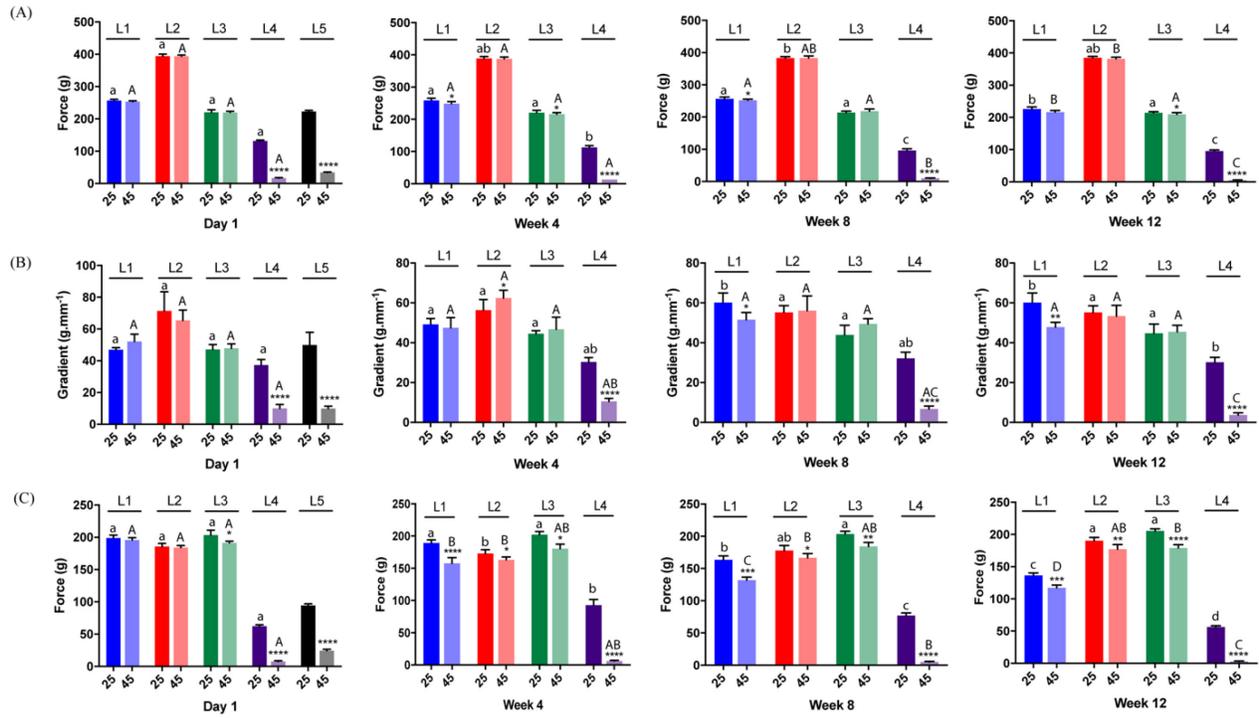


Figure 3.

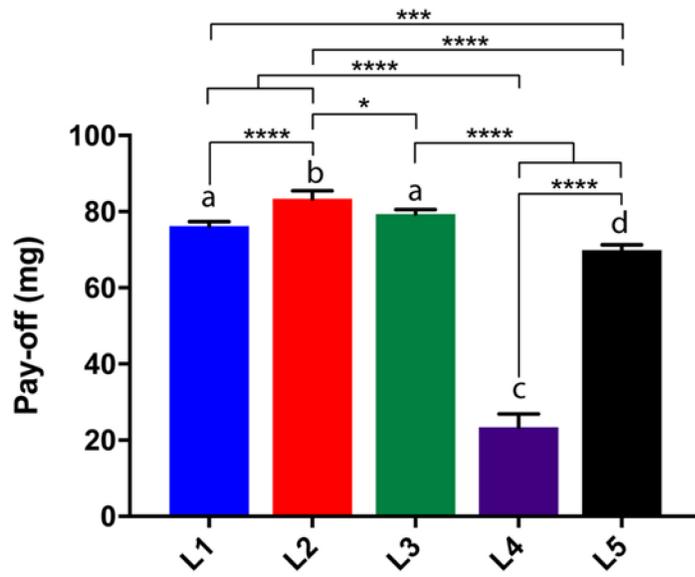


Figure 4.

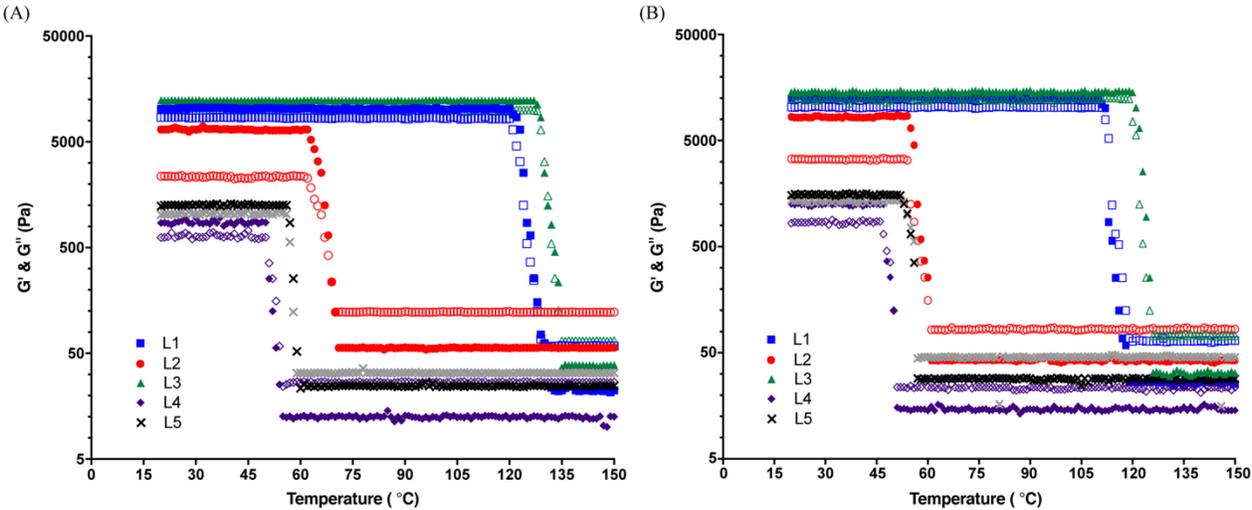
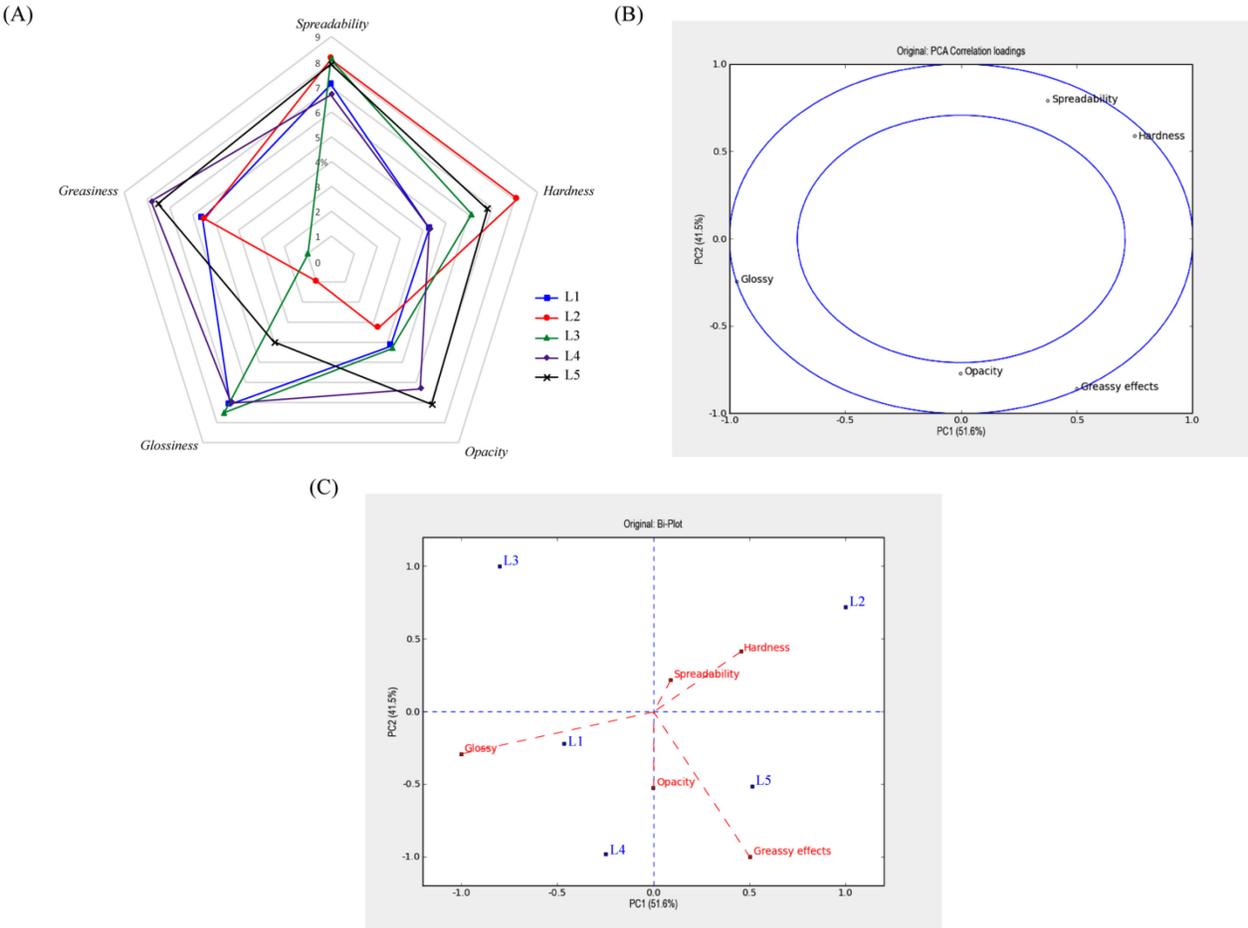


Figure 5.



Supplemental figures

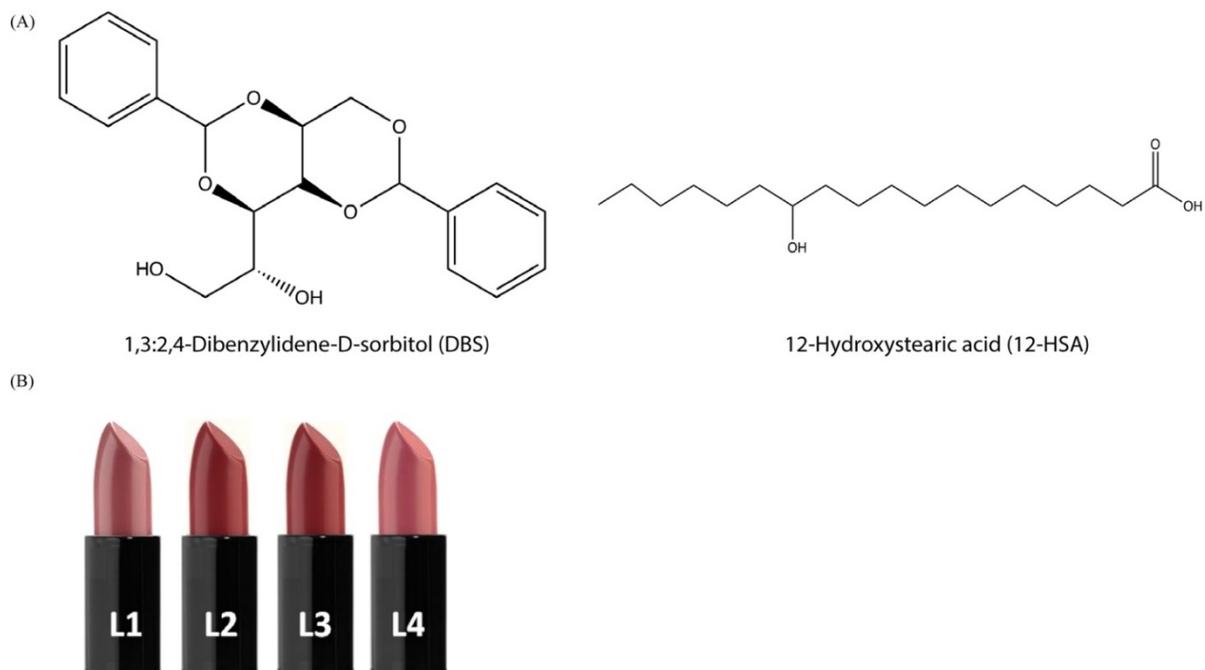


Figure S1. (A) Structures of 1,3:2,4-Dibenzylidene-D-sorbitol (DBS) and 12-Hydroxystearic acid (12-HSA) and (B) photographs of lipsticks formulations tested in this study.

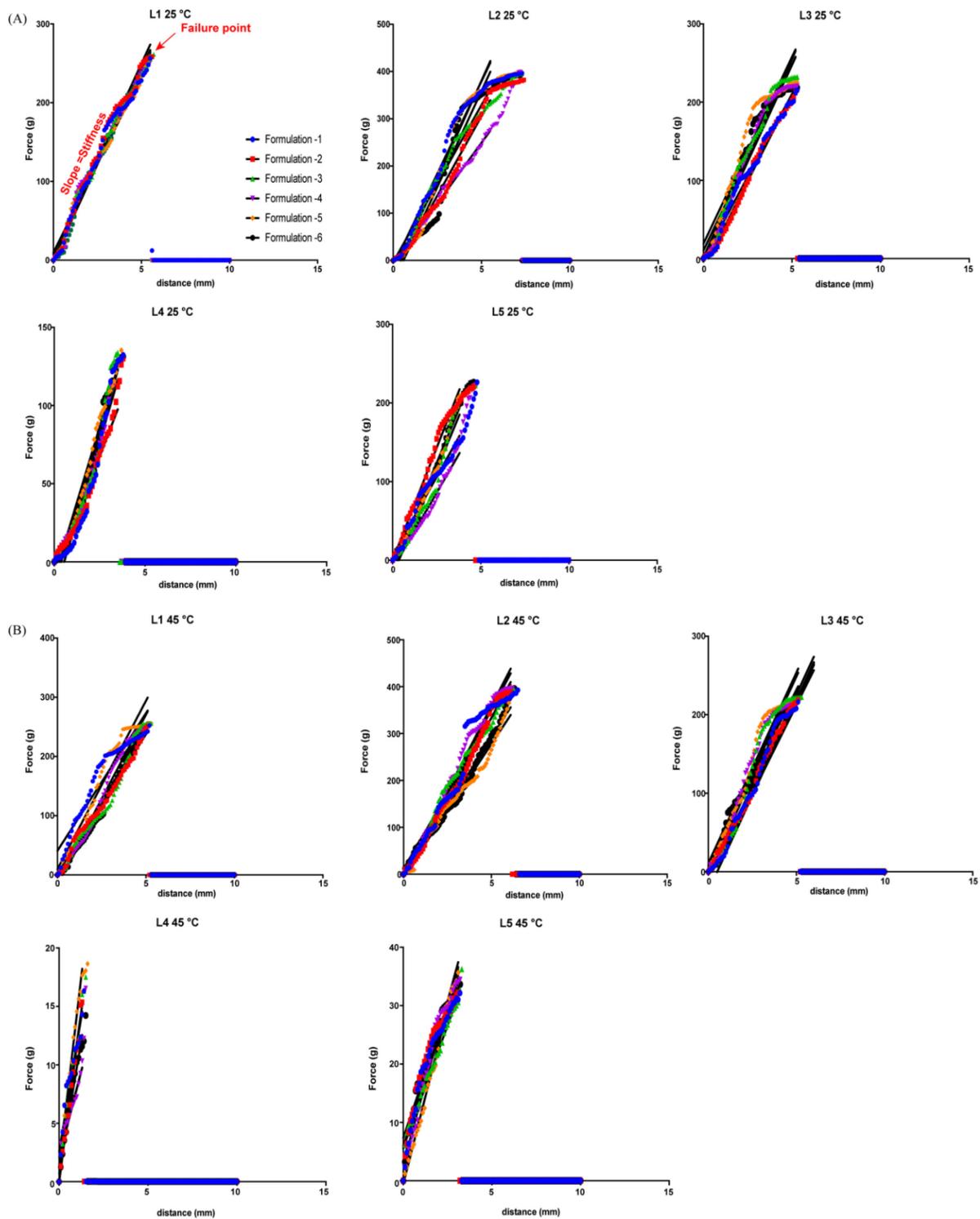


Figure S2. Hardness curves for lipstick formulations at 25 °C (A) and 45 °C (B) (n = 6 lipsticks per group) showing the gradient of the slope during the bending action referred to "stiffness" of the sample in the elastic region and fracture strength (failure point) at day 1.

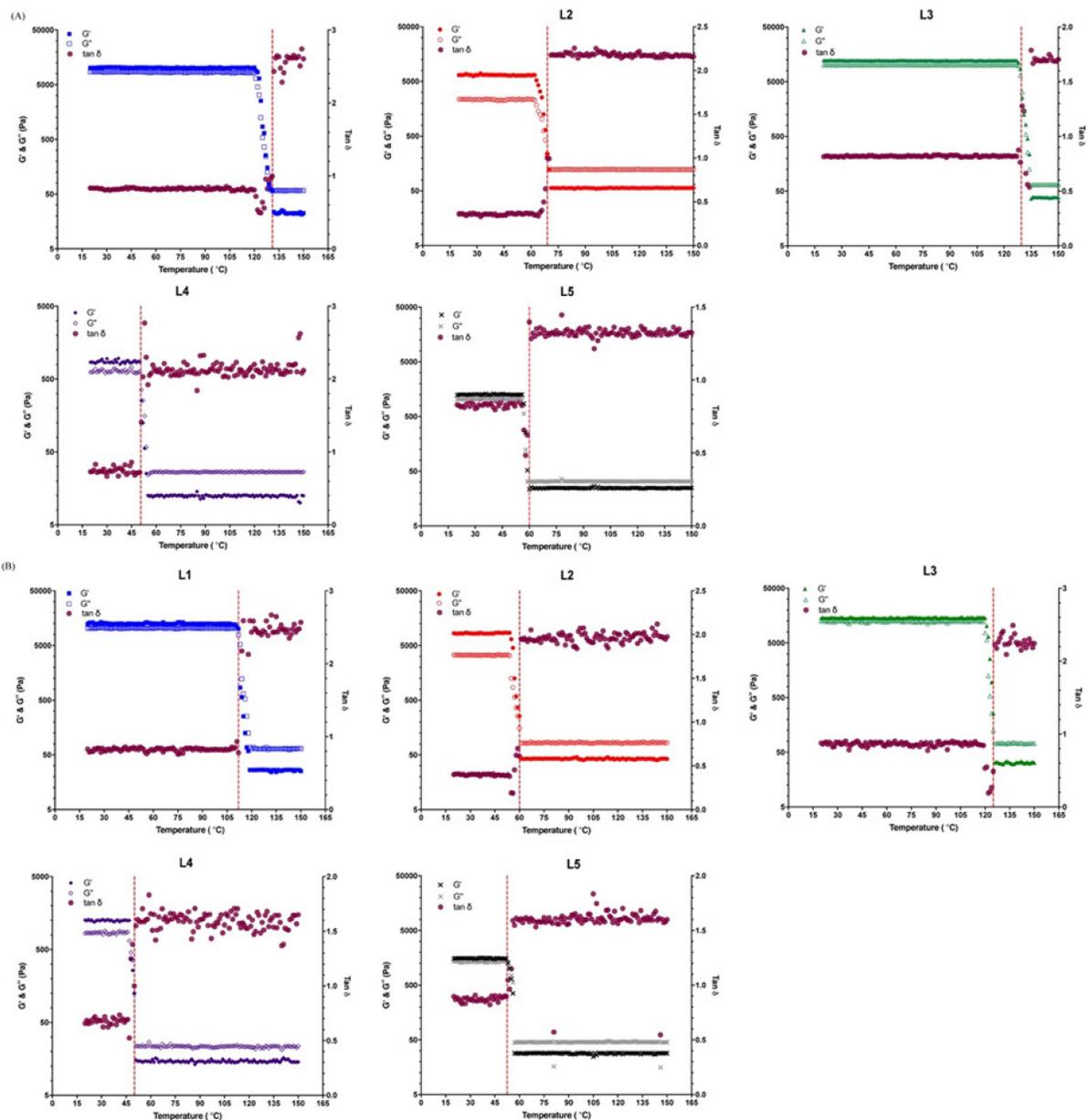


Figure S3. G' , G'' and $\tan \delta$ versus temperature ramp recorded during the heating of lipsticks, (A) of heating sweep and (B) of cooling sweep for L1, L2, L3, L4 and L5 formulations. The gel-to-sol transition phase temperature (T_{melt}) (corresponding to the point of $G' = G''$ and $\tan \delta = 1$) are indicated by dashed red lines. Frequencies $1 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}$; 1 C min^{-1} heating rate; a 1% strain within the LVE regime.

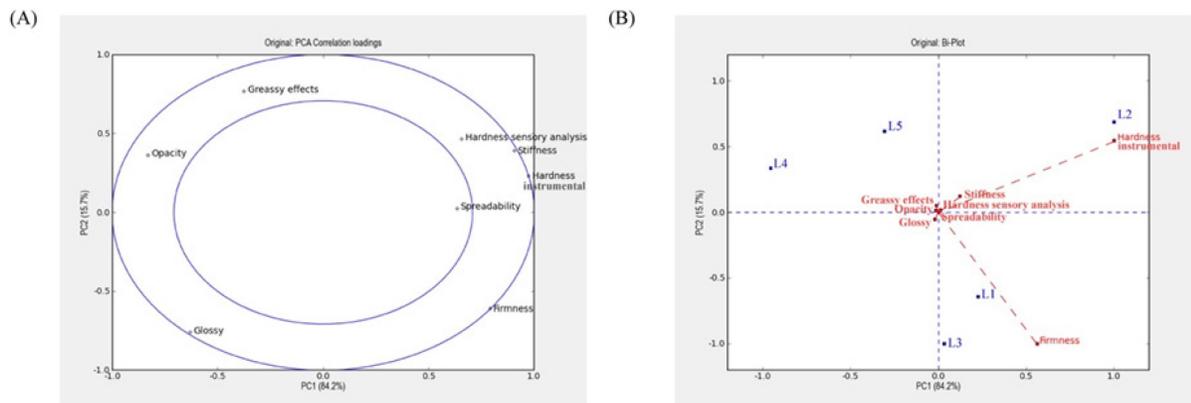


Figure S4. Comparison of sensory attributes and textural instrumental results of the lipstick formulations. Correlation loadings of the principal component analysis (PCA) for all the sensory attributes and texture properties (A) and biplot representation of PCA illustrating relationship between sensory attributes, texture measurements and formulations (B).

Annexe 4 : Liste des publications

Publications à titre de premier auteur

Esposito, C.L., Kirilov, P. (2021). Preparation, characterization and evaluation of organogel-based lipstick formulations: application in cosmetics. *Gels*, 7(3), 97.

Esposito, C. L., Ac, A. G., Laszlo, E., Duy, S. V., Michaud, C., Sauv e, S., Ong, H., Marleau, S., Banquy, X., Brambilla, D. (2021). A quantitative UHPLC-MS/MS method for the growth hormone-releasing peptide-6 determination in complex biological matrices and transdermal formulations. *Talanta*, 233, 122555.

Esposito, C. L., Tardif, V., Sarrazin, M., Kirilov, P., & Roullin, V. G. (2020). Preparation and characterization of 12-HSA-based organogels as injectable implants for the controlled delivery of hydrophilic and lipophilic therapeutic agents. *Materials Science and Engineering: C*, 110999.

Esposito, C. L., Roullin, V. G., & Kirilov, P. (2019). Chapter Eight - Encapsulation of food ingredients by nanoorganogels (nanooleogels). In *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*, S. M. Jafari (Ed.), (pp. 271-343): Academic Press.

Esposito, C. L., Kirilov, P., & Roullin, V. G. (2017). Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications. *J Control Release*, 271, 1-20.

Esposito, C.L., Hanser, M., Roullin, G., Kirilov, P. (2015). Chapitre 7- Administration de molécules thérapeutiques encapsulées dans des organogels, de nouveaux véhicules pour applications thérapeutiques. In *CoBip*,  ditions Matrix, Marek Haftek (Ed.), 4, 111-144.

Publications à titre de co-auteur

- Frégeau, G., Sarduy, R., Elimam, H., **Esposito, C. L.**, Mellal, K., Ménard, L., *et al.* (2020). Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*, 307, 52-62.
- Kirilov, P., **Esposito, C.L.**, Roullin, G. (2015). 5- Rhéologie macroscopique des dispersions aqueuses de particules d'organogels dites gélosomes. In *CoBip*, Éditions Matrix, Marek Haftek (Ed.), 4, 69-102.