



**HAL**  
open science

# Traitement des ulcérations cutanées par nanoencapsulation d'agents actifs. Mise au point et preuve de concept

Raphaël Bouvet

► **To cite this version:**

Raphaël Bouvet. Traitement des ulcérations cutanées par nanoencapsulation d'agents actifs. Mise au point et preuve de concept. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes, 2019. Français. NNT: 2019GREAS018 . tel-02476378

**HAL Id: tel-02476378**

**<https://theses.hal.science/tel-02476378v1>**

Submitted on 12 Feb 2020

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

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

## **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Raphaël Bouvet**

Thèse dirigée par **Jean Luc CRACOWSKI (EDISCE), PU-PH, UGA** et coencadrée par **Dorothee JARY**.

préparée au sein du **Laboratoire Hypoxie et Physiopathologie cardiovasculaire et respiratoire**  
dans **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**.

## **Traitement des ulcérations cutanées par nanoencapsulation d'agents actifs. Mise au point et preuve de concept**

Thèse soutenue publiquement le **5 novembre 2019**,  
Devant le jury composé de :

**Madame le Dr. Christelle, Bonod**

MCU, Université Claude Bernard Lyon 1, Rapporteur

**Madame le Pr. Stéphanie, Briançon**

PU, Université Claude Bernard Lyon 1, Rapporteur

**Monsieur le Dr. Matthieu, Roustit**

MCU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble, Membre

**Madame le Pr. Sophie, Blaise**

PU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble, Président

**Monsieur le Pr. Jean Luc, Cracowski**

PU-PH, Université Grenoble Alpes, CHU Grenoble Membre Invité

**Madame le Dr. Dorothee, Jary**

Ingénieur, CEA Grenoble, Membre Invité





## Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé entre le laboratoire Hypoxie PhysioPathologie (HP2) et des laboratoires LBAM, LSMB et L2CB du Département des Technologies pour la Biologie et la Santé (DTBS) du CEA Grenoble.

Merci à Jean Luc et Dorothée pour m'avoir fait confiance pendant ces 3 années. Merci Dorothée pour tous tes conseils. Merci Jean Luc pour tous tes conseils et pour le soutien lors des dernières semaines. J'espère que la collaboration entre les deux laboratoires continuera.

Merci à toute l'équipe des deux laboratoires. Merci Sylvain pour la confiance que tu m'as accordée depuis mes premiers pas de chercheur il y a bien longtemps. Merci Yann, Axel, Quentin, Clément et Maximin pour la super ambiance dans les bureaux, les sorties escalades au Labo ou au bar, et pour le soutien moral lors de la rédaction. Merci à l'équipe de la travée 105, encore présentes ou parties vers d'autres horizons. Merci à Mathilde, Prisca et Emilie pour les décorations de bureau et pour le soutien lors de la dernière ligne droite. Merci Nathalie et Audrey pour vos disponibilités permanentes.

Merci à toute ma famille pour avoir été présentes malgré ma faible disponibilité lors de ces dernières années.

## Résumé

La cicatrisation est un processus multifactoriel. Dans le cadre du diabète, on retrouve une altération des processus à l'œuvre lors de la cicatrisation. En effet, l'hyperglycémie chronique présente chez le patient diabétique modifie la fonction des tissus principalement au niveau endothélial ainsi qu'au niveau cutané.

Les ulcères chroniques du patient diabétique sont un problème majeur de santé publique avec une thérapeutique actuelle limitée en efficacité. Ils représentent un facteur majeur de détérioration de la qualité de vie avec un risque d'amputation des membres inférieurs important.

Lors de cette thèse, nous avons évalué le potentiel de l'encapsulation de principes actifs dans des nanoparticules lipidiques pour la délivrance locale au niveau de l'ulcère. Les nanoparticules lipidiques sont des formes galéniques qui permettent de stabiliser les principes actifs et d'améliorer la délivrance cutanée. Les principes actifs testés lors de cette thèse seront des principes actifs vasodilatateurs. Ils peuvent améliorer la cicatrisation par leur effet sur la fonction vasculaire, mais également sur les processus d'inflammation, de prolifération et de remodelage tissulaire.

Nous avons validé l'effet de l'encapsulation dans des nanoparticules lipidiques pour l'amélioration de la stabilité des formulations de différents principes actifs vasodilatateurs. Au niveau de la cicatrisation de plaies diabétiques, nous avons observé une amélioration de la cicatrisation lors de l'administration d'analogues de la prostacycline. Des études complémentaires sont en cours de réalisation afin de décrire les mécanismes mis en œuvre dans l'amélioration de la cicatrisation par ces formulations.

## Summary

Wound healing is a multifactorial process. In diabetes, there is a change in the processes involved in healing. Indeed, chronic hyperglycaemia in diabetic patients modifies tissue function at the endothelial level and at the cutaneous level.

Chronic ulcers in diabetic patients are a major public health problem with limited efficacy of current therapy. They represent a major factor in the deterioration of quality of life with a significant risk of lower limb amputation.

In this thesis, we evaluated the potential of encapsulation of active ingredients in lipid nanoparticles for local delivery. Lipid nanoparticles are galenic forms that stabilize the active pharmaceutical ingredients and improve skin delivery. The active pharmaceutical ingredients used in this thesis will be vasodilators. They can increase wound healing by their effect on vascular function, but also on the processes of inflammation, proliferation and tissue remodelling.

We were able to validate the effect of encapsulation in lipid nanoparticles to improve the stability of formulations of different vasodilator active ingredients. In the healing of diabetic wounds, we have observed an improvement in healing when administering prostacyclin analogues. Additional studies are being carried out to describe the mechanisms used to improve healing by these formulations.

## Plan

Remerciements	2
Résumé	3
Summary	4
Plan	5
I. Introduction générale	9
A. Peau et Mécanismes de la cicatrisation cutanée	11
1. Structure et fonction	11
2. Cicatrisation cutanée	17
B. Dysfonction de la cicatrisation cutanée dans le cadre du diabète	26
1. Introduction	26
2. Physiopathologie générale du diabète	26
3. Physiopathologie de la cicatrisation chez le patient diabétique	30
4. Prise en charge actuelle	34
5. Recherche préclinique et clinique actuelle	35
C. Pharmacologie des vasodilatateurs	37
1. Traitements vasodilatateurs et cicatrisation	37
2. Voie des prostanoides et de la prostacycline	38
3. Voie du monoxyde d'azote (NO).	43
4. Voie de l'endothéline (ET-1)	48

D.	Délivrance cutanée de médicaments : principes généraux et intérêts des nanoparticules lipidiques	51
1.	Méthodes d'administration cutanée	51
2.	Administrations sur ulcères	53
3.	Nanoparticules lipidiques dans le traitement des affections cutanées	54
4.	Les nanoparticules lipidiques évaluées dans le cadre de ce travail : Les Lipidots	87
E.	Définition des Objectifs de la thèse.	88
F.	Références	90
II.	Formulation et caractérisation de gels de nanoparticules	107
A.	Screening des principes actifs vasodilatateurs	109
1.	Choix des vasodilatateurs : Etude bibliographique	109
2.	Screening d'encapsulation de différents principes actifs dans les nanoparticules lipidiques	112
B.	Formulation de gels de nanoparticules pour application topique	143
1.	Stratégie de formulation	143
2.	Formulation de gels à partir de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)	146
3.	Etude de stabilité d'encapsulation sur 6 mois	154
C.	Formulation d'émulsions	162
1.	Phase de sélection des formulations	162
2.	Stabilité	167
D.	Conclusion du chapitre II	170
E.	Bibliographie	172

III.	Evaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique des formulations d'agonistes des récepteurs de la prostacycline nanoencapsulés	174
A.	Etude 1 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie après application des formulations d'agonistes des récepteurs de la prostacycline nanoencapsulés sur souris saines	176
	1. Introduction et protocole expérimental	176
	2. Méthodes	177
	3. Effet pharmacodynamique de l'administration de treprostinil ou d'ACT-333679	181
	4. Pharmacocinétique du Treprostinil et de l'ACT-333679 lors de l'application sur ulcère	186
	5. Discussion et conclusion de l'étude de pharmacocinétique et pharmacodynamie	189
B.	Étude 2 : Cicatrisation sur modèle d'ulcération diabétique sur la souris db/db	192
	1. Introduction et Protocole expérimental	192
	2. Méthodes	193
	3. Résultats de cicatrisation sur 24 jours	196
	4. Résultats histologiques de cicatrisation intermédiaire à 4 et 9 jours	205
	5. Analyse histologique de la peau	207
C.	Conclusion des études animales	210
D.	Références	212
IV.	Discussion générale	213
A.	Agonistes de la prostacycline et effet sur la cicatrisation	214
	1. Voie de la prostacycline et cicatrisation	214
B.	Limites et perspectives du travail de thèse	217
	1. Choix des principes actifs, des nanoparticules et des gels	217

2. Modèle de pharmacodynamie	218
3. Effet procicatrissant de l'ACT-333679 et du Treprostinil.	219
4. Perspectives	222
C. Bibliographie	224

# I. Introduction générale

A.	Peau et Mécanismes de la cicatrisation cutanée	11
1.	Structure et fonction	11
2.	Cicatrisation cutanée	17
B.	Dysfonction de la cicatrisation cutanée dans le cadre du diabète	26
1.	Introduction	26
2.	Physiopathologie générale du diabète	26
3.	Physiopathologie de la cicatrisation chez le patient diabétique	30
4.	Prise en charge actuelle	34
5.	Recherche préclinique et clinique actuelle	35
C.	Pharmacologie des vasodilatateurs	37
1.	Traitements vasodilatateurs et cicatrisation	37
2.	Voie des prostanoïdes et de la prostacycline	38
3.	Voie du monoxyde d'azote (NO)	43
4.	Voie de l'endothéline (ET-1)	48
D.	Délivrance cutanée de médicaments : principes généraux et intérêts des nanoparticules lipidiques	51
1.	Méthodes d'administration cutanée	51
2.	Administration sur ulcère	53
3.	Revue de la littérature sur les nanoparticules lipidiques dans le traitement des affections cutanées	54
4.	Les nanoparticules lipidiques évaluées dans le cadre de ce travail : Les Lipidots	87
E.	Définition des Objectifs de la thèse	88
F.	Références	90

## A. Peau et Mécanismes de la cicatrisation cutanée

### 1. Structure et fonction

La peau est un organe très étendu, recouvrant une surface d'approximativement 1.8 m<sup>2</sup>. Elle constitue 6% du poids corporel total. Il s'agit d'un tissu spécialisé lui permettant de remplir des fonctions de protection, de perception de l'environnement, et de thermorégulation de l'organisme.

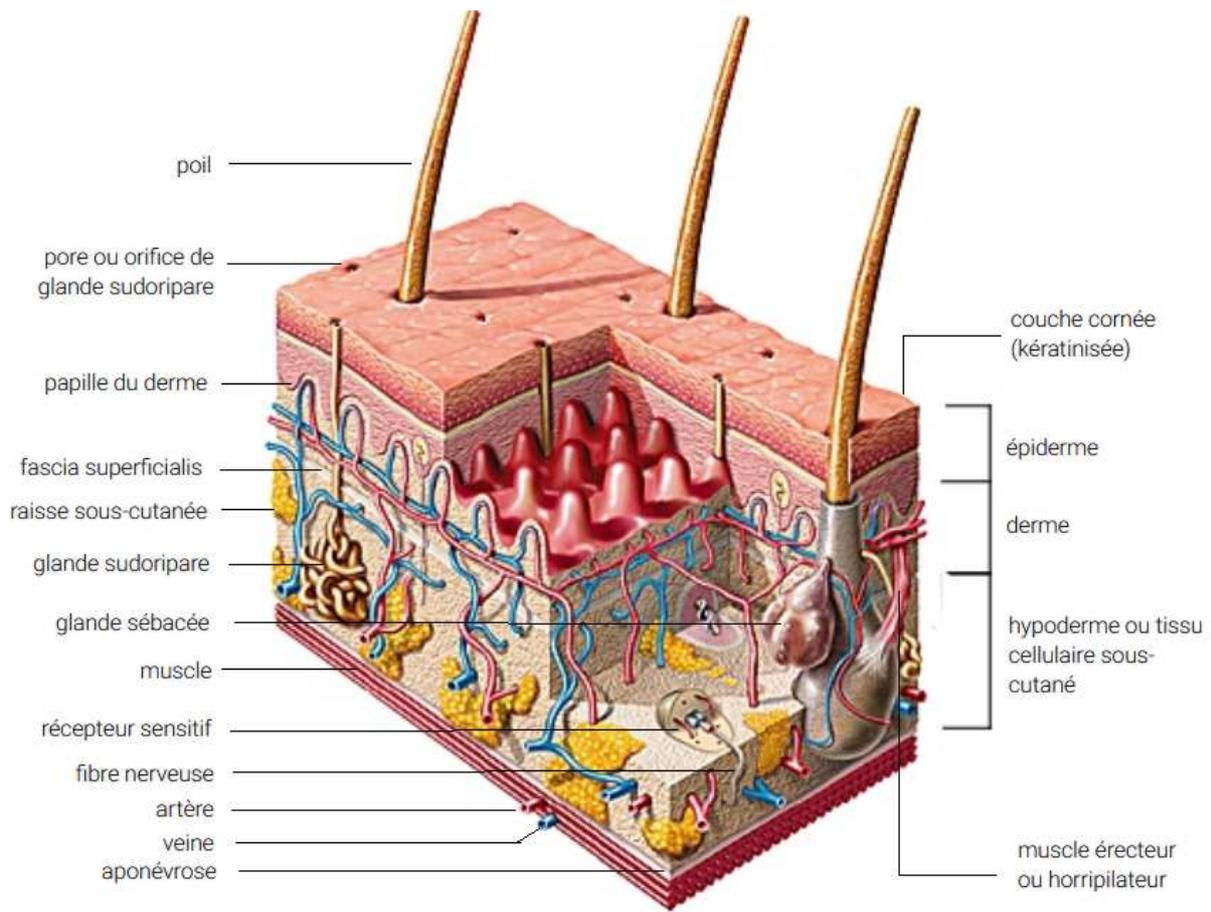


Figure I-1 : Structure générale de la peau <sup>1</sup>

La peau est constituée de 3 tissus distincts comme indiqué dans la Figure I-1 :

- L'épiderme
- Le derme
- L'hypoderme

### a) L'épiderme

L'épiderme est un épithélium squameux stratifié qui vient faire la bordure entre l'environnement extérieur et l'organisme. Il est majoritairement constitué de kératinocytes mais comporte également d'autres types cellulaires. Ce tissu est en renouvellement constant avec une production de kératinocytes au niveau basal et une perte de ces mêmes cellules au niveau apical par desquamation. L'épiderme est structuré en 4 couches distinctes liées à la différenciation des kératinocytes comme montré dans la Figure I-2.

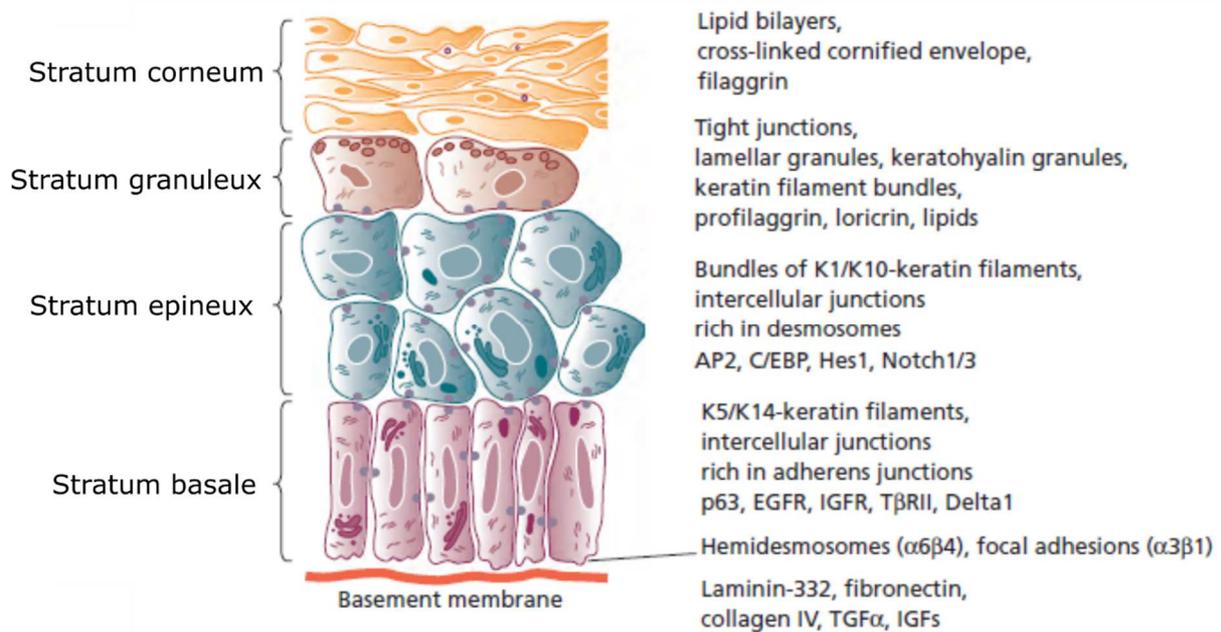


Figure I-2 : Structure de la différenciation des kératinocytes dans l'épiderme (adapté de <sup>2</sup>).

La couche la plus basale est appelée **stratum basale** (couche basale). Elle est constituée d'une couche monocellulaire de kératinocytes qui sont fixés à la membrane basale reliant l'épiderme au derme. Cette couche permet le renouvellement des kératinocytes par l'intermédiaire de cellules souches présentes à cette interface.

Les couches supérieures sont le **stratum spinosum** (couche épineuse) et le **stratum granulosum** (couche granuleuse). Ce sont des couches pluricellulaires de kératinocytes qui se différencient au cours de leur migration apicale. Au niveau du stratum spinosum, les kératinocytes forment des jonctions de type desmosomes qui sont dégradées progressivement lors de la migration cellulaire au niveau apical. Au niveau du stratum granulosum, les kératinocytes produisent des vésicules intracellulaires lipidiques qui seront secrétées dans la couche supérieure pour former la matrice extracellulaire du stratum corneum. Entre la couche

granuleuse et la couche cornée, on peut retrouver le **stratum lucidum** (couche claire) où les kératinocytes perdent leur noyau et organites cytoplasmiques et secrètent la matrice extracellulaire du stratum corneum. Lors de leur migration, les kératinocytes produisent également de la kératine qui se réticule au niveau de la couche claire pour former une enveloppe de kératine dans la couche cornée.

Le **stratum corneum** (couche cornée) est la couche la plus apicale de l'épiderme. À cette étape, les kératinocytes sont appelés cornéocytes. Ils sont anucléés, sans organites intracellulaires, constitués d'une enveloppe de kératine et reliés entre eux par des jonctions appelées corneodesmosomes. La matrice extracellulaire est composée d'une bicouche lipidique constituée de céramides, de cholestérol, et d'acides gras libres. Au niveau apical, les cornéocytes sont éliminés par desquamation après dégradation des cornéodesmosomes.<sup>3</sup>

La couche cornée est la barrière de protection principale de la peau contre les microorganismes extérieurs ainsi que les xénobiotiques (principes actifs ou toxines). Cette couche permet également une diminution de la perte hydrique. Cette protection est liée à la structure en « brique-mortier » de la couche cornée qui permet de réaliser une barrière imperméable.<sup>3</sup>

L'épiderme est également peuplé par d'autres types cellulaires :

- Les cellules de Langerhans
- Les mélanocytes
- Les cellules de Merkel et terminaisons nerveuses libres

Les cellules de Langerhans sont des cellules dendritiques tissulaires qui permettent la veille immunitaire du tissu.<sup>4</sup> En cas de brèche tissulaire, elles vont permettre le recrutement du système immunitaire. La fonction immunitaire de l'épiderme passe aussi par la synthèse de peptides antimicrobiens par les kératinocytes.<sup>5</sup>

Les mélanocytes sont situés au niveau de la couche basale de l'épiderme. Ils sont responsables de la production de mélanine permettant la protection de la peau par rapport aux rayonnements UV.<sup>6</sup>

La peau comporte également de nombreuses terminaisons axonales sensorielles dont les récepteurs permettant la perception de l'environnement. Au niveau de l'épiderme, on retrouve principalement des terminaisons nerveuses libres ainsi que les corpuscules de Merkel.<sup>7</sup>

L'épithélium est un tissu non vascularisé. Ainsi tous les échanges métaboliques sont réalisés au travers de la membrane basale qui est connectée au derme.

### *b) Le derme*

Le derme est un tissu conjonctif qui soutient physiquement et métaboliquement l'épiderme. Il est constitué d'une matrice extracellulaire composée principalement de collagène de type I<sup>8</sup>, mais également d'élastine et d'un réseau de glycoaminoglycanes. La matrice extracellulaire est sécrétée par les fibroblastes et va jouer un rôle structurel mais également métabolique. Le derme contient également la majeure partie des structures « annexes » de la peau telle que les follicules pileux, des glandes sudoripares mais également la présence de l'innervation et de la microcirculation cutanée.

Le derme est structuré en deux parties : Le derme papillaire et le derme réticulaire.

Le derme papillaire forme la jonction avec l'épiderme par l'intermédiaire des papilles dermiques. La structure de la membrane basale permet l'ancrage de l'épiderme au derme par l'intermédiaire de fibre de collagène de type IV, VII et XVII ainsi que de protéines d'adhésion telles que les laminines 332 et l'intégrine  $\alpha 6 \beta 4$ . La jonction épidermo-dermique n'est pas plate mais réticulée. Cette structure « vallonnée » facilite la nutrition et l'homéostasie de l'épiderme par l'intermédiaire de boucles capillaires. Ces boucles vont alors former des extrusions dans le tissu épidermique afin d'augmenter la surface de contact et donc, les échanges vasculaires tout au long du capillaire. Cette structure papillaire est visible sur la paume des mains et la plante de pieds, où elle est responsable de la présence des empreintes digitales. Comparée au derme papillaire, le derme réticulaire est composé principalement d'une matrice extracellulaire plus dense. En effet, le derme papillaire est composé pour la plus grande partie d'un réseau réticulé de fibres de collagènes et d'élastines, lui procurant des propriétés à la fois de souplesse et de solidité.

### *c) L'hypoderme*

L'hypoderme est la couche la plus basale de la peau. Elle est constituée principalement d'adipocytes et va jouer un rôle de soutien en se reposant sur les tissus musculaires ou osseux sous-jacents. Les adipocytes vont jouer le rôle de réserve énergétique de l'organisme.

### *d) La microcirculation cutanée*

La microcirculation cutanée joue un rôle majeur local et systémique chez l'homme.

Elle est composée d'un réseau important formé en deux plexus comme montré dans la Figure I-3. Le **plexus profond** est situé à la jonction dermo-hypodermique et est connecté à la circulation systémique par l'intermédiaire d'artères afférentes et de veines efférentes situées dans l'hypoderme. Le **plexus superficiel** est quant à lui situé dans le derme papillaire et permet l'alimentation de l'épiderme par l'intermédiaire de boucles capillaires présentes au niveau des papilles dermiques. Il est alimenté par le plexus profond par l'intermédiaire d'artérioles ascendantes et de veinules descendantes. Ce réseau ascendant vasculaire est également parsemé d'anastomoses artérioveineuses permettant de « shunter » le flux vasculaire destiné au plexus superficiel. Ces anastomoses artérioveineuses sont de type tubulaire ou glomérulaire, et vont jouer un rôle majeur dans la thermorégulation <sup>9</sup>.

Les anastomoses artérioveineuses sont contrôlées par des cellules musculaires lisses qui jouent le rôle de sphincter précapillaire.<sup>10</sup> La régulation du tonus vasculaire passe par une médiation locale et centrale par l'intermédiaire de l'innervation des cellules musculaires lisses ou d'une stimulation de l'endothélium. On retrouve notamment une signalisation centrale du tonus vasculaire mais également des modifications locales associées à l'environnement comme la réponse à la température, à la pression ou à l'inflammation.<sup>11</sup>

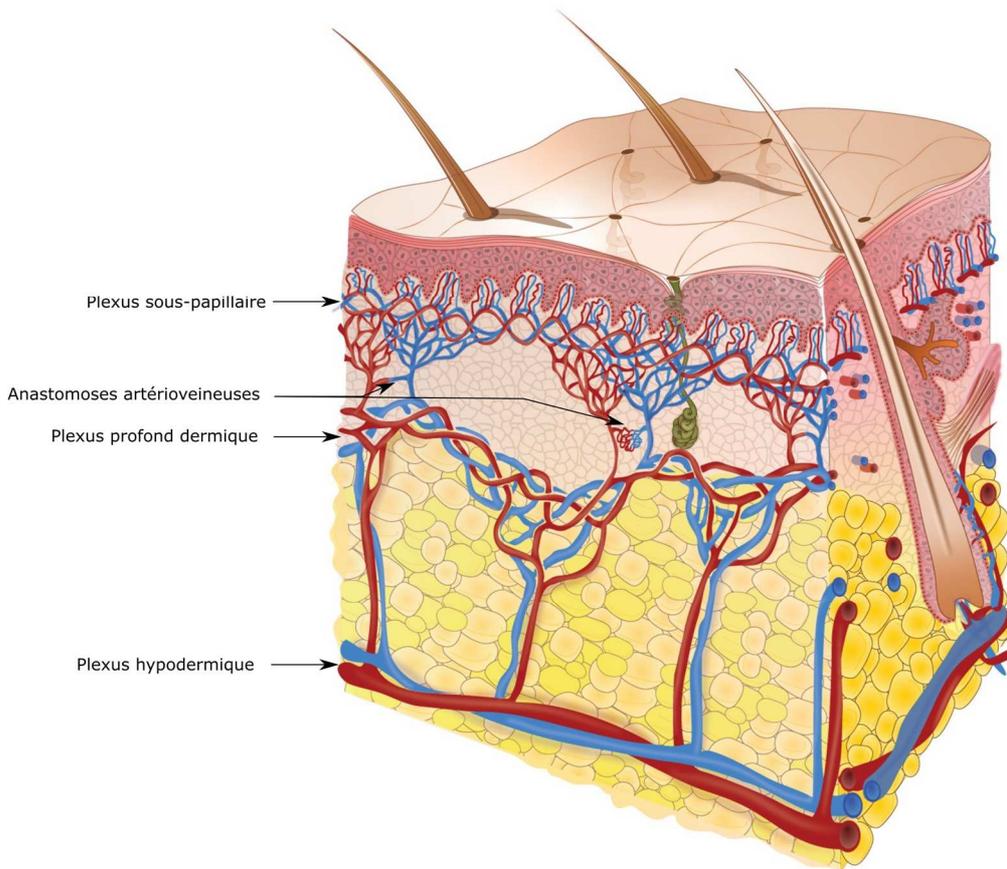


Figure I-3 : Structure de la microcirculation cutanée (Adapté de Cracowski JL and Roustit M. *Human Skin Microcirculation* ; *Comprehensive Physiology*, 2020, en révision)

#### e) Innervation cutanée

La peau présente également un réseau nerveux fortement développé afin de permettre la perception et l'adaptation à l'environnement par l'intermédiaire des voies afférentes (sensation) et efférentes (système nerveux autonome sympathique).<sup>12</sup> L'innervation cutanée est spécifiquement importante dans le contrôle de la fonction vasculaire de la microcirculation pour la thermorégulation.

La voie afférente permet la perception de l'environnement par l'intermédiaire de mécanorécepteurs comme résumés dans la Figure I-4. On observe une différence majeure entre les régions glabres, c.à.d. dépourvues de poils et les régions non glabres où la majorité des mécanorécepteurs se situent à proximité des follicules pileux. La sensation de température est principalement réalisée par l'intermédiaire des canaux TRP (transient receptor potential) présents sur des afférences neuronales.<sup>13</sup> Ceux-ci sont sensibles à une gamme spécifique de température. Ainsi les récepteurs TRPM8 sont associés à une réponse au froid alors que les

récepteurs TRPV3 et 4 sont associés à une réponse au chaud. Les récepteurs TRPA1 et TRPV1/2 sont associés à des températures extrêmes (froid et chaud respectivement).<sup>14,15</sup> Au niveau des terminaisons nerveuses libres, il a été récemment découvert la contribution majeure des cellules de Schwann dans la nociception alors qu'elles sont classiquement catégorisées comme cellules de soutien.<sup>16</sup>

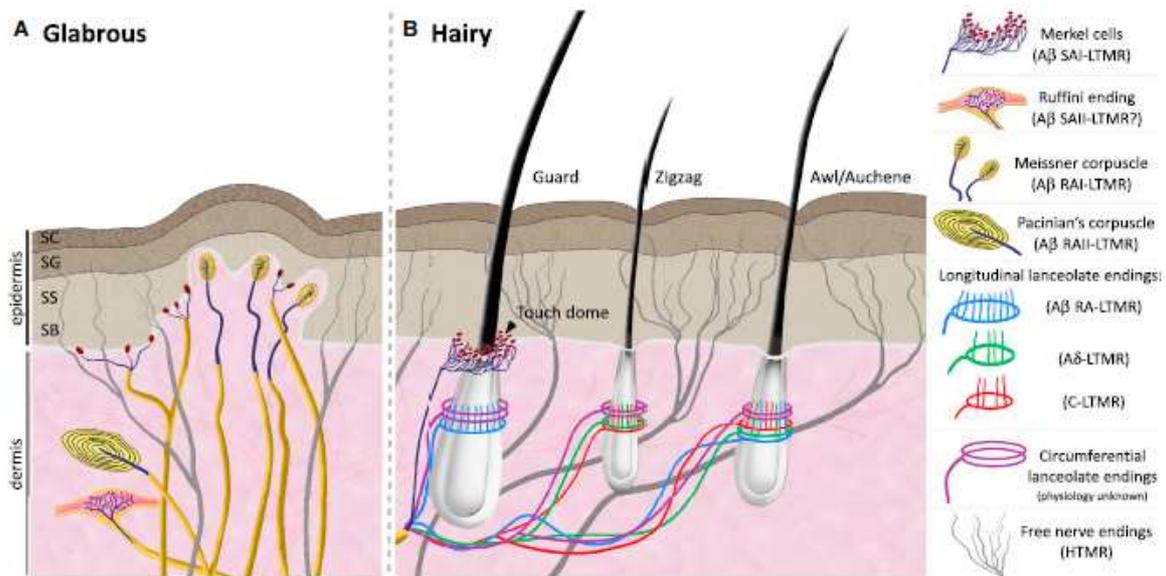


Figure I-4 : Structure et localisation des différents mécanorécepteurs de la peau<sup>7</sup>

La voie efférente va réguler la fonction de la microcirculation et des annexes cutanées. Elle permet le contrôle de la thermorégulation par vasodilatation, vasoconstriction, activation de la sudation et contraction des muscles piloerecteurs.<sup>9</sup> Ce contrôle passe d'une part par une innervation sympathique noradrénergique, par conséquent vasoconstrictrice, d'autre part par l'innervation sympathique cholinergique présente dans la peau non glabre, vasodilatatrice en condition de stress thermique.<sup>9</sup>

## 2. Cicatrisation cutanée

Lors d'une rupture de l'épithélium cutané, un processus physiologique de cicatrisation se met en route impliquant classiquement 4 phases: l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et la maturation.<sup>17,18</sup> L'enchaînement de ces processus de manière ordonnée est nécessaire pour une cicatrisation physiologique complète.

### *a) Phase d'hémostase*

La phase d'hémostase débute après la brèche du compartiment sanguin pour empêcher la perte de sang. Les lésions tissulaires et capillaires vont provoquer une cascade de vasoconstriction, d'activation plaquettaire puis de coagulation pour former un thrombus composé de fibrine et de fibronectine afin d'obturer physiquement la plaie. Ce thrombus va également permettre la réponse inflammatoire et proliférative par la libération de facteurs de croissance et de chimiokines au niveau de la plaie.

Dans les premiers instants après la brèche vasculaire, un vasospasme est produit localement afin de réduire le flux sanguin au niveau de la plaie. La brèche tissulaire provoquée va exposer aux plaquettes circulantes le collagène ainsi que le facteur Von Willebrand fixé au tissu sous vasculaire permettant l'adhésion et l'activation plaquettaire. Les plaquettes activées vont amplifier le signal d'activation par relargage local d'ADP, de Thromboxane A<sub>2</sub> et de sérotonine. Les plaquettes activées vont se fixer au tissu pour réaliser un bouchon plaquettaire permettant un arrêt temporaire du saignement.<sup>19</sup>

L'activation plaquettaire va enclencher la phase d'hémostase secondaire par la cascade de coagulation qui formera à terme le caillot de fibrine/fibronectine. L'hémostase secondaire est une cascade protéolytique des facteurs de la coagulation qui se termine par le clivage de la prothrombine en thrombine par les facteurs Xa et Va. La thrombine va permettre le clivage du fibrinogène en fibrine. La fibrine va former un réseau à la surface des plaquettes qui est ensuite réticulé par le facteur XIIIa, lui-même activé par la thrombine, pour la réalisation d'un caillot insoluble constitué de fibrine, de fibronectine, et de plaquettes.

La régulation et la résorption du caillot de fibrine passe par la production de plasmine qui vient dégrader le réseau de fibrine. Elle est issue de la protéolyse du plasminogène réalisée par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et par l'urokinase (uPA). La fibrinolyse est contrôlée par les cellules endothéliales et les macrophages par la sécrétion d'activateurs (tPA et uPA) ainsi que d'inhibiteurs comme les inhibiteurs des activateurs du plasminogène, l'alpha2-macroglobuline et l'alpha2-antiplasmine.<sup>20</sup> Cette phase est également d'importance dans le processus de cicatrisation.<sup>21</sup> Par exemple, le récepteur à l'urokinase (uPAR) est impliqué dans la réponse proangiogénique au VEGF.<sup>22,23</sup>

### *b) Phase inflammatoire*

La Figure I-5 résume les différents mécanismes en œuvre lors de la phase inflammatoire. L'activation plaquettaire libère des facteurs de croissance comme le PDGF, et le VEGF qui permettent une activation de l'endothélium et des fibroblastes déclenchant la phase d'inflammation et de prolifération.<sup>24,25</sup> L'endothélium activé va permettre le recrutement des neutrophiles et des monocytes par l'expression en surface d'intégrines (ICAM-1/VCAM-1). La rupture tissulaire provoque également une activation du complément par la sécrétion de protéases qui permettent le clivage de C3 et C5. Le complément stimule la réponse immunitaire et permet la lyse de microorganismes par la formation de complexes d'attaques membranaires (CAM).<sup>26</sup>

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules à arriver au niveau tissulaire. L'objectif principal de ces cellules est de nettoyer le tissu de microorganismes et des cellules mortes par phagocytose, par libération d'espèces réactives de l'oxygène, et par la sécrétion de pièges extracellulaires (neutrophil extracellular traps).<sup>27,28</sup>

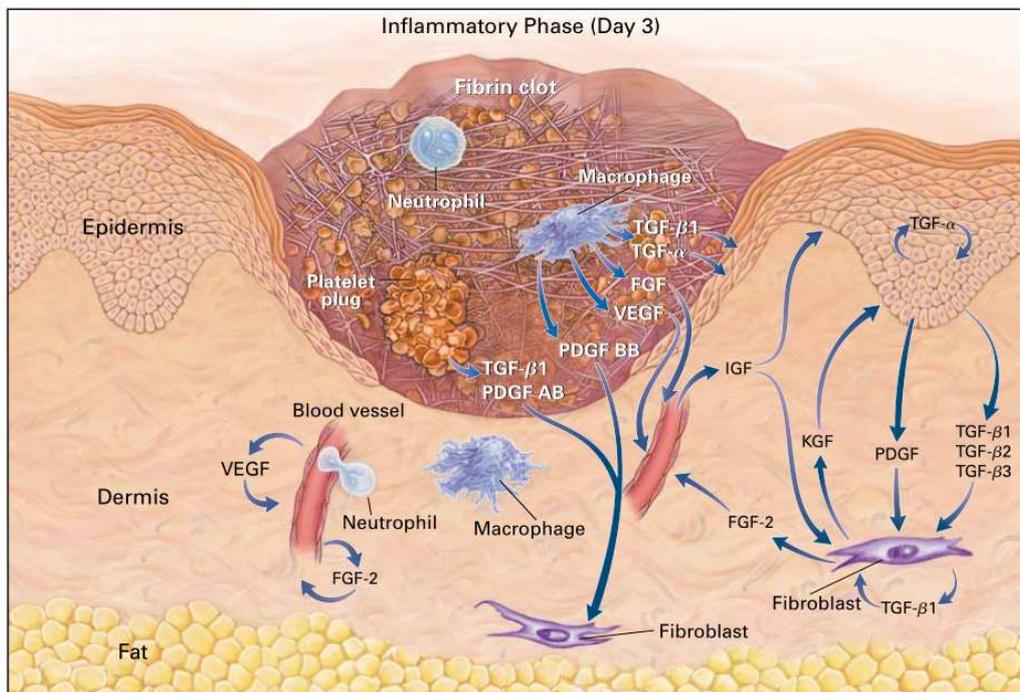


Figure I-5 : Phase inflammatoire lors de la cicatrisation<sup>17</sup>

Les macrophages arrivent en second temps et jouent un rôle majeur dans la gestion de la matrice extracellulaire, des cellules en apoptose et également des microorganismes. Les macrophages sont recrutés au niveau du tissu adjacent mais également à partir de monocytes au niveau de la

moelle osseuse.<sup>29</sup> Les monocytes pénètrent le tissu par interaction avec l'endothélium activé qui exprime des marqueurs d'adhésion tels que des chemokines membranaires.<sup>30</sup> Les monocytes recrutés se différencient ensuite en macrophages tissulaires avec des fonctions différentes en fonction de l'environnement (facteurs de croissance et cytokines). En effet, les macrophages peuvent exprimer un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Ils sont classiquement classifiés en macrophages M1 et M2 respectivement mais il existe en réalité une variété de phénotypes macrophagiques.<sup>31</sup> Ainsi, durant la phase précoce de la plaie, les macrophages pro-inflammatoires sont prédominants par la présence de signaux pro-inflammatoires tels que les signaux moléculaires associés au pathogènes ou aux dégâts tissulaires et cellulaires (PAMPs et DAMPs respectivement).<sup>32,33</sup> Ces macrophages pro-inflammatoires vont gérer la réponse inflammatoire par la synthèse de TNFalpha, d'interleukines 1, 6, et 12, et par la génération de monoxyde d'azote (NO) par l'induction de la NO synthase inductible (iNOS).

La transition entre les macrophages pro et anti-inflammatoires est un mécanisme complexe et fait encore l'objet de recherche intense.<sup>34</sup> Ainsi la phagocytose de neutrophiles apoptotiques peut provoquer un changement de l'expression génétique et protéique des macrophages vers un type anti-inflammatoire.<sup>35</sup> D'autres molécules peuvent influencer le passage vers les phénotypes anti-inflammatoires tels que le TGFbeta et l'interleukine 10.<sup>34</sup> Ces transitions vont passer par des changements épigénétiques par modification des histones.<sup>36</sup>

Les macrophages avec un phénotype anti-inflammatoire vont faciliter la phase de prolifération par la production de facteurs de croissance et de chimiokines activant les fibroblastes (TGFbeta), les cellules endothéliales (VEGF) et les kératinocytes (TGFalpha, PDGF, IGF-1).<sup>37</sup> La transition entre macrophages pro-inflammatoires vers macrophages anti-inflammatoires semble importante car elle est dérégulée dans les plaies chroniques où les plaies sont bloquées en phase inflammatoire.<sup>38,39</sup> La Figure I-6 résume les mécanismes d'activation et de transition des macrophages dans les différentes phases ainsi que les différents effecteurs moléculaires stimulants et produits par les macrophages.

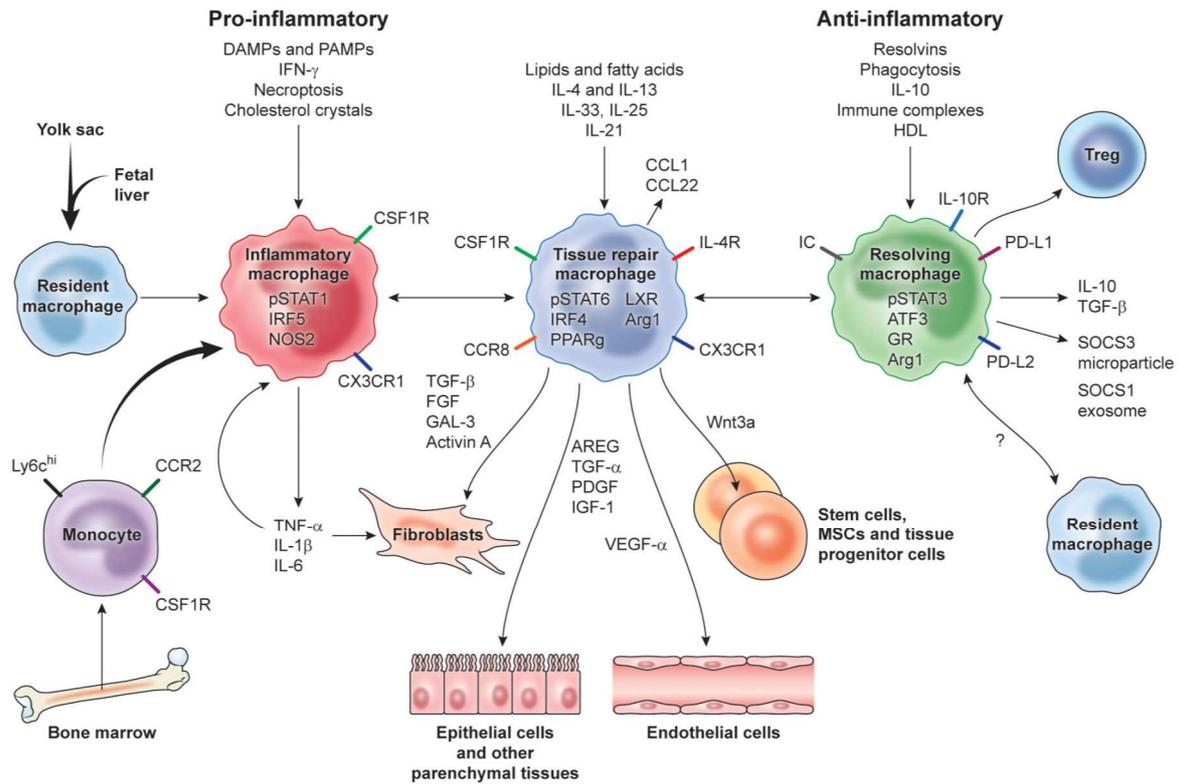


Figure I-6 : Mécanismes à l'origine des principaux phénotypes d'activation des macrophages dans la réparation, la régénération et la fibrose tissulaire<sup>33</sup>

Cette phase d'inflammation est nécessaire pour la protection de l'organisme par rapport aux microorganismes lors de la brèche tissulaire réalisée. Cependant, le contrôle de l'inflammation est nécessaire pour passer vers une plaie en cours de cicatrisation.<sup>39</sup> La réponse immunitaire semble également délétère pour une cicatrisation parfaite.<sup>40</sup> Ainsi sur un modèle de souris KO pour le facteur de transcription PU.1 qui présentent une absence de cellules inflammatoires (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques), la cicatrisation est similaire aux souris « wild type » mais de meilleure qualité car sans cicatrice résiduelle.<sup>41</sup> Cet effet est également retrouvé dans la cicatrisation chez le fœtus et le nouveau-né, où la cicatrisation est excellente et sans cicatrice notamment par le plus faible recrutement de cellules inflammatoires.<sup>42-44</sup>

### c) Phase de prolifération

La phase de prolifération se met en place dès l'existence de la lésion tissulaire et fait intervenir 3 mécanismes :

- La formation du tissu de granulation

- La réépithélialisation
- L'angiogenèse

Le tissu de granulation est un tissu transitionnel qui va permettre la migration cellulaire. Au-dessus de celui-ci, les kératinocytes vont pouvoir migrer pour réépithélialiser la plaie. Afin d'apporter les effecteurs cellulaires et les apports nutritionnels, les vaisseaux adjacents vont produire un nouveau réseau à partir des vaisseaux existants (angiogenèse) ou à partir de cellules endothéliales progénitrices produites dans la moelle osseuse (EPC) (vasculogénèse).

La formation du tissu de granulation est réalisée par les fibroblastes du tissu sain adjacent, par la production de fibroblastes par les cellules souches présentes au niveau du derme et circulantes.<sup>45-48</sup> Les fibroblastes vont dégrader le caillot de fibrine par la synthèse de métalloprotéases (MMP) et vont le remplacer par un réseau de fibronectine et de collagène (riche en type III). Certains fibroblastes acquièrent également un profil contractile par stimulation par le TGFβ.<sup>49</sup> Les myofibroblastes résultants permettent ainsi une contraction de la plaie et donc une réduction de la taille de la plaie grâce au tissu de granulation formé.

La réépithélialisation passe par la prolifération et la migration cellulaire des kératinocytes du tissu sain sur le tissu de granulation. Lors d'une disruption de la barrière cutanée, les kératinocytes libèrent des facteurs de croissance et des chimiokines tels qu'IL-1, TNFα et EGF qui stimulent de manière autocrine et paracrine la migration et la prolifération des kératinocytes.<sup>50-52</sup> La migration des kératinocytes passe par une perte de l'adhérence entre les cellules, par le réassemblage du cytosquelette d'actine et par la production d'intégrines permettant la migration sur le tissu de granulation. La réépithélialisation passe principalement par la formation d'une couche monocellulaire puis par une prolifération afin de reformer un épithélium sain.

La revascularisation de la plaie est nécessaire à la bonne cicatrisation en permettant l'apport en oxygène, en nutriments, et en cellules pour la cicatrisation. La première réponse du tissu endothélial va être la présence d'une vasodilatation produite par l'inflammation. Cette vasodilatation permet d'améliorer les échanges métaboliques et les infiltrations cellulaires. Les cellules endothéliales vont également être stimulées afin de former les nouveaux vaisseaux dans le tissu de granulation. Différents acteurs cellulaires (plaquettes<sup>53</sup>, macrophages, kératinocytes) lors de la cicatrisation vont produire les différentes cytokines pro angiogéniques<sup>54</sup>, la plus

connue étant le VEGF. La production de ces médiateurs pro-angiogéniques est réalisée par un stimulus hypoxique qui stabilise le facteur HIF-1alpha. Son rôle est de stimuler la transcription et la translation des facteurs pro-angiogéniques.<sup>55</sup> Par l'intermédiaire de ces médiateurs, les cellules endothéliales germinent à partir des vaisseaux adjacents et forment de nouveaux capillaires.<sup>56</sup> Ceux-ci sont caractérisés par un réseau désorganisé avec des boucles capillaires mal formées et nombreuses donnant au tissu de granulation sa couleur rosée. En effet, le tissu vasculaire devient normalisé lors de la phase de remodelage lors du switch vers un signal anti-angiogénique.<sup>57</sup>

En plus de l'angiogénèse, il est aussi possible de former de nouveaux vaisseaux par l'intermédiaire de cellules endothéliales progénitrices (EPC) recrutées au niveau de la moelle osseuse. Ces EPCs vont permettre de former des nouveaux vaisseaux sans vasculature existante dans un processus appelé vasculogénèse. Ce processus est principalement mis en place lors du développement de l'organisme mais joue un rôle également lors de la cicatrisation.<sup>58,59</sup>

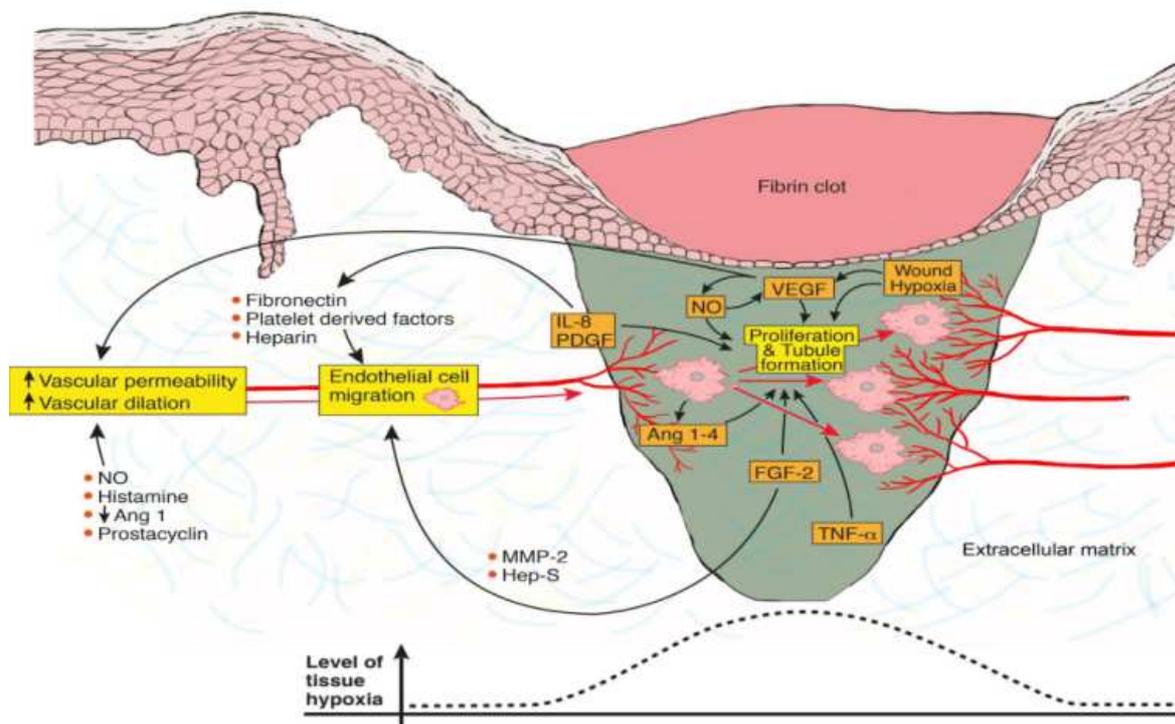


Figure I-7 : Mécanismes de l'angiogénèse au niveau de la plaie<sup>60</sup>

#### d) Phase de remodelage

Tout comme la phase d'inflammation, la phase de prolifération doit être régulée afin de former un tissu sain. On retrouve plusieurs objectifs à la phase de remodelage :

- La maturation du réseau vasculaire
- La maturation de la matrice extracellulaire

Cette phase est la plus longue du processus qui peut durer ainsi plusieurs mois en fonction de la lésion et du type de remodelage.

La maturation du réseau vasculaire passe par une apoptose contrôlée des cellules endothéliales. Cette maturation est médiée par des facteurs anti-angiogéniques (PDGF, ANG1) ainsi que par la présence de cellules périendothéliales telles que les péricytes et les cellules musculaires lisses.<sup>61,62</sup> Ce processus est notamment contrôlé par le retour du tissu en condition normoxique. Au lieu d'un réseau désorganisé, la maturation du réseau vasculaire permet un apport suffisant mais non excessif au tissu cicatrisé.

La maturation de la matrice extracellulaire passe par une dégradation contrôlée du tissu de granulation. Celui-ci, composé majoritairement de collagène de type III, est remplacé par du collagène de type I plus résistant aux forces mécaniques appliquées sur la peau.<sup>63,64</sup> Ce processus est géré principalement par les fibroblastes et myofibroblastes tissulaires par l'intermédiaire de la synthèse de métalloprotéases et la production de collagène de type I sous l'influence du TGF bêta (isoforme Beta 3 pour cicatrisation normale non fibrotique). Lors de ce remodelage tissulaire, les myofibroblastes vont également rentrer progressivement en apoptose afin de réguler la quantité de matrice extracellulaire produite.<sup>65,66</sup> Une absence d'apoptose des myofibroblastes est ainsi démontrée dans les pathologies fibrotiques.<sup>67</sup>

e) La cicatrisation : dérégulation du processus.

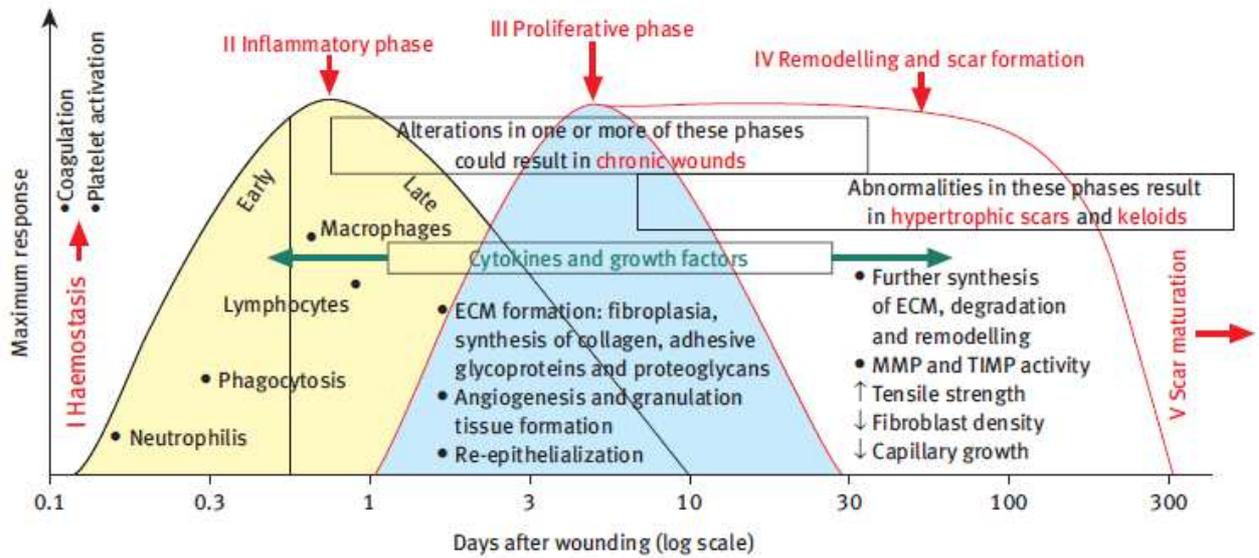


Figure I-8 : Phases de la cicatrisation et dérégulation <sup>68</sup>

Comme montré dans la Figure I-8, le processus de cicatrisation normal nécessite une induction et une résolution correcte des différents mécanismes mis en place. Une modification du processus va induire une altération de la cicatrisation qui peut prendre différentes formes comme montré dans la Figure I-9. On observe ainsi une cicatrisation altérée dans le cadre des ulcérations veineuses, artérielles, du pied diabétique et des escarres ainsi qu'une altération du processus de remodelage dans le cadre des plaies hypertrophiques et des plaies chéloïdes. Les plaies chroniques sont principalement bloquées lors du processus inflammatoire.<sup>39</sup>

Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser aux ulcères chroniques dans le contexte diabétique.



Figure I-9 Pathologies de la cicatrisation <sup>69</sup>. De gauche à droite : ulcération veineuse, ulcération artérielle, pied diabétique, escarre, plaies hypertrophiques, et plaies chéloïdes.

## B. Dysfonction de la cicatrisation cutanée dans le cadre du diabète

### 1. Introduction

L'insuline est un médiateur produit par les cellules bêta des îlots de Langerhans au niveau du pancréas. Elle est impliquée dans l'homéostasie glycémique, permettant de réduire les concentrations sanguines en glucose par la stimulation de tissus sensibles à l'insuline, i.e. les muscles, les cellules adipeuses et le foie. La fixation au récepteur à l'insuline provoque la localisation des transporteurs GLUT 4 à la membrane cellulaire pour augmenter le transport intracellulaire en glucose. Une anomalie de la production ou de la signalisation de l'insuline va donc produire une hyperglycémie systémique chronique. Il existe plusieurs types de diabète, la majorité des patients présentant un diabète de type 2 ou de type 1.<sup>70</sup> Le diabète est diagnostiqué généralement par la présence d'une hyperglycémie à jeun ( $>1,26$  g/l) ou d'une glycémie supérieure à 2g/L 2h après la prise orale de 75g de glucose.<sup>71</sup>

Le diabète de type 1 est une maladie chronique auto-immune qui provoque la destruction des cellules bêta pancréatiques par la production d'anticorps auto-immuns. Chez ces patients, la destruction des cellules bêta entraîne un déficit de la production d'insuline complet, ou insulino-dépendance, nécessitant des administrations quotidiennes d'insuline à vie.<sup>72</sup> La prévalence du diabète de type 1 est variable avec une différence marquée entre les pays due aux différents facteurs de risques génétiques et environnementaux.

La majorité des patients diabétiques (90%) présentent un diabète de type 2 qui est une maladie métabolique définie par une hyperglycémie mais sans insulino-dépendance initiale. L'hyperglycémie du diabète de type 2 est résultante d'une altération de la sensibilité et/ou de la sécrétion de l'insuline.<sup>73</sup> Ces altérations de l'insuline sont produites par des altérations métaboliques fréquemment associées à l'obésité mais sont également influencées par des facteurs génétiques.<sup>74</sup>

### 2. Physiopathologie générale du diabète

L'arrivée en phase hyperglycémique est différente dans le type I et dans le type II. La destruction auto-immune des îlots bêta pancréatiques provoque l'hyperglycémie chronique par déficit de la production d'insuline dans le type I. La physiopathologie du diabète de type II est plus complexe car variant fortement entre les individus. L'obésité chronique provoque une inflammation chronique du tissu adipeux (TNF $\alpha$ ) provoquant une augmentation de la

lipolyse adipocytaire et une diminution de la formation de réserves de triglycérides. Ainsi on se retrouve avec une augmentation des acides gras libres dans la circulation qui vont provoquer une altération de la sensibilité à l'insuline au niveau musculaire, hépatique, adipocytaire et pancréatique.<sup>75</sup> Le DT2 est ainsi associé à une dyslipidémie et une hyperglycémie chronique.

L'hyperglycémie chronique provoque une altération de la signalisation énergétique au niveau cellulaire et au niveau de l'organisme. L'hyperglycémie chronique impacte tous les types cellulaires mais les cellules endothéliales sont particulièrement sensibles à l'effet de l'hyperglycémie.

La plus grande sensibilité au glucose de ces cellules peut être médiée par le faible contrôle de la concentration intracellulaire en glucose. Quelques études mettent en évidence une absence d'autorégulation de l'expression membranaire du récepteur GLUT 1 dans certains types endothéliaux.<sup>76-80</sup> Cet effet semble différent selon la fonction et la localisation des vaisseaux. Ainsi, sur des cellules endothéliales aortiques de bœuf, une exposition in vitro à une hyperglycémie in vitro provoque une diminution de la transcription et translation du récepteur GLUT 1.<sup>79</sup> De manière similaire, on retrouve une diminution du flux de glucose dans les cellules endothéliales du cœur et du cerveau mais pas de diminution pour des cellules endothéliales prélevées dans la rétine.<sup>77,78</sup>

Même si l'effet sur le transport intracellulaire de glucose semble être discuté, il est évident que le milieu hyperglycémique altère la fonction de l'endothélium<sup>81,82</sup> et que cette altération est présente également chez le sujet sain même lors du pic hyperglycémique suivant la prise d'une boisson sucrée. Chez le sujet sain, on peut ainsi observer une altération transitoire de la fonction macro et microvasculaire associée à une dysfonction de la voie du NO.<sup>83,84</sup> Cette dysfonction semble associer un mécanisme oxydatif car la fonction est restaurée lors l'un apport d'antioxydant.<sup>84</sup>

Cette altération endothéliale est également corrélée à l'état cardiométabolique du patient. Comme indiqué dans la méta analyse en réseau de Loader<sup>85</sup> dont les résultats sont résumés dans la Figure I-10, plus l'état cardiométabolique devient dégradé plus on observe une aggravation de la dysfonction endothéliale micro et macrovasculaire chez le patient diabétique.

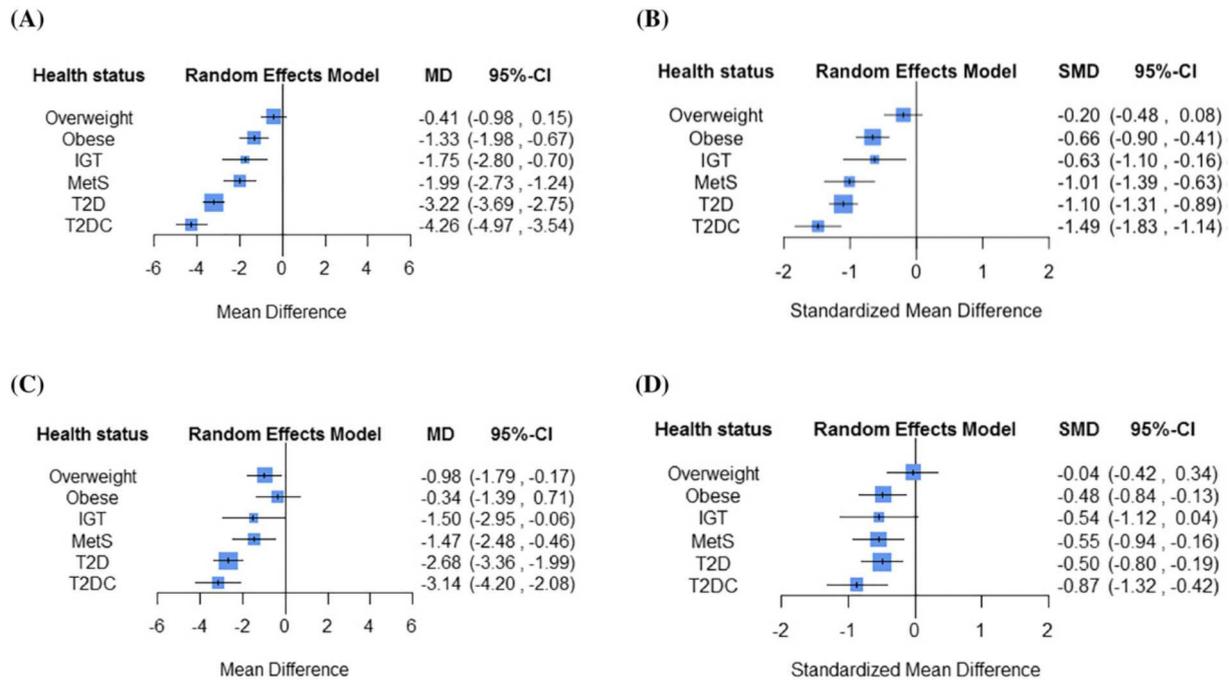


Figure I-10 : Altération de la fonction macrovasculaire et microvasculaire<sup>85</sup> Réactivité macrovasculaire endothélium dépendante (A) et indépendante (C) ; Réactivité microvasculaire endothélium dépendante (B) et indépendante (D) .

La progression d'une hyperglycémie vers une dysfonction endothéliale et vers les différentes complications diabétiques fait intervenir différents mécanismes schématisés dans la Figure I-11. Ces processus dérégulés dans la cellule endothéliale se retrouvent également dans les autres types cellulaires impliqués dans les complications diabétiques tels que les neurones<sup>86</sup>, le rein<sup>87,88</sup> et la rétine.<sup>89,90</sup>

L'hyperglycémie chronique provoque une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène par saturation de la chaîne respiratoire mitochondriale.<sup>91</sup>

La voie du sorbitol passe par la conversion du glucose intracellulaire et de ses métaboliques en sorbitol puis en fructose. La première étape passe par l'action de l'aldose réductase consommant du NADPH durant le processus. La déplétion de NADPH va entraîner une déplétion des défenses antioxydantes par consommation de glutathion.

La voie de la protéine Kinase C (PKC) passe par l'augmentation des concentrations intracellulaires de diacylglycérol (DAG) et de RO par l'hyperglycémie.<sup>92</sup> L'activation de la PKC (principalement des isoformes beta et gamma) provoque une altération de l'expression génétique de la cellule par activation de différentes voies de transcription.<sup>92</sup> Son inhibition permet d'améliorer certaines caractéristiques des complications diabétiques.<sup>93</sup>

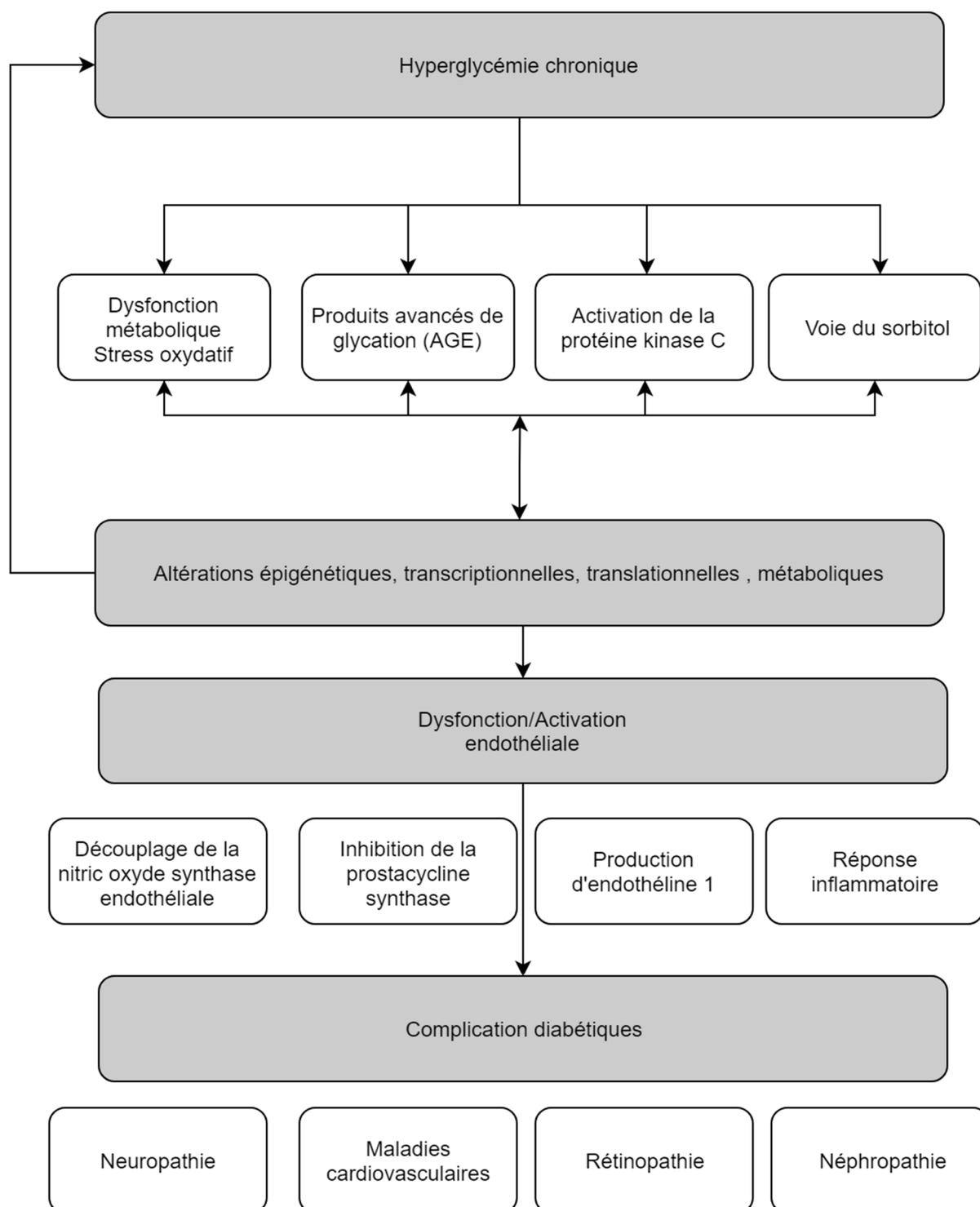


Figure I-11 : Mécanismes liant l'hyperglycémie chronique à la dysfonction endothéliale et aux complications diabétiques.

La voie des produits avancés de glycation (AGE) passe par la modification structurale de protéines intra et extracellulaires par réactions non enzymatiques. Ces AGE modifient ainsi la structure et la fonction cellulaire et peuvent stimuler des voies de transcription par liaison au R-AGE produisant une activation de la transcription par le biais de NfKappaB.<sup>94</sup> L'activation

de la transcription provoque une activation endothéliale par l'expression de facteurs d'adhésion leucocytaires.

Comme montré dans la Figure I-11, tous ces mécanismes s'activent suite à l'hyperglycémie et provoquent une boucle d'activation sans rétrocontrôle par le biais du stress oxydant, d'inflammation, de modifications structurales (AGE) et de mécanismes épigénétiques. Ainsi, malgré un contrôle sévère de la glycémie, la dysfonction endothéliale et cellulaire peut persister par un mécanisme de mémoire glycémique.<sup>95</sup>

### 3. Physiopathologie de la cicatrisation chez le patient diabétique

Un patient diabétique a environ 15% de chance de présenter une ulcération avec un taux d'incidence d'hospitalisation pour amputation de 252 pour 100 000 personnes diabétiques en France en 2013.<sup>96</sup>

L'altération de la cicatrisation chez le patient diabétique est représentée principalement par le pied diabétique mais ces personnes sont également à risque majeur d'ulcérations chroniques veineuses, artérielles et de pression (escarres).<sup>97</sup>

La physiopathologie générale du pied diabétique est résumée dans la Figure I-12. La pathologie diabétique avancée provoque une altération neurovasculaire caractérisée par une atteinte du système nerveux sensoriel, autonome ainsi que par une maladie artérielle thrombotique. Plusieurs étiologies se présentent ainsi dans le cadre du pied diabétique :

- Ulcère neuropathique
- Ulcère ischémique
- Ulcère mixte neuroischémique

L'ulcération neuropathique est formée par un traumatisme au niveau du pied non ressenti à cause de l'atteinte sensorielle et autonome. Les ulcères neuropathiques purs présentent notamment une meilleure perfusion de l'ulcère comme montré par la température de la peau, par la présence d'un pouls digital et par une meilleure granulation au niveau de la zone de l'ulcère.<sup>98</sup> L'ulcère ischémique est provoqué lui par une ischémie macrovasculaire provoquée par une vascularisation insuffisante du membre inférieur observée par une artériopathie

oblitérante des membres inférieurs. L'ulcère neuroischémique est un ulcère multifactoriel résultant des deux pathologies et représentant la majorité des ulcères. <sup>99</sup>

Le Tableau I-1 résume le risque d'amputation en fonction du type d'ulcère comme décrit dans la classification de l'université du Texas. Ainsi, l'infection et l'ischémie tissulaire sont des facteurs aggravant fortement l'amputation.

	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Stade A	Plaie pré/post complètement épithélialisée (0)	Plaie superficielle (0)	Plaie pénétrant jusqu'au tendon/capsule (0)	Plaie pénétrante jusqu'à l'os ou articulation (0)
Stade B	+ infection (12.5)	+ infection (8.5)	+ infection (28.6)	+ infection (92)
Stade C	+ ischémie (25)	+ ischémie (20)	+ ischémie (25)	+ ischémie (100)
Stade D	+ infection + ischémie (50)	+ infection + ischémie (50)	+ infection + ischémie (100)	+ infection + ischémie (100)

Tableau I-1 : Système de Classification des plaies diabétiques selon l'Université du Texas (Prévalence (%) d'amputation).<sup>100</sup>

Au niveau de la zone de l'ulcère, on retrouve de nombreuses altérations du processus de cicatrisation.

Les kératinocytes de la berge de la plaie présentent un phénotype hyperprolifératif mais avec une différenciation déficiente. La berge des plaies diabétiques est ainsi caractérisée par une parakératose et une hyperkératose avec un stratum corneum immature (présence de cellules nucléées) et épaissi, qui se manifeste cliniquement par des zones d'hyperkératose plantaire. Les kératinocytes des berges de la plaie des patients diabétiques expriment notamment Ki67+ ainsi qu'une réduction des facteurs de différenciation K10 et K2 et de migration cellulaires LM-3A32.<sup>101</sup> Ils sont également caractérisés par une incapacité de réponse à l'EGF liée à une activation du facteur de transcription oncogène c-myc. <sup>102</sup>

Les fibroblastes présents au niveau du pied diabétique présentent une altération de la prolifération, de la migration avec une augmentation de l'apoptose et une réduction de la sensibilité aux facteurs de croissance. <sup>103</sup> Dans une étude récente par analyse transcriptomique des ARN messagers et des micro ARN, on observe une altération de la prolifération, migration,

et différenciation cellulaire avec une augmentation de l'entrée en sénescence.<sup>104</sup> De plus la présence de produits avancés de glycation dans la matrice extracellulaire provoque une altération de leur propriété de signalisation sur la migration cellulaire.<sup>105,106</sup> On retrouve également dans la matrice extracellulaire une augmentation de sa protéolyse par les MMP avec une diminution de l'expression de TIMPs.<sup>107,108</sup> L'altération de la matrice extracellulaire est également modulée par la présence accrue de protéines glycosylées (AGE).

Au niveau inflammatoire, les plaies diabétiques sont considérées comme bloquées dans la phase inflammatoire.<sup>39</sup> En effet, l'environnement hyperglycémique provoque une activation endothéliale augmentant ainsi l'inflammation au niveau de la peau. On retrouve notamment un profil cytokinique pro-inflammatoire et un ratio M1/M2 élevé indiquant une inflammation tissulaire même à l'état basal chez un modèle de lapin diabétique et chez l'homme.<sup>109-111</sup>

Lors de la cicatrisation, la forte prévalence d'infection avec biofilms va aggraver la réponse inflammatoire chronique dans le pied diabétique. De plus, la protéolyse aggravée de la matrice extracellulaire provoque une inflammation chronique par libération de fragments protéiques stimulant le phénotype inflammatoire des macrophages.<sup>112</sup>

L'angiogenèse et la vasculogénèse du patient diabétique est également perturbée. Ainsi, la fonction des cellules endothéliales progénitrices est perturbée dans la pathologie diabétique. On retrouve notamment une diminution de leur recrutement depuis la moelle osseuse, de leur prolifération et de leur capacité de ciblage de la zone hypoxique potentialisée par la plus faible vascularisation de la zone ulcérée.<sup>113-115</sup>

Au niveau de l'angiogenèse, la fonction des cellules endothéliales est également perturbée de manière similaire avec une altération de la migration à travers la matrice extracellulaire, de leur prolifération. Ceci va être médié par une altération chronique des autres effecteurs cellulaires (fibroblastes, kératinocytes, macrophages) qui normalement agissent en synergie par la libération de facteurs de croissances pro-angiogéniques ainsi que par la présence d'un environnement extracellulaire protéolytique. Cet effet semble également spécifique à la cicatrisation car on retrouve notamment une angiogenèse dérégulée dans la rétinopathie diabétique ou on utilise notamment des thérapies anti-VEGF.<sup>116,117</sup>

L'hyperglycémie provoque également une neuropathie. Or les neurones au niveau de la peau agissent en synergie avec le système vasculaire pour la régulation du tonus vasculaire par rapport à différents stimulus dont la pression.<sup>11</sup> On observe notamment que l'administration de

substance P provoque une amélioration de la cicatrisation par modulation de l'inflammation sur des souris et lapins diabétiques.<sup>110</sup> D'autres neurotransmetteurs (neuropeptide Y, neurotensin) jouent un rôle dans la cicatrisation et sont dérégulés dans la pathologie diabétique.<sup>118</sup>

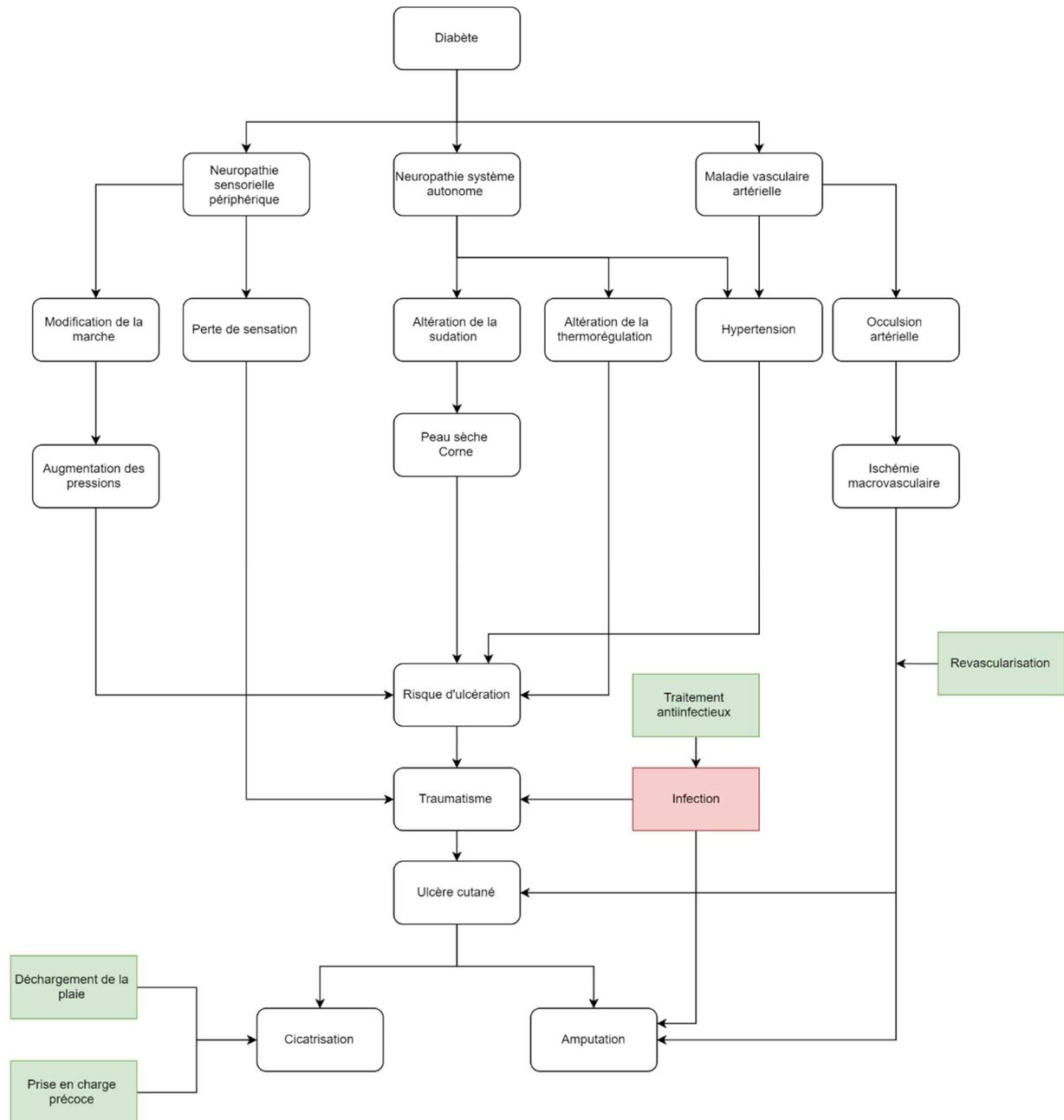


Figure I-12 Physiopathologie et prise en charge générale du pied diabétique (inspiré de <sup>119</sup>).

#### 4. Prise en charge actuelle

La prise en charge la plus efficace est la prévention des ulcères. Chez le patient diabétique, celle-ci passe par un bon contrôle glycémique ainsi qu'un contrôle quotidien des pieds pour détecter les plaies de manière précoce et ainsi faciliter le traitement.<sup>119</sup>

L'objectif principal du traitement est la cicatrisation rapide pour diminuer le risque d'atteinte profonde (os et articulations) pour éviter l'amputation.

La mise en décharge de la plaie est la première mesure à prendre. En évitant les pressions sur la plaie, la plaie cicatrise plus vite. Il est néanmoins nécessaire de s'assurer de la bonne observance de ce traitement notamment pour les dispositifs mobiles d'où l'importance des dispositifs non amovibles et de l'éducation thérapeutique du patient.<sup>120</sup>

La présence d'une ischémie du membre inférieur est un facteur indépendant de risque d'amputation chez le patient diabétique. Les ulcères ischémiques sont plus rares mais dans ces cas-là, le traitement standard est la revascularisation. Elle passe principalement par des techniques chirurgicales ou de radiologie interventionnelle mais des méthodes pharmacologiques sont également utilisées.<sup>121</sup> Ainsi en cas de contre-indication des méthodes chirurgicales, des vasodilatateurs comme l'iloprost sont adaptés en alternative à la revascularisation mais les preuves d'efficacité sont faibles et ils sont associés à des effets indésirables importants.<sup>122-124</sup>

Le traitement local est une prise en charge classique de plaies chroniques. Les tissus nécrosés sont débridés et un pansement adapté au type de plaie est appliqué. Dans le cadre du pied diabétique, une bonne hydratation de la plaie est nécessaire. Un traitement antibiotique est souvent mis en place à cause de la forte prévalence d'infections chez le patient diabétique. Elle doit également être réadaptée en fonction des résultats des prélèvements bactériens au niveau de la plaie.<sup>125</sup>

La cicatrisation doit être évaluée régulièrement. Ainsi un ulcère pris en charge n'ayant pas une amélioration de la cicatrisation dans 4 semaines aura peu de chance de cicatriser. Des thérapies adjuvantes sont applicables dans les cas de non cicatrisation.<sup>126,127</sup> Elles font intervenir des méthodes physiques telles que l'oxygénothérapie hyperbare pour améliorer l'oxygénation de la plaie, l'utilisation de pansements à pression négative pour l'évacuation des exsudats, et des

modalités pharmacologiques comme la bécaplermine (retrait de marché en Europe, 2012) ou comme l'iloprost.<sup>124</sup>

## 5. Recherche préclinique et clinique actuelle

A cause de son importance, le diabète et ses complications suscitent un effort de recherche important pour son traitement curatif des complications mais également du diabète en lui-même.

La recherche clinique des approches curatives du pied diabétique passe principalement par le traitement local que l'on peut classer de manière simple en 3 groupes :

- Substituts de peau/substituts dermiques
- Thérapie cellulaire (cellules souches)
- Traitements pharmacologiques et Facteurs de croissances.

Les substituts de peau et dermiques visent à remplir la plaie d'une matrice extracellulaire exogène permettant la protection de la plaie et la migration cellulaire à l'intérieur de celle-ci. Plusieurs substituts sont commercialisés comme Apligraf®<sup>128</sup>, Dermagraft®<sup>129</sup>, et Omnigraf®<sup>130</sup>. Ils sont de deux types : cellulaires ou acellulaires en fonction de la présence de cellules humaines dans leur composition. Malgré leur efficacité importante, ils imposent un coût de traitement important par la présence de cellules humaines dans les matrices cellulaires<sup>128-130</sup>

Les facteurs de croissance ont déjà été utilisés pour le traitement des ulcérations diabétiques comme la bécaplermine mais leur coût de formulation important (protéines recombinantes) et leur possible toxicité (cancer) ont limité leur utilisation et ont induit un retrait du marché en France.<sup>131,132</sup> L'utilisation de facteurs de croissance en combinaison avec des protéines de la matrice extracellulaire permet d'améliorer leur efficacité grâce à la capacité de séquestration et de relargage de la matrice extracellulaire.<sup>133</sup> On retrouve également l'utilisation de nanoparticules pour la délivrance contrôlée de facteurs de croissance.<sup>134</sup>

Différentes modalités pharmacologiques autres que les facteurs de croissance ont été développées. Plusieurs équipes s'intéressent à la délivrance locale de NO pour l'amélioration de la fonction endothéliale et du statut infectieux.<sup>135-137</sup> On retrouve également des traitements par analogues de l'angiotensine<sup>138</sup> ou d'inhibiteurs de la connexine 43.<sup>139</sup>

Notre équipe se spécialise dans la délivrance de molécules vasodilatatrices pour le traitement des ulcérations cutanées.<sup>140</sup> Ainsi nous avons préalablement montré l'efficacité de l'iontophorèse de treprostinil, un vasodilatateur, pour la cicatrisation d'ulcérations cutanées sur un modèle murin diabétique.<sup>141</sup>

## C. Pharmacologie des vasodilatateurs

### 1. Traitements vasodilatateurs et cicatrisation

L'altération endothéliale dans le diabète provoque une diminution du potentiel de cicatrisation des plaies par la diminution de l'apport d'oxygène, de nutriments et de cellules immunitaires au niveau de la plaie. Une amélioration de cette fonction permettrait d'améliorer la cicatrisation des plaies diabétiques. Ainsi les traitements vasodilatateurs permettraient l'amélioration de la cicatrisation par une stimulation de la fonction physiologique de l'endothélium.

Nous explorerons les 3 voies principales de la vasodilatation décrites dans la Figure I-13 :

- La voie de la prostacycline
- La voie du NO et de la guanylate cyclase
- La voie de l'endothéline

Pour chaque voie, nous explorerons le fonctionnement physiologique, les dysfonctions des voies associées au diabète, et les différents mécanismes par lesquels une activation de ces voies de signalisation améliore la cicatrisation.

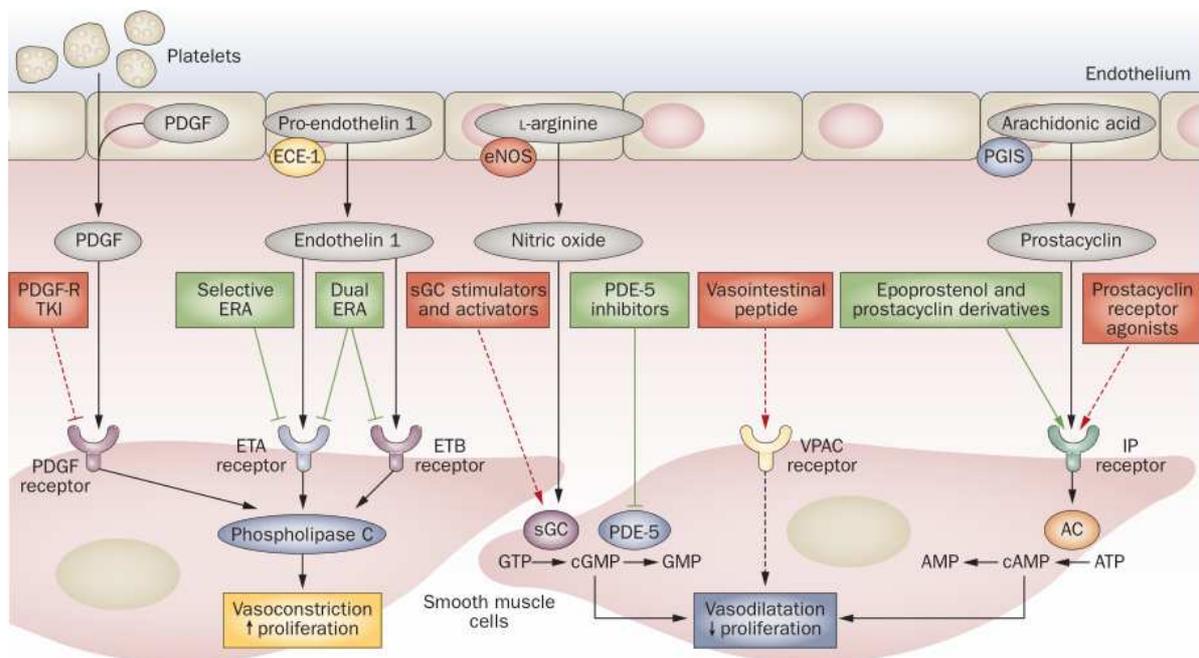


Figure I-13 Voies pharmacologiques de la vasodilatation <sup>142</sup>

## 2. Voie des prostanoïdes et de la prostacycline

La prostacycline fait partie des prostanoïdes, une classe de médiateurs lipidiques endogènes produits dans la cellule endothéliale à partir de l'acide arachidonique. En Octobre 1982, l'Assemblée Nobel de l'Institut Karolinska a décerné le prix Nobel de physiologie et de médecine conjointement à Sune K. Bergström, Bengt I. Samuelsson et John R. Vane pour leurs découvertes concernant les «prostaglandines et substances biologiquement actives apparentées».<sup>143</sup>

L'acide arachidonique est libéré des membranes cellulaires ou nucléaires sous l'action de la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). Les prostanoïdes sont formés par les prostaglandines G / H synthases (PTGS) qui convertissent l'acide arachidonique en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) selon un processus en deux étapes combinant activité cyclooxygénase et activité peroxydase. PTGS1 (autrement connu sous le nom de COX-1) est exprimé constitutivement dans la plupart des cellules, tandis que PTGS2 (COX-2) est exprimé dans un contexte de stress oxydatif ou lors de la libération de cytokines. La prostaglandine H<sub>2</sub> va pouvoir former les différents prostanoïdes dont les prostaglandines après biotransformation par différentes enzymes comme montré sur la Figure I-14.<sup>144,145</sup> En plus de la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), la voie produit une abondance de médiateurs lipidiques comme le Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), la prostaglandine E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, et F<sub>2</sub>alpha (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, et PGF<sub>2α</sub> respectivement).

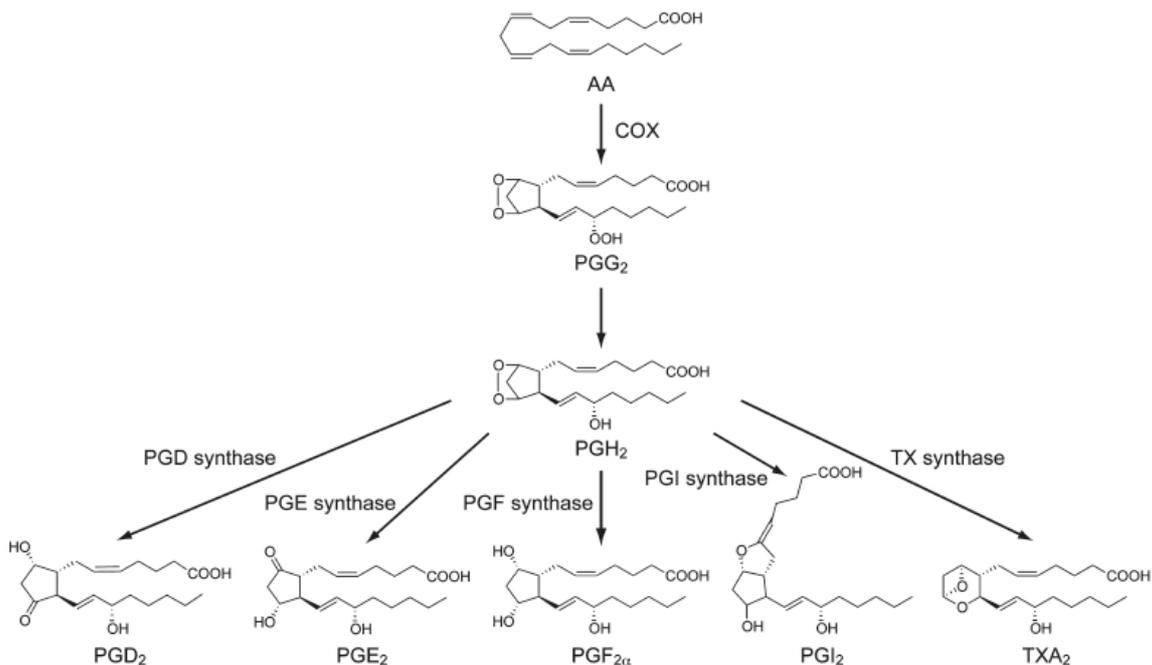


Figure I-14 : Biosynthèse des prostanoïdes <sup>145</sup>

Les récepteurs aux prostanoides sont des récepteurs aux protéines G (RCPG) ubiquitaires. Ils agissent par le recrutement de protéines kinases intracellulaires pour produire différents effets cellulaires.<sup>146</sup> Une des actions des prostanoides est la régulation du tonus vasculaire avec une action dépendante du type de récepteur stimulée. Leur action au niveau de la vasculature (endothélium et cellules musculaires lisses) est résumée dans la Figure I-15.

L'action vasodilatatrice principale de la prostacycline est médiée par le récepteur IP. La stimulation de ce récepteur va provoquer une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc stimulant ainsi l'action de la protéine kinase A (PKA). Celle-ci va provoquer une relaxation des cellules musculaires lisses par l'inhibition de la MLCK (kinase chaîne légère de la myosine) par phosphorylation. La PGI<sub>2</sub> est la principale prostacycline vasodilatatrice présente au niveau endothélial. Son action est opposée au TXA<sub>2</sub>, un prostanoid vasocenseur agissant par l'intermédiaire des récepteurs TP. La stimulation des récepteurs TP provoque une inhibition de l'adénylate cyclase aboutissant à une vasoconstriction de l'endothélium.<sup>147</sup>

En addition aux récepteurs IP et TP, on retrouve également plusieurs isoformes du récepteur à la prostaglandine E2 (PGE<sub>2</sub>) ayant des activités différentes sur le tonus vasculaire. Ainsi les récepteurs EP1 et EP3 sont vasoconstricteurs alors que les récepteurs EP2 et EP4 sont vasodilatateurs.

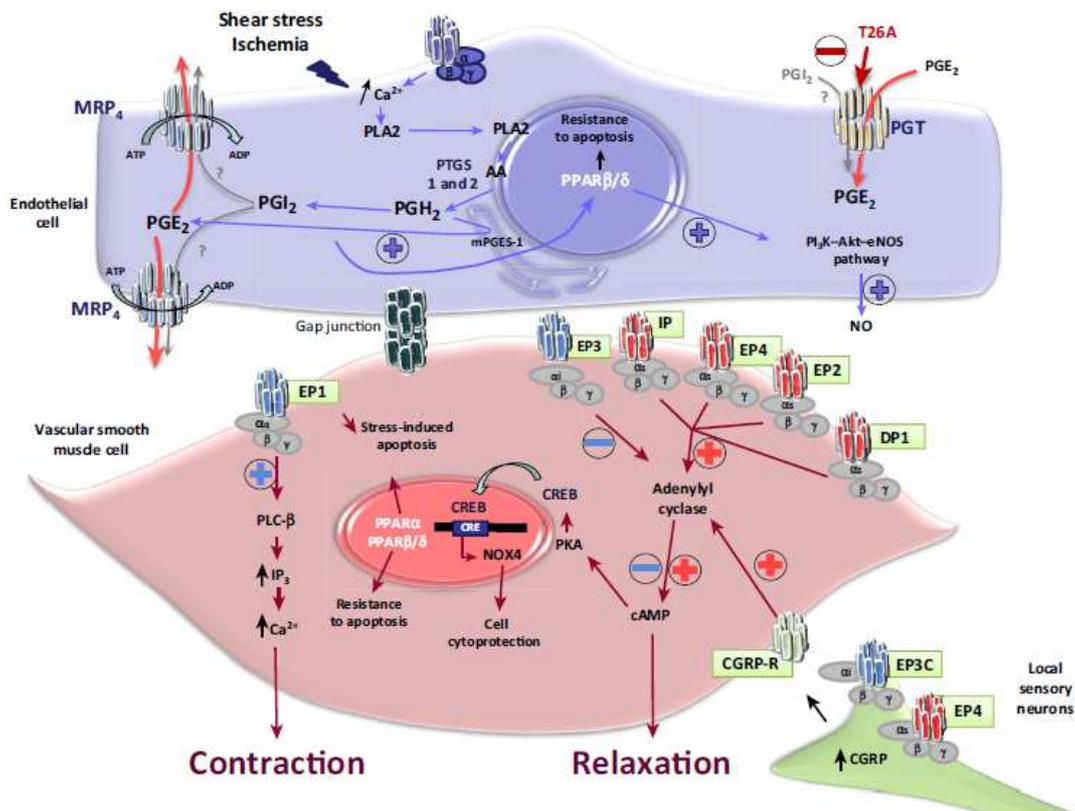


Figure I-15 : Modes d'action des récepteurs aux prostanoides sur l'endothelium<sup>148</sup>

En plus de l'effet vasculaire, les prostanoides sont impliqués dans les mécanismes d'agrégation plaquettaire. Les plaquettes expriment ainsi les récepteurs IP, TP, DP1, EP3, et EP4.<sup>149</sup> La signalisation est similaire à celle prenant place au niveau de la cellule musculaire lisse. Les récepteurs associés à une augmentation de l'AMPC provoquent une diminution de l'agrégation plaquettaire (IP, EP4, et DP1) alors que ceux associés à une diminution de l'AMPC ou une augmentation de la concentration en calcium provoquent une agrégation plaquettaire (TP, EP3).

L'action des analogues de la prostacycline fait aussi intervenir une modulation de l'expression génétique par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires PPAR  $\beta$  et  $\delta$  sur les cellules endothéliales et musculaires lisses.<sup>150</sup> Le transporteur des prostanoides (PGT) est impliqué dans la recapture de certains prostanoides depuis l'environnement cellulaire.<sup>151</sup>

Les prostanoides possèdent une multitude d'effets physiologiques que nous présenterons par rapport à la cicatrisation. Il est néanmoins difficile de séparer l'effet des différents récepteurs des prostanoides. En effet, jusqu'à récemment, il n'existait pas d'agonistes et d'antagonistes suffisamment spécifiques d'un type de récepteur.<sup>146</sup>

### *a) Signalisation des prostanoïdes en conditions pathologiques*

En conditions pathologiques, plusieurs altérations de la signalisation des prostanoïdes ont été décrites. Le transporteur des prostanoïdes (PGT) est surexprimé dans le diabète entraînant ainsi une diminution des niveaux de PGE<sub>2</sub> extracellulaires et une altération de l'angiogénèse.<sup>152</sup>

On retrouve également une surexpression de COX-2 chez la souris diabétique (modèle génétique ob/ob), une diminution des niveaux de PGE<sub>2</sub>/PGD<sub>2</sub> ainsi qu'une surexpression de la COX-2.<sup>153</sup>

En conditions oxydatives, on observe la production d'isoprostanes issus de la peroxydation lipidique de l'acide arachidonique.<sup>154</sup> Ils sont capables d'activer les récepteurs TP impliqués dans la vasoconstriction et la dysfonction endothéliale.<sup>155,156</sup>

Un régime riche en gras sur des rats démontre une augmentation de la synthèse endothéliale de PGE<sub>2</sub>, de PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , et une diminution du ratio PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>, ces altérations étant corrigées par un traitement par metformine.<sup>157,158</sup> En plus de l'altération de cette balance, on retrouve des altérations de la signalisation PGI<sub>2</sub>-IP en conditions pathologiques. Ainsi la PGI<sub>2</sub> peut activer de manière paradoxale le récepteur TP et ainsi promouvoir une dysfonction endothéliale.<sup>159,160</sup>

Dans la pathologie diabétique, on retrouve une diminution de l'expression de la prostacycline synthase faisant intervenir un clivage protéique.<sup>161-163</sup>

### *b) Pharmacologie de la prostacycline*

Au niveau thérapeutique, nous nous intéresserons principalement aux analogues de la prostacycline pour leur efficacité en termes de vasodilatation et leur efficacité clinique dans le traitement des ulcères digitaux du patient sclérodermique.<sup>164</sup> Il existe également des inhibiteurs de la voie de la TXA<sub>2</sub>, mais leur efficacité clinique est limitée et ils n'ont pas démontré d'efficacité dans des modèles de cicatrisation.<sup>165</sup>

	IP	EP1	EP2	EP3	EP4	DP1
Prostacycline/Epoprostenol	++++	++	ND	++++	0	ND
Beraprost	+++	0	0	++	0	0
Iloprost	++++	++++	++++	++	++	+
Treprostinil	+++	++	++++	+	+	++++
Selexipag	++	0	0	0	0	0
ACT-333679	++++	0	0	0	0	+

Tableau I-2 : Affinité relative de la prostacycline et de ses analogues aux récepteurs aux prostaglandines <sup>148</sup>

En clinique, la faible durée de vie (2 minutes à 37°C) de la prostacycline limite son utilisation à une perfusion intraveineuse continue (FLOLAN ®, VELETRI ®) dans le cadre d'un traitement à vie chez les patients HTAP. Le développement d'analogues stables de la prostacycline a permis de développer des analogues à durée de vie augmentée comme l'iloprost, le Treprostinil, le cicaprost, et le beraprost. Comme montré dans le Tableau I-2, ces molécules présentent toutes comme la PGI<sub>2</sub> une affinité variable sur les différents récepteurs aux prostanoïdes. Le besoin de spécificité par rapport au récepteur à la prostacycline (IP) et de médicaments administrables par voie orale a donc conduit au développement d'agonistes IP non analogues de PGI<sub>2</sub> comme le selexipag et son métabolite actif, le MRE 269. Celui-ci se comporte en plus comme un agoniste biaisé du récepteur IP avec un faible recrutement de la bêta arrestine réduisant ainsi la désensibilisation du récepteur IP. <sup>166</sup>

En clinique, l'administration de l'iloprost est le traitement de référence pour le traitement des ulcères digitaux dans le cadre de la sclérodémie systémique.<sup>164</sup> Dans l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs, l'iloprost a un effet bénéfique sur la cicatrisation sans effet sur le risque d'amputation à 6 mois.<sup>124</sup> De plus son utilisation est liée à un risque non négligeable d'effets secondaires systémique lié à l'effet vasodilatateur (Hypotension, flush, céphalées, Risque relatif de 2.11 IC95% [1.79-2.50] contre placebo). L'utilisation du beraprost par voie orale semble également améliorer la cicatrisation, mais les études disponibles sont limitées. <sup>167</sup>

En préclinique, notre laboratoire a montré une amélioration de la cicatrisation d'ulcères sur des modèles murin diabétiques et sclérodermiques lors d'une administration locale de treprostinil par iontophorèse<sup>140,141</sup>. Cette voie d'administration est également en cours d'évaluation chez

l'homme par l'intermédiaire de deux essais cliniques chez les patients diabétiques et sclérodermiques (NCT03654989 et NCT03120533 respectivement).<sup>168-170</sup>

Une équipe japonaise a démontré l'amélioration de la cicatrisation d'ulcère excisionnel sur un modèle murin de diabète lors de l'administration topique de SM-10902, un analogue de la prostacycline.<sup>171,172</sup> Sur un modèle murin de plaie diabétique, l'administration topique de cet analogue a permis une réduction du temps de cicatrisation avec une promotion de la phase de prolifération par augmentation de l'angiogenèse et de la réépithélialisation.

L'inhibition du transporteur des prostaglandines permet l'amélioration de la cicatrisation sur un modèle de souris diabétiques par augmentation du flux sanguin autour de la plaie par amélioration de l'angiogenèse.<sup>152,173</sup>

### 3. Voie du monoxyde d'azote (NO).

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre médiateur cellulaire gazeux impliqué dans la vasodilatation, mais également en tant que neurotransmetteur. Il est produit par les « nitric oxide synthases » (NOS) comportant plusieurs isoformes. Les isoformes nNOS et eNOS sont présentes de manière constitutive et étaient initialement décrites comme responsables de la production de NO au niveau du système nerveux et de l'endothélium respectivement. Cela s'est révélé très simplificateur, ces isoformes ayant été décrites ultérieurement dans d'autres types cellulaires.<sup>174</sup> La forme iNOS est la forme inductible de l'enzyme. Elle est responsable d'une forte production de NO lors d'une inflammation.

La eNOS va permettre l'oxydation de la L-arginine par l'oxygène en utilisant une cascade d'électrons provenant du NADPH produisant ainsi du NO.<sup>175</sup> Celui-ci va traverser la membrane cellulaire et va stimuler la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) par la guanylate cyclase soluble (GCs) dans la cellule musculaire lisse. La GCs fixe le NO principalement par l'intermédiaire d'un cycle hémique sur la sous-unité Beta1.<sup>176</sup>

L'augmentation de la concentration cellulaire en GMPc va provoquer une vasodilatation par déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine. La régulation de la concentration cellulaire de GMPc est médiée par la phosphodiesterase 5 qui permet une balance du tonus vasculaire par dégradation du GMPc en guanosine monophosphate (GMP). Le NO peut aussi agir de manière indépendante au GMPc.<sup>177-179</sup>

La voie du NO-GMPc est associée à une multitude d'effets pouvant améliorer la cicatrisation. Au niveau de la plaie, on retrouve deux producteurs de NO : la cellule endothéliale par l'intermédiaire d'eNOS et les cellules inflammatoires par l'intermédiaire d'iNOS. L'isoforme inductible est responsable d'une forte production de NO (nM- $\mu$ M) durant les premiers jours de la cicatrisation alors que l'isoforme endothéliale est responsable d'une production plus faible (pM-nM). Ces deux isoformes sont indispensables à la cicatrisation normale. On retrouve en effet une dysfonction de la réépithélialisation dans le cadre de souris KO pour la eNOS ou la iNOS ainsi que des souris inhibées pharmacologiquement pour la iNOS.<sup>180</sup>

Le NO joue un rôle majeur dans la réponse antibactérienne. En effet le NO possède des actions antibactériennes à spectre large par son action directe oxydante. Le NO est ainsi capable d'une action bactériostatique et bactéricide et possède la capacité d'éliminer des biofilms.<sup>181</sup>

Au niveau inflammatoire, le NO va avoir des actions multiples sur un panel de processus inflammatoires, de l'induction à sa résolution, son effet étant lié au mode de production (eNOS vs iNOS) et au type cellulaire producteur.<sup>182</sup> Ainsi la production de NO par les neutrophiles est associée à une réponse importante qui est liée à la destruction des microorganismes. Au contraire, la réponse iNOS au niveau des macrophages semble être pro-inflammatoire lorsqu'elle est faible et anti-inflammatoire lorsqu'elle est élevée.<sup>182</sup> Cette réponse anti-inflammatoire passe par une amélioration de l'apoptose des effecteurs pro-inflammatoires liés aux concentration élevées en NO.<sup>183,184</sup>

L'augmentation de la concentration de GMPc présente aussi des effets antifibrotiques, et antiprolifératifs.<sup>185,186</sup>

Comme montré dans la partie précédente, cette voie est dérégulée dans la pathologie diabétique. La surproduction de ROS provoque un découplage de la eNOS aggravant également la production d'espèces réactives.<sup>187</sup> Cette production de ROS touche également la GCs par oxydation du cycle hémique entraînant son inactivation et sa dégradation. Ainsi, en conditions diabétiques, on retrouve une NO altérée démontrée par une diminution des métabolites associés.<sup>188,189</sup>

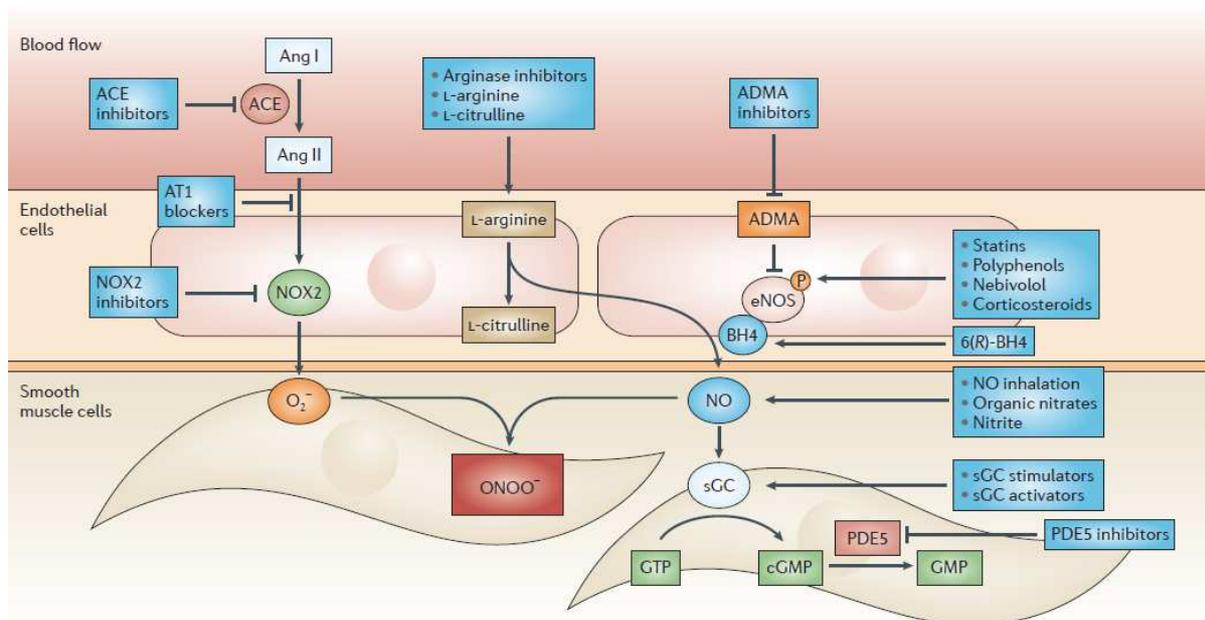


Figure I-16 Stratégies d'augmentation de la signalisation NO-GMPc<sup>190</sup>

Ainsi les thérapeutiques permettant d'améliorer la voie du NO sont nombreuses comme montré dans la Figure I-16. Nous détaillerons seulement quelques pistes pharmacologiques de cette voie :

- Stimulation de la eNOS /Apport exogène de NO
- Stimulation / Activation de la guanylate cyclase soluble
- Inhibition de la dégradation du GMPc

*a) Augmentation de la production de NO: Stimulation de la eNOS ou apport exogène de NO*

On retrouve ainsi différentes stratégies pour la stimulation de la voie du NO en fonction de l'état de la eNOS.<sup>191</sup> Ainsi l'apport de L-arginine, le substrat ou de L-citrulline, nécessite que les NO synthases soient fonctionnelles ce qui n'est pas forcément le cas dans le cadre diabétique.

L'apport systémique d'arginine par l'alimentation montre une amélioration de la cicatrisation sur un modèle de rat diabétique<sup>189</sup> mais on ne retrouve pas d'amélioration chez l'homme dans un essai clinique sur 270 patients diabétiques, l'effet positif étant suggéré dans une analyse de sous-groupe chez des patients ayant une mauvaise perfusion du membre inférieur.<sup>192</sup> La

délivrance locale d'arginine via une formulation simple ou des pansements a également montré une certaine efficacité en préclinique dans le traitement de plaie diabétique.<sup>193,194</sup>

L'apport direct de NO peut passer par l'administration de gaz directement au niveau de la plaie<sup>195-197</sup> ou par la génération de NO in situ à partir de nitrites acidifiés ou de matériaux libérant de manière contrôlée du NO.<sup>198</sup> L'apport exogène de NO est intéressant mais elle peut être impactée par un mécanisme dit de tolérance aux nitrates.<sup>199,200</sup>

Deux essais cliniques ont été réalisés dans le cadre de l'administration de NO par l'intermédiaire de patch générateurs : les essais PATHON et ProNOx1.<sup>135,137</sup> L'essai PATHON s'est terminé en 2012 mais aucun résultat n'a été publié (NCT00428727). L'essai ProNOx1 montre une amélioration significative de la cicatrisation à 12 semaines en comparaison avec un traitement standard de plaies chroniques.

#### *b) Les stimulateurs et activateurs de la guanylate cyclase soluble*

Au lieu de stimuler la production de NO, il est également possible de stimuler directement la guanylate cyclase soluble. En effet, on retrouve deux classes thérapeutiques distinctes qui permettent de produire du GMPc en l'absence de NO : les stimulateurs<sup>201</sup> et les activateurs<sup>202</sup> de la guanylate cyclase soluble. Ainsi comme montré dans la Figure I-17, les stimulateurs de la guanylate cyclase solubles agissent sous la forme physiologique non oxydée de l'enzyme alors que les activateurs de la GCs sont actifs sous la forme inactive oxydée de l'enzyme entraînant une vasodilatation hème indépendant. De plus, ils permettent également de protéger l'enzyme de la dégradation protéique provoquée lors de la perte du noyau hémique par oxydation.<sup>203</sup> Les activateurs représentent donc une perspective intéressante de thérapeutiques car la forme oxydée est plus présente dans des conditions pathologiques oxydatives comme le diabète.<sup>204</sup>

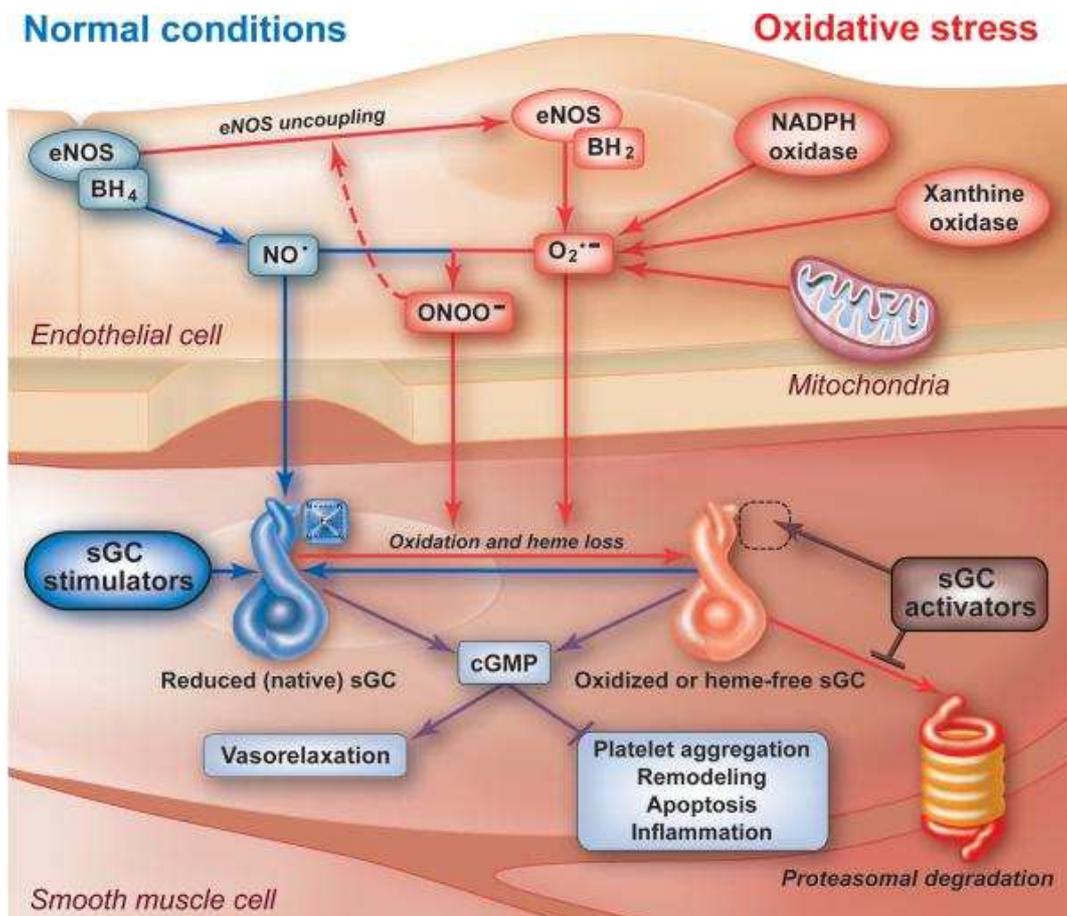


Figure I-17 : Stimulateurs et activateurs de la guanylate cyclase soluble<sup>205</sup>

Aucun stimulateur ou activateur n'a été testé dans le cadre des ulcérations diabétiques. Un essai clinique a été terminé sur le traitement des ulcérations digitales des patients sclérodermique (RESCUE, NCT02915835), les résultats n'étant pas encore disponibles. Sur le plan préclinique, le riociguat a démontré une amélioration de la cicatrisation sur le modèle sclérodermique murin Tsk<sup>-/+</sup> (mutation du gène codant pour la fibriline).<sup>206,207</sup> Des expériences préliminaires chez le modèle sclérodermique murin uPAR<sup>-/-</sup> (mutation du gène codant pour le récepteur à l'urokinase) dans notre laboratoire ont également montré une amélioration de la cicatrisation lors de l'administration d'un activateur de la guanylate cyclase, le cinaciguat, par iontophorèse.<sup>140</sup> L'utilisation chronique d'aticiguat, un activateur, améliore la fonction endothéliale et l'activation plaquettaire sur un modèle de rats diabétiques.<sup>208-210</sup>

### *c) Les inhibiteurs de PDE5*

La phosphodiesterase 5 (PDE 5) est l'enzyme qui permet la dégradation du GMPc en GMP et module ainsi la réponse de la voie du NO-GMPc. On retrouve une augmentation de l'expression de PDE5 chez des modèles de souris diabétiques diminuant ainsi la concentration cellulaire et les effets du GMPc.<sup>211,212</sup>

En clinique, les inhibiteurs de PDE 5 (sildénafil, tadalafil) sont utilisés dans les ulcères digitaux associés à la pathologie sclérodermique mais aucun essai a évalué l'efficacité dans la pathologie diabétique.<sup>213</sup> Le sildénafil semble pouvoir améliorer la cicatrisation cutanée par son action<sup>214</sup> même si certaines études précliniques réalisées sur des plaies ischémiques montrent une diminution de la cicatrisation.<sup>215,216</sup>

#### 4. Voie de l'endothéline (ET-1)

Les endothélines sont une classe de médiateurs peptidiques : endothélines 1,2, et 3 (ET-X). Elles agissent par l'intermédiaire de quatre RCPG nommé ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. ET-1 et ET-2 agissant de manière préférentielle sur les récepteurs ET<sub>A</sub> à l'opposé de ET-3 qui possède une affinité relative supérieure pour ET<sub>B</sub> par rapport à ET<sub>A</sub>.<sup>217</sup> ET-1 est un vasoconstricteur important du système vasculaire et est produite par la cellule endothéliale et va jouer un rôle dans le maintien du tonus vasculaire comme montré sur la Figure I-18.<sup>218,217</sup> Le récepteur ET<sub>A</sub> est présent au niveau de la cellule musculaire lisse et provoque une vasoconstriction par activation de la voie de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>). Le récepteur ET<sub>B</sub> est présent à la fois au niveau de la cellule musculaire lisse, mais également au niveau de l'endothélium. À cause des différences d'affinités, le récepteur ET<sub>B</sub> est impliqué au niveau vasculaire dans un mécanisme de rétrocontrôle par la libération de NO vasodilatateur.

L'endothéline a aussi un effet profibrotique par stimulation de la production de matrice extracellulaire et par la stimulation de la différenciation de différents types cellulaires en myofibroblastes.<sup>219</sup>

Comme les autres voies de la vasodilatation, on retrouve une altération de cette voie dans le cadre du diabète avec des niveaux plasmatiques d'endothéline élevés liés à la pathologie oxydative.<sup>220,221</sup> On retrouve notamment une augmentation de la synthèse d'IL-6 et de MCP-1 provoquant une prolongation de la phase inflammatoire.<sup>222</sup>

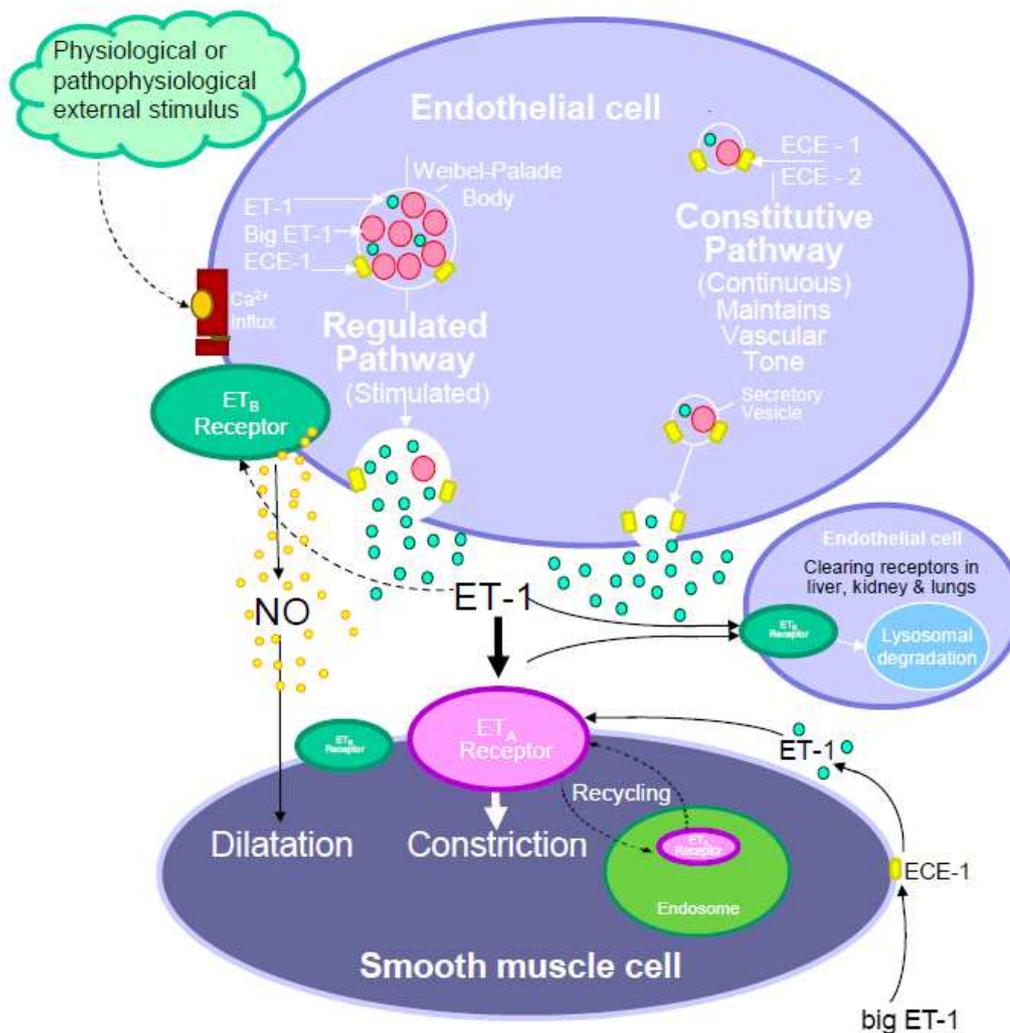


Figure I-18 : Physiologie de l'endothéline au niveau de l'endothélium<sup>217</sup>

Le ciblage pharmacologique de la voie de l'endothéline passe principalement par l'utilisation des antagonistes des récepteurs aux endothelines (ARE). Parmi les autres modulateurs non commercialisés, on trouve l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de l'endothéline<sup>223</sup> ou la séquestration plasmatique de l'endothéline-1 par des protéines de fusion.<sup>224,225</sup>

Les ARE sont classifiés en antagonistes mixtes ou en antagonistes sélectifs. La sélectivité est déterminée par calcul du ratio de sélectivité  $ET_A/ET_B$  qui est en général supérieur à 100 pour les principes actifs sélectifs. Ainsi, en clinique, parmi les 3 principes actifs avec une autorisation de mise sur le marché, on retrouve le bosentan, l'ambisentan, et le macitentan avec un ratio  $ET_A/ET_B$  de 20, 150, et 190 respectivement. Au niveau clinique, on ne retrouve aucun

traitement faisant usage d'ARE dans l'atteinte diabétique, mais ils sont utilisés dans la prévention des ulcères chez le patient sclérodermique.<sup>226,164,227</sup>

Au niveau préclinique, les souris KO pour la synthèse d'endothéline-1 endothéliale présentent une amélioration de la cicatrisation cutanée.<sup>228</sup>

## D. Délivrance cutanée de médicaments : principes généraux et intérêts des nanoparticules lipidiques

Nous avons montré que les traitements vasodilatateurs pouvaient améliorer les phénomènes de cicatrisations cutanés par amélioration du flux sanguin local, mais également par régulation des différents processus altérés chez le patient diabétique.

Les voies systémiques (orale, sous-cutanée, nasale, inhalée ou intraveineuse) ne sont pas les méthodes de délivrance les plus adaptées. En effet, l'altération de la perfusion au niveau de la zone de la plaie provoque également une diminution de la concentration effective en principe actif au même niveau. Une augmentation de la dose administrée n'est pas un bon moyen d'amélioration de l'efficacité locale car elle provoque une augmentation des effets indésirables systémiques comme l'hypotension systémique.<sup>229</sup>

La piste locale est donc une piste intéressante dans le traitement des ulcères chroniques car elle permet d'augmenter la concentration locale en principe actif tout en diminuant les effets systémiques secondaires. Dans cette partie, nous réaliserons en premier temps une présentation générale des différentes méthodes utilisables pour l'administration locale sur ulcère. Dans un second temps, nous présenterons une revue de la littérature sur les nanoparticules lipidiques et leur utilisation dans le traitement des maladies dermiques. Dans un dernier temps, nous présenterons les nanoparticules lipidiques évaluées dans le cadre de ce travail, les Lipidots.

### 1. Méthodes d'administration cutanée

Le stratum corneum est la barrière principale à la pénétration de principe actif dans la peau. Il existe plusieurs méthodes qui permettent d'améliorer la délivrance cutanée de principe actif que l'on peut résumer en deux catégories : les méthodes actives et les méthodes passives.

Les méthodes passives passent par l'amélioration de la forme galénique ou du principe actif alors que les méthodes actives permettent de forcer le passage du stratum corneum par l'utilisation de dispositifs permettant le contournement ou la perturbation du stratum corneum.

#### *a) Méthodes passives*

Les méthodes passives reposent sur des modifications apportées au principe actif ou à sa formulation. Elles passent par une amélioration de l'activité thermodynamique du principe actif et/ou par l'utilisation d'agents de pénétrations chimiques.<sup>230</sup>

Le passage à travers le stratum corneum est médié par des mécanismes de diffusion passive : le principe actif passe d'une zone avec une forte concentration vers une zone de plus faible concentration. Le flux à l'état d'équilibre peut être résumé par ci-dessous :

$$J_{ss} = \frac{ADKC_v}{h}$$

*Équation I-1 : Loi de Fick pour la diffusion passive à l'état d'équilibre avec A : surface de contact / D : coefficient de diffusion dans le stratum corneum / K : coefficient de partition véhicule/stratum corneum / C<sub>v</sub> Concentration du véhicule / h distance de diffusion dans le stratum corneum.*

Les stratégies d'augmentation de la diffusion passive passent par une modification de la concentration (systèmes hypersaturés), par une modification du coefficient de partition et de diffusion (agents de pénétration) et par une modification de la distance de diffusion (méthode active).

La modification de la concentration est limitée par la solubilité dans la formulation. Il est ainsi normalement impossible de dépasser une concentration et donc un flux maximal. Les systèmes hypersaturés présentent une concentration en principe actif supérieur à la limite de solubilité réalisée par un mélange de solvant/cosolvant ou in situ par évaporation du solvant (ethanol).<sup>231</sup> Ces systèmes permettent alors l'augmentation du flux cutané, mais implique une plus faible stabilité avec risque de cristallisation.<sup>232</sup>

Les agents de pénétration chimiques agissent par une perturbation de l'organisation lipidique du stratum corneum.<sup>233</sup> La perturbation de l'organisation lipidique passe différents mécanismes en fonction du type d'agents. Ils peuvent fluidifier la matrice lipidique, augmenter la solubilité de la matrice lipidique pour le principe actif, ou encore extraire les lipides de la matrice augmentant ainsi le flux de principe actif au niveau du stratum corneum.<sup>233</sup> Les agents de pénétration les plus connus étant l'éthanol, le propylène glycol, et l'acide oléique.

D'autres stratégies passent par la complexation ionique comme pour la forme topique du diclofénac qui est complexé avec un groupement diéthylamine ou par la formation de mélanges eutéctiques par le mélange de composés permettant la diminution du point de fusion et donc l'augmentation de la perméabilité cutanée comme pour la crème lidocaine/prilocaine.<sup>234,235</sup>

## *b) Méthodes actives*

Les méthodes de délivrance actives forcent le passage du principe actif par des méthodes physiques notamment électriques à l'opposé des méthodes passives.<sup>236</sup> Les méthodes principales sont résumées dans le Tableau I-3.

Méthode	Principe
Injection directe/Microaiguille /Electroporation	Shunt du stratum corneum
Tape Stripping/Dermabrasion	Ablation partielle ou complète du stratum corneum
Iontophorèse	Passage dermique à l'aide d'un courant électrique qui propulse le principe dans la peau

*Tableau I-3 : Méthodes actives de délivrance cutanée*

Les méthodes de type injection directe et micro-aiguilles visent à shunter le stratum corneum pour délivrer le médicament directement au niveau de l'épiderme et du derme.<sup>237</sup> Les micro-aiguilles sont particulièrement intéressantes pour les applications vaccinales par la facilitation de l'administration et l'augmentation de l'efficacité.<sup>238,239</sup>

Les méthodes de tape stripping et de dermabrasion réduisent la taille du stratum corneum et donc la distance que doit parcourir le principe actif avant d'atteindre l'épiderme viable.

L'iontophorèse passe par le passage d'un courant électrique.<sup>240</sup> Par contrôle du courant électrique ? il est notamment possible de contrôler la quantité de principes actifs, car celle-ci est reliée directement à la quantité de charge appliquée.<sup>241</sup> L'électroporation est similaire à l'iontophorèse par l'utilisation d'un courant électrique mais le champ électrique appliqué étant plus important, on retrouve une perturbation importante du stratum corneum.<sup>242</sup>

## **2. Administrations sur ulcères**

Les principes énoncés dans la partie précédente sont applicables uniquement lorsque le stratum corneum est intact. Or, lors de l'ulcération, on retrouve une destruction de la barrière cutanée avec une forte hétérogénéité clinique.<sup>243</sup> On retrouve des ulcères plus ou moins profonds, ayant une vascularisation plus ou moins existante, un tissu nécrotique ou de fibrine en fonction du patient. Cette forte diversité va modifier la délivrance de principe actif au niveau de la plaie. Par exemple, nous avons montré une différence sur le passage systémique du Treprostinil lors

de l'administration par iontophorèse du Treprostinil sur deux modèles d'ulcères comme montré dans la Figure I-19. <sup>141</sup> On retrouve un passage systémique plus important lors de l'administration directe le jour de l'ulcère par rapport à l'administration sur peau saine lors de l'administration sur modèle excisionnel contre un modèle d'ulcère de pression dans lequel il existe un tissu fibrino-nécrotique.

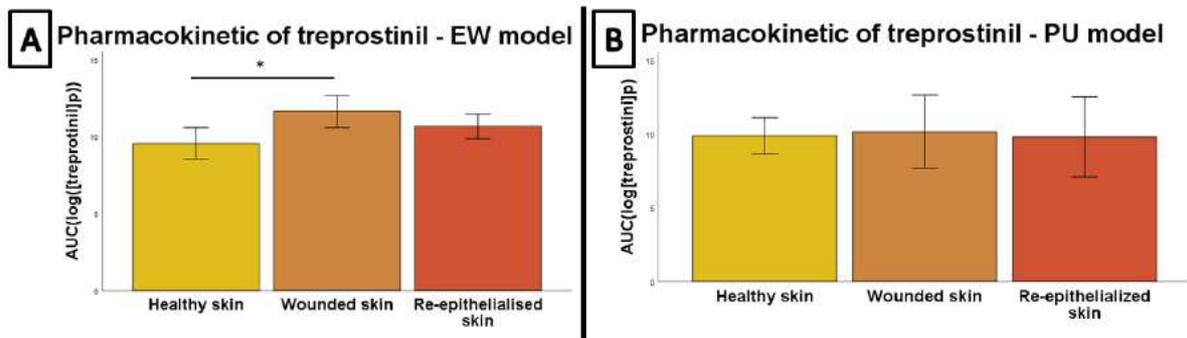


Figure I-19 : Pharmacocinétique du Treprostinil sur peau saine, peau ulcérée et peau cicatrisée sur des ulcères excisionnel (A) et de pression (PU). \*  $p=0.006$  <sup>141</sup>

La délivrance intra ulcère doit donc faire l'objet d'une délivrance contrôlée afin de limiter le passage systémique du principe actif tout en permettant la délivrance locale suffisante.

Pour l'administration sur ulcère, les méthodes utilisées sont plus classiquement l'utilisation de gels associés à des pansements directement au niveau de la plaie. Il existe également des cas d'application directe par injection dans les berges de la plaie. <sup>244</sup>

### 3. Nanoparticules lipidiques dans le traitement des affections cutanées

Cette revue est une revue de la littérature concernant les nanoparticules lipidiques pour le traitement de maladies cutanées. La première partie de cette revue explore la peau et les mécanismes de pénétration cutanée. Dans une deuxième partie, nous établissons une classification des différents types de nanoparticules, et nous évaluons les nanoparticules lipidiques et leur intérêt dans la délivrance cutanée. Dans une dernière partie, nous étudions la littérature préclinique in vivo sur le traitement des maladies cutanées à l'aide de nanoparticules lipidiques.

Elle est en cours de publication dans le journal Fundamental & Clinical Pharmacology.

Lipid nanoparticles for the treatment of skin diseases.

Raphael Bouvet<sup>1,2</sup>, Dorothée Jary<sup>2</sup>, Sophie Blaise<sup>1</sup>, Matthieu Roustit<sup>1</sup>, Jean-Luc Cracowski<sup>1</sup>

1. Univ. Grenoble Alpes, Inserm U1042, 38000 Grenoble, France
2. CEA Leti DTBS

1. Introduction.....	3
2. Skin as a target for drug delivery .....	4
2.1. Skin as a complex barrier for drug diffusion .....	4
2.2. Diffusion of drugs through the skin.....	5
2.3. Parameters affecting drug diffusion through the skin .....	6
3. Nanoparticles for dermal drug delivery. ....	8
3.1. Introduction .....	8
3.2. Lipid nanoparticles: development and characteristics.....	10
3.3. Lipid nanoparticles: Skin Delivery.....	11
4. State of the art: Lipid nanoparticles for the treatment of skin diseases. ....	12
4.1. Skin inflammatory diseases:.....	12
4.1.1. Psoriasis and Dermatitis .....	12
4.1.2. Acne .....	15
4.2. Skin Cancer.....	17
4.3. Wound delivery .....	18
4.4. Anti-infective.....	20
4.5. Local anesthesia.....	22
5. Conclusion and prospects. ....	23

## 1. Introduction

The skin acts as the main penetration barrier to protect the human body against toxic agents and microorganisms, and therefore as a barrier for topical drug delivery. However, despite its barrier function, the skin is an attractive route for local drug delivery in order to enhance drug concentration in the skin together with a reduction in the systemic side effects compared to parenteral or oral drug routes targeting the skin. On another hand, skin topical delivery also raised interest for systemic delivery to overcome the first pass hepatic metabolism. Drugs formulations are established specifically for transdermal delivery and frequently comprise penetration enhancers used to overcome low drug update rates. Many researchers are developing micro- and nanoparticulate systems to enhance cutaneous absorption, with an increasing activity in this nano field over the last 10 years. The strict definition of nanoparticles is of particles with one of their external dimensions comprised between 1 nm and 100 nm. [1] The FDA considers that a product involves the application of nanotechnology in the latter case, or if a product exhibits properties attributable to its dimensions even if these dimensions fall outside the nanoscale range, up to 1 $\mu$ m. [2] Researchers use many different substrates including inorganic and organic materials (polymers and lipids) to prepare nanoparticles. The field of lipid-based nanoparticles appears to be advantageous in skin delivery due to their inherent biocompatibility with the skin. We will therefore focus on this field for this review.

In this review, we will summarize the general mechanisms of diffusion of drugs through the skin. Secondly, we will present the main categories of nanoparticles with a focus on lipid nanoparticles and their effect on skin delivery. Lastly, we will review available data assessing lipid nanoparticles for skin diseases with a focus on *in-vivo* evidence.

## 2. Skin as a target for drug delivery

### 2.1. Skin as a complex barrier for drug diffusion

Skin is composed of three layers, which are from the surface to the depth the epidermis, the dermis, and the hypodermis also named subcutaneous tissue (Figure 1).

The epidermis is the most apical tissue and is composed of different layers of keratinocytes which differentiate while migrating towards the apical layer. The epidermis is avascular and metabolic exchanges provide from the interface with the underlying dermis. The tissue is in constant renewal state with cells migration from basal to outermost layers. In the innermost stratum basale, keratinocytes are produced from local stem cells and then migrate towards the outermost stratum corneum. Across the intermediary layers (stratum spinosum, granulosum, and lucidum), keratinocytes differentiate, present morphological changes, and produce lamellar bodies which ultimately form the extracellular matrix of the stratum corneum. In this superficial layer, keratinocytes lose their nucleus and become corneocytes with an intracellular matrix of keratin and a cross-linked cornified envelope. Corneocytes are linked together through corneodesmosomes [3] with the extracellular matrix of lipids forming stacked lipid bilayers in a crystalline-fluid-crystalline pattern. This structure is responsible for the protection of the skin to the loss of water from the organism and the penetration of external substances (living, toxins or applied drugs).[4]

A basement membrane links the stratum basale to the dermis. The dermis is a 2 mm to 5 mm thick connective tissue, mostly acellular, composed of a collagen, and proteo- and glyco-aminoglycan matrix secreted by tissue fibroblasts. A dense network of arterioles, capillaries and venules structured in two parallel plexuses irrigate the dermis while the epidermis is avascular. This microvascular network enables metabolic exchange with the epidermis and clears administered drugs from the skin to the systemic circulation. This dense vascular network plays a major role in body thermoregulation.[5] The epidermis and the dermis also possess some metabolic activity on xenobiotics.[6]

The hypodermis also named subcutaneous tissue is the deepest skin layer mostly composed of adipocytes interconnected through collagen and elastic fibers. The hypodermis plays three main functions: energetic storage, structural support and thermal modulation. The hypodermis has limited impact on processes implied in drug delivery.

## 2.2. Diffusion of Drugs through the Skin

The stratum corneum is the main barrier for skin penetration for most of topically applied substances. Drugs can diffuse across the stratum corneum through intercellular, intracellular and transappendeal pathways (see figure 1).

The intracellular pathway requires repeated partitioning between the extracellular lipidic and the intracellular hydrophilic matrix as well as diffusion through the cornified layer of corneocytes. Consequently, the contribution of this pathway is weak despite the large surface area represented by corneocytes.

The intercellular pathway is the main pathway for drug penetration through the stratum corneum. The drug needs initially to be released from the formulation and distributed to the lipidic extracellular matrix of the stratum corneum, drug lipophilicity increasing this passive diffusion. On the opposite hydrophilic drugs ( $\log P < 1$ ) will diffuse in the polar heads region of the amphiphilic lipids. In contrast, hydrophilic drugs will diffuse more easily in the viable epidermis due to its higher hydration compared to the stratum corneum. [7]

Hair follicles and sweat glands act as shortcuts for drug penetration within the skin. These transappendeal pathways are a significant route for drug penetration especially in case of nanoparticles or massage application of topical formulations. [8] The efficacy of drug diffusion will therefore depend on the density of skin appendages that varies considerably, with skin territory such as palms and sole of the foot devoid of hair follicles. It can also be a predominant route of delivery in specific conditions such as alopecia or acne.

### 2.3. Parameters affecting drug diffusion through the skin

Skin penetration is affected by drugs physicochemical characteristics, their formulation and the skin properties.

Among drug physicochemical characteristics, lipophilicity is a major factor, as highly lipophilic drugs exhibiting a  $\log P > 4$  are able to diffuse faster in the stratum corneum but can hardly diffuse into the underlying more hydrophilic viable epidermis. In contrast, highly hydrophilic drugs, with  $\log P < 0$ , are not able to enter into the stratum corneum. Therefore, the best compromise is drugs exhibiting an intermediate  $\log P$  ranging from 2 to 3. The melting point of a drug is a great estimator of skin penetration characteristics since low melting point is associated with high solubility in both oils and water.[9] For example, eutectic mixtures, a mixture of components with the lowest melting point compared to components alone, will have increased skin penetration.[10] A second parameter is drug molecular weight. Large molecules are physically restricted in the intercellular pathway. Around 500 Dalton is the start of a steep decline in skin absorption through the corneal layer barrier due to molecular size.[11] In addition, the free

movement of drugs in the intercellular route and skin appendages is restricted for rigid particles larger than 10 nm [12]. In addition, while 115 nm diameter elastic vesicles can penetrate the viable skin [13], 126 nm rigid does not. The size of the particles can be increased following skin massage [14]. The third factor is the ionization of the drug that decreases the partitioning in the stratum corneum. This effect may be offset by the increased solubility in the formulation.[15]

The drug formulation has an important impact on drug skin delivery and is influenced by the drug physicochemical characteristics. First, the flux of drugs through the stratum corneum is maximal when saturation is obtained in the vehicle formulation. Secondly, penetration enhancers improve skin penetration through the increased thermodynamic activity of the drug and its diffusion, partition, and solubility in the stratum corneum. [16,17] Examples of widely used penetration enhancers include solvents such as water, ethanol, and propylene glycol, fatty acids such as oleic acid and surfactants. [17] Classical formulations (creams, gels, emulsions) lack controlled delivery as well as the ability to deliver new pharmaceutical active ingredients such as proteins and nucleic acids. [17–19]

Active physical methods of penetration such as iontophoresis, sonophoresis are utilized in order to enhance drug penetration. The use of microneedles, dermabrasion, or electroporation is able to breach the stratum corneum. Those methods enable skin permeation for transdermal delivery, controlled delivery, and delivery of large molecules, however, they require additional equipment, training and higher development costs (for review see [21]).

Skin physiological characteristics also modify the penetration of drugs. Sex and ethnicity do not have any effect on the barrier function of the skin .[22] In contrast, the skin of newborn and neonatal children is more permeable to drugs because of incomplete development of the stratum corneum. [23] On the other hand, ageing is associated with modifications in the structure and the function such as water and protein content which may decrease cutaneous penetration of hydrophilic drugs. [22, 23] The penetration fluxes also vary with the anatomical site. For example, the skin penetration fluxes are higher in the genital and face area compared to back skin. [26] Whether drug formulation is intended to be applied on healthy or diseased skin is a major issue. Skin disorders such as psoriasis and atopic dermatitis modify the barrier function. For example, atopic dermatitis skin presents increased transepithelial water loss and increased drug penetration flux. [27,28] Application of drugs on wound beds is also characterized by increased systemic bioavailability due to the easy access to the skin microcirculation but the

penetration rate will also depend on the nature of the wound (for example presence of eschar, of fibrin, of exudation).[29]

In this review, we will define skin penetration as the transport into the stratum corneum and lower skin structures and skin permeation as the transport across the entire skin into the systemic circulation (or receptor fluid for in vitro testing) as shown in figure 1.

### 3. Nanoparticles for dermal drug delivery.

#### 3.1. Introduction

Nanoparticles can be split in three main types: inorganic, polymeric or lipid-based nanoparticles as described in Figure 2.

The skin penetration of inorganic nanoparticles was investigated primarily for titanium dioxide nanoparticles ( $\text{TiO}_2/\text{ZnO}$ ) in sunscreen formulations.  $\text{TiO}_2$  and  $\text{ZnO}$  nanoparticles do not penetrate the healthy skin when their size is superior to 10 nm. [30] Metallic nanoparticles such as gold nanoparticles (AU-NP) were used for the cutaneous delivery of antimicrobial peptides [31] and the immune suppressant methotrexate [32] (for overall review see [33,34] ). However inorganic nanoparticles are less used due to toxicity concerns. [35]

Polymeric nanoparticles are formulated using synthetic or natural polymers in different shapes: nanocapsules, dendrimers, nanoparticles and hybrid nanoparticles (see figure 2). Polymeric nanoparticles possess a high capacity for controlled and triggered release. The multiplicity of polymer chemistries and assemblies is the main driving point of polymeric nanoparticles research. Several polymeric nanoparticles are in development for cutaneous delivery of siRNA, DNA, proteins, drugs (for review see [36]).

Lipid nanoparticles are formulated using synthetics or natural lipids whether amphiphilic or not, and other types of surfactants. Two main categories of lipid nanoparticles can be distinguished: vesicle/nanocapsule like and particulate/nanosphere like (see figure 2). Vesicles lipid nanoparticles such as liposomes are formulated using lipidic surfactants to form a lipid bilayer with an aqueous core. Enhancement in liposome formulation led to flexible vesicles and ethanol containing liposomes (ethosomes) which are being investigated for transdermal

delivery (for review see [37,38]). Vesicles lipid nanoparticles are thus very different from particulate lipid nanoparticles and will not be considered in this review.

Particulate lipid nanoparticles possess an oily core composed of oil droplets in the case of nanoemulsions and microemulsions, solid lipids in the case of solid lipid nanoparticles, and blend of liquid and solid lipids in the case nanostructured lipid nanoparticles.

### 3.2. Lipid nanoparticles: development and characteristics

Both nanoemulsions and microemulsions are colloidal dispersions formulated using water, oils and surfactants. Nanoemulsions require energy input during preparation while microemulsions are formed spontaneously. Therefore microemulsions are thermodynamically stable while nanoemulsions are not. However, nanoemulsions are kinetically stable and can resist temperature changes as well as dilutions while microemulsion stability is linked to the initial thermodynamic conditions during formulation. [39,40](for review see [41]). Most nanoemulsions are oil in water (o/w) emulsions while water in oil (w/o) are rarer due to the lipidic dispersing phase. [42] As the core of o/w nanoemulsions is liquid at room temperature, there is poor control over the release rate of encapsulated active agent.

Solid Lipid Nanoparticles (SLN) are the oily droplets of an oil in water (o/w) emulsion replacing the liquid lipids of the core by solid lipids. This leads to a nanoparticle dispersion with a solid lipid core at room temperature. While the solid core should lead to sustained release of the drug, its crystallization during production and mainly storage leads to the expulsion of the encapsulated drug therefore limiting the usability of this kind of carriers. [43]

Nanostructured Lipid Carriers (NLC) were developed to overcome this issue. [44] Their core is composed of a blend of solid and liquid lipids in order to stabilize the lipid core. The encapsulation is more stable during formulation and storage and the use of liquid lipids helps to increase the drug loading. [45,46] Such nanoparticle is a flexible technology where different constituents can modify drug release, surface affinity and targeting. The nanoparticle core can be formulated to produce different release kinetics while the nanoparticle shell can be modified with the addition of cationic or anionic lipids as well as PEGylated surfactants to modify the surface activity. [46] Surface modification can increase encapsulation of drugs through ionic pairing [47] or grafting. [48] LNP (Lipid nanoparticles) are able to protect encapsulated drug from oxidation [49,50] and to encapsulate more than one drug enabling combination

therapy.[50,53–55] LNP can also be coated or embedded in polymeric matrices such as chitosan or cellulose derivatives to modify release kinetics [52,54,55] and to enable application in wound dressings scaffolds. [56,57]

### 3.3. Lipid nanoparticles: Skin Delivery

Improved skin delivery with lipid nanoparticles include 3 main mechanisms: hydration of the stratum corneum, carrier effect, and controlled release.

Firstly, lipid nanoparticles interact strongly with the stratum corneum owing to the lipidic affinity between LNP lipids and stratum corneum ones. After interacting with the skin, lipid nanoparticles form a lipidic film on the skin surface which increases skin hydration. [58] The modification of the stratum corneum due to increased hydration increases drug penetration through higher drug solubility and partition.[7] The lipidic film also controls the diffusion of the active through the skin which helps to protect the skin from drug-related irritation. [50,59–61]

Secondly, they can be formulated with lipidic penetration enhancers such as oleic acid or terpenes to increase drug penetration.[62] Surface modification using cationic lipids and cationic amino acids sequences like cell penetrating peptides (CPP) have shown to increase skin penetration due to the strong adhesion with the negative charged surface of the skin. [51,63,64]

There is no evidence that solid lipid nanoparticles are able to permeate the stratum corneum while flexible nanoparticles can do so. [65]. In addition, lipid nanoparticles are also able to penetrate deeply into the follicular unit [66] enabling targeted and sustained delivery to the follicular unit and adjacent structures (stem cells, systemic circulation).

## 4. State of the art: Lipid nanoparticles for the treatment of skin diseases.

### 4.1. Skin inflammatory diseases:

#### 4.1.1. Psoriasis and Dermatitis

Psoriasis is a chronic autoimmune disorder involving the skin and the joints while dermatitis is characterized by local skin inflammation.[67–69] Psoriasis is characterized by abnormal epidermal proliferation with epidermal scales. Symptoms for dermatitis include itchiness, red skin, rash, blisters, and pruritus. In psoriasis, the stratum corneum barrier is defective with an increase in transepithelial water loss as well as a perturbation of normal pharmacokinetics.[70] Penetration of active is considered to be increased in psoriatic skin, while skin penetration has been shown to be decreased for certain treatments such as clobetasol when measured in vivo with microdialysis.[71,72]

Topical treatment of these skin inflammation diseases include the use of emollients, glucocorticoids (betamethasone), calcineurin inhibitors (cyclosporine A, tacrolimus) and vitamin D analogues (calcipotriol).[69,73,74] Due to the systemic impact of psoriasis (rheumatism, large skin affected area), topical therapy can also be used in combination with systemic biological therapy to decrease dosing and increase efficacy.[75]

Betamethasone and calcipotriol were co-encapsulated in SLN .[76] In ex vivo human cadaver skin, SLN encapsulation increased skin penetration of betamethasone and calcipotriol by a 5.3 and 2.80 fold respective increase compared to a marketed ointment, Daivobet®. On the murine tail model, the SLN formulation was better at reducing epidermal size compared to the marketed ointment [76]. Both formulations were not associated with any irritation.

Cyclosporine A and calcipotriol were co-encapsulated in SLN and NLC.[53] In ex vivo pig skin, penetration of cyclosporine A and calcipotriol was higher in SLN and NLC gels in viable skin layers compared to the free drug. In a murine model of psoriasis (induced by topical 5% imiquimod gel on the ear of the mice), the SLN and NLC gels reduced inflammation and ear thickness. This was due to the reduction in inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) greater in the SLN and NLC gels compared to a marketed topical gel of betamethasone. This reduction also permitted the resolution of systemic inflammation. It can also be noticed that the NLC effectiveness was greater compared to the SLN formulation.

Tacrolimus was encapsulated in SLN .[77] *In vitro*, on pig ear skin, SLN formulation increased skin penetration compared to the commercial tacrolimus ointment (Protopic®). *In vivo*, using radiotracerable drug, it was evidenced that the application of the tacrolimus SLN formulation increased skin penetration. On DNFB (1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene) sensitized mice, a model of atopic dermatitis, the SLN formulation was effective for reduction of ear thickness.[59] The

SLN formulation also showed reduced skin irritation during acute and repeated dosing in Wistar Rats.

Methotrexate is an inhibitor of dihydrofolate reductase and is an antiproliferative used for the treatments of cancers as well as psoriasis. Methotrexate was encapsulated in NLC and applied on a mice model of psoriasis (induced by application of 5% imiquimod on the skin).[78] Encapsulation in NLC increased the efficacy of methotrexate with a reduced score on psoriasis lesions compared to non-encapsulated methotrexate.

Tretinoid was encapsulated in liposomes, ethosomes, SLN and NLC to compare the difference in skin penetration and efficacy.[50] The *ex vivo* permeation in mice skin was ordered as ethanolic solution, NLC, SLN, ethosome, liposome and the commercial gel. The skin retention was ranked as liposomes, NLC, SLN, ethosomes, commercial gel and ethanolic solution. The encapsulation in SLN and NLC dramatically increased photo stability compared to other formulations. On mouse skin, tretinoin was irritant when delivered with the marketed gel and ethosomal formulations while SLN, NLC and liposomes formulations produced no irritation. On the mice tail model, a model of antipsoriatic activity (evaluation of the formation of a keratin layer), NLC and liposomes increased the activity of tretinoin compared to the marketed gel which supports the skin retention data. The ethosomal gel did not prove better efficacy than the commercial solution.

Celecoxib, a COX 2 specific nonsteroidal anti-inflammatory drug, was encapsulated in surface modified NLC. [79] A polyarginine peptide composed of 11 arginines permitted increased dermal retention without skin permeation on hairless rat skin *ex vivo*. Dermal concentration measured *in vivo* using microdialysis was also higher compared to Celecoxib in solution (10% Ethanol, 2.4% PEG-400; 7 fold at 12 hours) and unmodified NLC (2.3 folds at 12 hours). On DNFB (1-Fluoro-2, 4-dinitrobenzene) sensitized mice, celecoxib-NLC polyarginine treatment decreased ear thickening. On xylene treated mice, the celecoxib-NLC polyarginine treatment decreased the level of inflammatory mediators (IL-6 and PGE<sub>2</sub>) measured by microdialysis.

In the same research group, ketoprofen (non-specific nonsteroidal anti-inflammatory) and spantide II (a tachykinin receptor antagonist) were co-encapsulated in polyarginine modified NLC.[80] *Ex vivo* on hairless rat skin, after 24h, the polyarginine modified NLC increased penetration of spantide II and ketoprofen as well as permeation of ketoprofene. On DNFB

sensitized mice coencapsulation of ketoprofen and spantide II in polyarginine NLC was effective in reducing ear thickness.

While other groups demonstrated the ability to encapsulate other antipsoriatic drugs, without evaluation of their therapeutic efficacy (fluocinolone [81]; clobetasol [82]; etanecept and methotrexate [48]; tacrolimus and clobetasol [52], tacrolimus [83], Prednicarbate [84–86], dexamethasone [87], psoralen [88–90], betamethasone-17-valerate [91], methotrexate [92], diflucortolone valerate [93,94], calcipotriol and methotrexate [95].

#### 4.1.2. Acne

While psoriasis and dermatitis affect the whole skin, acne is an inflammatory disease of the skin targeting the pilosebaceous unit.[96] Topical treatment includes antimicrobial therapy, retinoids (transretinoic acid, isotretinoid and adapalene), and anti-hormonal therapy (spironolactone, drospirénone).[97] The follicular localization is of particular interest as follicular delivery is enhanced with nanoparticles.[8,66]

Trans-retinoic acid was encapsulated in cationic SLN [47] enabling higher encapsulation and stability compared to neutral SLN due to an ionic pairing effect. On rhino mice, a model of acne with defective inflammatory response, the daily topical administration for 10 days showed lower skin irritation compared to a marketed formulation (Vitanol®). The SLN formulation was as effective as a marketed gel on epidermal thickness and comedolytic efficiency in rhino mice and was associated with lower erythema and irritation on rabbit skin. [60]

Isotretinoid was encapsulated in SLN and NLC. Encapsulation increased dermal retention on mice skin and permitted higher antimicrobial efficiency on *P.acnes* .[98] However, *ex vivo* permeation was also increased and this could result in higher systemic side effects. Systemic delivery was evaluated on rats and there was no detection of isotretinoid in plasma (at 2, 4 and 6 hours) after topical administration of SLN, NLC and the marketed gel. The efficacy on a mice model of acne (induced by topical application of testosterone) was also evaluated. [99] The group treated with SLN has higher efficiency compared to a marketed gel (alcoholic based gel) on a mice model of acne (topical administration of testosterone) and lower skin inflammation after administration.

Adaptalene was encapsulated in NLC.[100] Encapsulation decreased skin permeation compared to a marketed gel and increased skin penetration *ex vivo* on rat skin .[101] On a rat model of acne (testosterone administration), Adaptalene-NLC produced similar therapeutic results as the marketed gel and co-encapsulation with vitamin C increased the therapeutic efficacy (reduction of papules density over 4 weeks).

Spirolactone, an anti-androgen drug with antiacne action on the follicular unit, was encapsulated in NLC. On rat skin, NLC encapsulation increased penetration and permeation compared to spironolactone in a dispersion.[102] In a clinical trial with 76 patients randomized in either spironolactone in NLC with a concentration of 1% or spironolactone in an alcoholic gel with a concentration of 5% [103], the 1% NLC gel was as effective as a 5% non-NLC gel at reducing total lesions count after 8 weeks of daily treatment.

Other groups have shown the encapsulation of antiacneic drugs such as Roxithromycin [104], Cyproterone Acetate [105] or Benzoyl peroxide [106]. However no evaluation of their therapeutic efficacy was performed.

#### 4.2. Skin Cancer

Skin cancer is the leading cancer etiology in the world in white populations .[107] Topical treatments used today for skin cancer therapy include topical fluorouracil (5-FU), imiquimod, topical diclofenac and photodynamic therapy. [108] Photodynamic therapy relies on the delivery of a drug which releases local oxygen local species when stimulated by light. [109] Most treatments are also indicated only in case of non melanoma skin cancers.

Doxorubicin, an antineoplastic drug, was encapsulated in SLN for topical administration on melanoma.[110] Balb/C mice were injected subcutaneously with B16F10 melanoma cells. SLN treated mice were able to suppress tumor growth over 40 days at a low and high concentration while free doxorubicin treatment resulted in a doubling in tumor size over 40 days. Free doxorubicin also exhibited skin irritation while SLN treatment did not.

Doxorubicin-SLN (Dox-SLN) topical administration was also performed by another research group using iontophoresis to increase skin penetration .[111] Passive diffusion of Dox-SLN increased skin penetration compared to a doxorubicin solution (4 fold) and was as effective as doxorubicin delivery by iontophoresis. The association of SLN encapsulation and iontophoresis

increased skin penetration by 50 fold. On mice implanted with squamous cell carcinoma, the association of SLN and iontophoresis inhibited tumor growth better than doxorubicin iontophoresis alone (30 minutes of treatment every 3 days during 12 days).

Dacarbazine is a cytotoxic agent used for melanoma treatment. Dacarbazine was encapsulated in a nanoemulsion. The efficacy was tested in an epidermoid carcinoma xenograph mouse model with implantation of CRL-1555 cells in nude mice NU/NU-nuBR.[112] When applied topically, dacarbazine encapsulated in NE inhibited tumor growth better than free dacarbazine when applied topically or administered using intramuscular injection.

Biofontera® developed the only nanoemulsion for topical application for skin delivery. They encapsulated the photodynamic precursor 5-aminolevulinic acid in an O/W nanoemulsion. The encapsulation enabled improved stability of 5-ALA and increased penetration in the epidermis .[113,114] It is marketed for the treatment of mild to moderate actinic keratosis. In a recent phase 3 clinical trial, it showed non inferiority compared to Metvix® (methyl levulinate) in the treatment of non-aggressive basal cell carcinoma.[115]

Other groups encapsulated anticancerous drugs such as doxorubicin [116,117], topotecan [118], docetaxel [119], 5-fluorouracyl [120] and photodynamic drugs [121–124]. However no evaluation of therapeutic efficacy was performed.

### 4.3. Wound delivery

Delivery of drug on chronic wounds is complicated due to the different states in which wound beds exist. Local delivery can be increased due to easy access to the cutaneous microcirculation and therefore the systemic circulation or decreased due to the presence of fibrin or exudates. Treatment strategies is mainly composed of local care including wound dressing and systemic treatment of the underlying etiology. However local delivery of antimicrobials as well as growth factors and the benefits of nanoencapsulation are currently evaluated.

The local delivery of the recombinant human Epithelial Growth Factor, rhEGF, encapsulated in SLN and NLC accelerated wound healing on a diabetic mice model [125]. Four topical applications of 10µg of rhEGF, in SLN and NLC increased wound healing compared to four intralesional administrations of 75µg of free growth factor. When applied on a pig wound model, application of 20µg rhEGF-NLC was as effective as the intralesional administration of

75µg of free product and provided additional safety with a limited systemic availability compared to free rhEGF and lower administration dose .[126] The rhEGF-NLC group showed faster epithelialization, lower inflammation and increased extracellular matrix deposition. The same research group also developed wound dressings (fibrin scaffolds or hydrogel) to deliver rhEGF-LNP.[57] In vitro, the wound dressing served as a reservoir for rhEGF-LNP over a 48 hour period.

Local delivery of human anti-microbial peptides, such as LL37, can enhance wound healing. [127–129] LL37 was loaded in NLC and applied in diabetic mice model of wound healing (two 8mm diameter wound on the back of db/db mice), [130] with application of 6µg of free peptide or 6µg or 2µg of NLC encapsulated LL37. The treatment was applied after the wounding and at day 4. Six µg of LL37 loaded NLC increased wound healing (40% wound closure) in a diabetic mouse model compared to 6µg of free peptide (20% wound closure), decreased the inflammation and improved reepithelization. Wound closure was similar in the 2µg NLC group compared to the 6µg free LL37 group meaning that encapsulation increased availability of the peptide.

Encapsulation of plants extracted drug has also been explored. The encapsulation of Astragaloside-IV, a phytochemical extracted from *Radix Astragali* with wound healing properties (increased angiogenesis and collagen synthesis [131]) was tested in SLN. *In vivo* efficacy was assessed on wound created on the bare back of rats administering the treatment every two days. [132] SLN encapsulation increased early wound healing at day 4 compared to free Astragaloside and vehicles formulations. Collagen deposition at the end of the study was better in the SLN treated group with increased type I collagen compared to free Astragaloside and vehicles formulations.

Other groups performed the encapsulation of growth factors [133] or proteins [134] but did not evaluate in vivo activity.

#### 4.4. Anti-infective

The skin is a main target for infection by bacteria, virus and fungi. Local infection is likely to be non-threatening and topical therapy is therefore the first treatment to be considered and lipid nanoparticles are evaluated for treatment improvement.

Azole antifungals can be used topically for the treatment of *Candida spp* infections. Encapsulation of fluconazole was performed in SLN and NLC.[135] The penetration of fluconazole was slower but showed better skin retention compared to free drug in vitro on hairless rat skin. When treating immunosuppressed rats infected with *Candida albicans*, fluconazole encapsulated in lipid nanoparticles successfully treated the infection at day 8. Interestingly at day 3, a transient decrease in *C.albicans* was observed with the free drug solution but not with the nanoparticles formulations. The higher penetration flux with the free drug and better skin retention with the nanoparticles formulations might explain the different pharmacodynamics effects. The nanoparticles treatment also resulted in no skin irritation on rabbits compared to the free drug solution.

Fluconazole encapsulation in SLN was also performed in order to treat Pityriasis versicolor (PV) due to the yeast *Malassezia furfur* in humans.[136] In a clinical trials with 30 patients with PV, Fluconazole in SLN was compared to a marketed 1% Clotrimazole cream. Treatment using fluconazole in SLN improved eradication of *Malassezia furfur* in skin after 4 weeks, where 9 out of 10 patients were *Malassezia furfur* negative compared to 3/10 patients in the Clotrimazole treated group.

Oxacillin is a betalactamine antibiotic for the treatment of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*. The encapsulation of oxacillin was evaluated in cationic NLC in order to enhance activity against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. [137] Cationic NLC were selected since cationic surfactants are able to disrupt the cells walls. *In vitro*, oxacillin encapsulated in cationic NLC reduced the minimal bactericide concentration by 4 fold compared to oxacillin alone. The combination of oxacillin and cationic NLC was synergistic. The bacterial activity was evaluated *in vivo* on the back of BalB/C mice. Oxacillin in cationic NLC reduced bacterial load by a 4 log factor however there was no difference between the cationic NLC alone and encapsulating oxacillin demonstrating that the effect was in strongly mediated by the disruption due to the cationic surfactant.

Fusidic acid, a bacteriostatic antibiotic, was encapsulated in neutral and cationic nanoemulsions.[138] *In vitro*, the encapsulation of fusidic acid decreased the minimal inhibitory concentration of MRSA, MSSA and *S.aureus* compared to free fusidic acid in ethanol and a marketed cream. In a murine model of burn wound seeded with MRSA, the application of the cationic nanoemulsion reduced the bacterial load compared to the marketed formulation.

Its application also increased wound healing by increasing wound contraction and reducing wound inflammation.

Terbinafine is an antifungal commonly used orally or topically for the treatment of skin or nail infection with *Candida ssp.* (Lamisil®, Fungster®). Encapsulation of terbinafine hydrochloride was performed in SLN.[139] In an *ex vivo* model using rat skin, the SLN formulation decreased permeation and increased retention in the skin compared to a marketed formulation (Daskil®). To access the *in vivo* efficacy, *Candida albicans* was applied on the hairless back of albino rat. SLN treatment was better than a marketed formulation (Daskil®) for the reduction of fungal load on the skin.

Other drugs tested include econazole [140–143], miconazole [144,145], clotrimazole [146–148], amphotericin B [149–151], podophylotoxin [152], penciclovir [153], griseofulvin [154], nystatin [155], and zinc phthalocyanine.[156] However no evaluation of *in vivo* efficacy was performed in those studies.

#### 4.5. Local anesthesia

TRP are Transient Receptor Potential channels and are associated with the pain response. siRNA targeting TRPV1 was encapsulated in the lipid matrix of SLN.[157] The encapsulation protected the genetic material. The antinociceptive effect was evaluated using thermal and capsaicin-induced pain on rats. The naked siRNA had no effect compared to the control while the topical administration of SLN encapsulated siRNA increased the pain tolerance (paw withdrawal time) to heat and capsaicin up to 18 and 24 hours respectively.

Capsaicin is a stimulator of the TRPV1 receptor. While stimulation of TRPv1 induces pain, the overstimulation of TRPv1 reduces pain by desensibilizing the small nerves fibers. Capsaicin was encapsulated in NLC.[61] On *ex vivo* penetration using mice skin, encapsulation increased the skin retention of capsaicin compared to a conventional cream. *In vivo*, in the tail flic model using LACA mice, the NLC formulation increased the analgesic effect in both time and magnitude. The NLC formulation exhibited no irritation compared to the highly irritated skin when treated using the conventional cream.

## 5. Conclusion and prospects.

Nanoencapsulation of drugs with lipid nanoparticles is an ongoing field for the development or enhancement of existing treatments.

When applied on the skin, lipid nanoparticles are able to enhance skin penetration of many drugs compared to standard formulations. For some drugs lipid nanoparticles also increase the pharmacodynamic effect and their clinical efficacy. In addition, lipid nanoparticles protect drugs from degradation, enhance their duration of action and decrease skin irritation. In the near future, lipid nanoparticles will enable the skin delivery of novel actives such as siRNA and proteins.

## References

- [1] Rauscher H, Rasmussen K, Sokull-Klüttgen B. Regulatory Aspects of Nanomaterials in the EU. *Chem Ing Tech* 2017;89:224–31. doi:10.1002/cite.201600076.
- [2] Food Drug Administration. Guidance for Industry: Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology 2014.
- [3] Ishida-Yamamoto A, Igawa S, Kishibe M, Honma M. Clinical and molecular implications of structural changes to desmosomes and corneodesmosomes. *J Dermatol* 2018;45:385–9. doi:10.1111/1346-8138.14202.
- [4] Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm* 2012;435:3–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.005.
- [5] Tansey EA, Johnson CD. Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Educ* 2015;39:139–48. doi:10.1152/advan.00126.2014.
- [6] Steinsträsser I, Merkle HP. Dermal metabolism of topically applied drugs: pathways and models reconsidered. *Pharm Acta Helv* 1995;70:3–24.
- [7] Bouwstra J, Pirot F, Falson F. Skin Hydration—A Key Determinant in Topical Absorption. In: Walters K, Roberts M, editors. *Dermatol. Cosmeceutic Cosmet. Dev.*, CRC Press; 2007, p. 115–28. doi:10.3109/9780849375903-8.
- [8] Lademann J, Knorr F, Richter H, Blume-Peytavi U, Vogt A, Antoniou C, et al. Hair Follicles - An Efficient Storage and Penetration Pathway for Topically Applied Substances. *Skin Pharmacol Physiol* 2008;21:150–5. doi:10.1159/000131079.
- [9] Hadgraft J. Skin deep. *Eur J Pharm Biopharm* 2004;58:291–9. doi:10.1016/j.ejpb.2004.03.002.
- [10] Stott PW, Williams AC, Barry BW. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J Controlled Release* 1998;50:297–308.
- [11] Bos JD, Meinardi MM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol* 2000;9:165–169.

- [12] Baroli B, Ennas MG, Loffredo F, Isola M, Pinna R, Arturo López-Quintela M. Penetration of Metallic Nanoparticles in Human Full-Thickness Skin. *J Invest Dermatol* 2007;127:1701–12. doi:10.1038/sj.jid.5700733.
- [13] Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Bouwstra JA. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 2004;123:902–10. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.23441.x.
- [14] Tinkle Sally S, Antonini James M, Rich Brenda A, Roberts Jenny R, Salmen Rebecca, DePree Karyn, et al. Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease. *Environ Health Perspect* 2003;111:1202–8. doi:10.1289/ehp.5999.
- [15] Hadgraft J, Valenta C. pH, pK a and dermal delivery. *Int J Pharm* 2000;200:243–247.
- [16] Lane ME, Santos P, Watkinson AC, Hadgraft J. Passive skin permeation enhancement. *Transdermal Top. Drug Deliv. Princ. Pract.*, John Wiley & Sons, New York; 2012, p. 23–42.
- [17] Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm* 2013;447:12–21. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.040.
- [18] Kalluri H, Banga AK. Transdermal Delivery of Proteins. *AAPS PharmSciTech* 2011;12:431–41. doi:10.1208/s12249-011-9601-6.
- [19] Ita K. Dermal/transdermal delivery of small interfering RNA and antisense oligonucleotides- advances and hurdles. *Biomed Pharmacother* 2017;87:311–20. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.118.
- [20] Morales JO, Fathe KR, Brunaugh A, Ferrati S, Li S, Montenegro-Nicolini M, et al. Challenges and Future Prospects for the Delivery of Biologics: Oral Mucosal, Pulmonary, and Transdermal Routes. *AAPS J* 2017;19:652–68. doi:10.1208/s12248-017-0054-z.
- [21] Grice JE, Prow TW, Kendall MAF, Roberts MS. Electrical and Physical Methods of Skin Penetration Enhancement. In: Benson HAE, Watkinson AC, editors. *Top. Transdermal Drug Deliv.*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012, p. 43–65. doi:10.1002/9781118140505.ch3.
- [22] Darlenski R, Fluhr JW. Influence of skin type, race, sex, and anatomic location on epidermal barrier function. *Clin Dermatol* 2012;30:269–73. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.013.
- [23] Oranges T, Dini V, Romanelli M. Skin Physiology of the Neonate and Infant: Clinical Implications. *Adv Wound Care* 2015;4:587–95. doi:10.1089/wound.2015.0642.
- [24] Age-related Percutaneous Penetration Part 1: Skin Factors n.d. <http://www.skintherapyletter.com/2012/17.5/1.html> (accessed November 6, 2017).
- [25] Age-related Percutaneous Penetration Part 2 n.d. <http://www.skintherapyletter.com/2012/17.6/2.html> (accessed November 6, 2017).

- [26] Benson HAE. Skin Structure, Function, and Permeation. In: Benson HAE, Watkinson AC, editors. *Top. Transdermal Drug Deliv.*, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012, p. 1–22. doi:10.1002/9781118140505.ch1.
- [27] Aalto-Korte K, Turpeinen M. Transepidermal water loss and absorption of hydrocortisone in widespread dermatitis. *Br J Dermatol* 1993;128:633–635.
- [28] AALTO-KORTE K, Turpeinen M. Pharmacokinetics of topical hydrocortisone at plasma level after applications once or twice daily in patients with widespread dermatitis. *Br J Dermatol* 1995;133:259–263.
- [29] Grey JE, Enoch S, Harding KG. Wound assessment. *Bmj* 2006;332:285–288.
- [30] Henkler F, Tralau T, Tentschert J, Kneuer C, Haase A, Platzek T, et al. Risk assessment of nanomaterials in cosmetics: a European union perspective. *Arch Toxicol* 2012;86:1641–6. doi:10.1007/s00204-012-0944-x.
- [31] Comune M, Rai A, Chereddy KK, Pinto S, Aday S, Ferreira AF, et al. Antimicrobial peptide-gold nanoscale therapeutic formulation with high skin regenerative potential. *J Controlled Release* 2017;262:58–71. doi:10.1016/j.jconrel.2017.07.007.
- [32] Bessar H, Venditti I, Benassi L, Vaschieri C, Azzoni P, Pellacani G, et al. Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;141:141–7. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.01.021.
- [33] Carazo E, Borrego-Sánchez A, García-Villén F, Sánchez-Espejo R, Cerezo P, Aguzzi C, et al. Advanced Inorganic Nanosystems for Skin Drug Delivery. *Chem Rec* 2018. doi:10.1002/tcr.201700061.
- [34] Labouta HI, Schneider M. Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2013;9:39–54. doi:10.1016/j.nano.2012.04.004.
- [35] De Matteis V. Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and In Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. *Toxics* 2017;5:29. doi:10.3390/toxics5040029.
- [36] Vogt A, Wischke C, Neffe AT, Ma N, Alexiev U, Lendlein A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? *J Controlled Release* 2016;242:3–15. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.027.
- [37] Escobar-Chavez J, Diaz-Torres R, Rodriguez-Cruz IM, Domínguez-Delgado, Sampere-Morales, Angeles-Anguiano, et al. Nanocarriers for transdermal drug delivery. *Res Rep Transdermal Drug Deliv* 2012;3. doi:10.2147/RRTD.S32621.
- [38] Romero E, Morilla M. Highly deformable and highly fluid vesicles as potential drug delivery systems: theoretical and practical considerations. *Int J Nanomedicine* 2013;3:171. doi:10.2147/IJN.S33048.
- [39] Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm Res* 2011;28:978–85. doi:10.1007/s11095-010-0309-1.

- [40] McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012;8:1719–29. doi:10.1039/C2SM06903B.
- [41] Nastiti C, Ponto T, Abd E, Grice J, Benson H, Roberts M. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. *Pharmaceutics* 2017;9:37. doi:10.3390/pharmaceutics9040037.
- [42] Singh Y, Meher JG, Raval K, Khan FA, Chaurasia M, Jain NK, et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J Controlled Release* 2017;252:28–49. doi:10.1016/j.jconrel.2017.03.008.
- [43] Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;47:165–196.
- [44] Müller et al. - 2002 - Nanostructured lipid matrices for improved microen.pdf n.d.
- [45] Jennings V, Thünemann AF, Gohla SH. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int J Pharm* 2000;199:167–77. doi:10.1016/S0378-5173(00)00378-1.
- [46] Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Composition and Structure. *Lipid Nanoparticles Prod. Charact. Stab.*, Cham: Springer International Publishing; 2015, p. 11–22. doi:10.1007/978-3-319-10711-0\_2.
- [47] Castro GA, Coelho ALLR, Oliveira CA, Mahecha GAB, Oréface RL, Ferreira LAM. Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and stability and to reduce skin irritation of retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *Int J Pharm* 2009;381:77–83. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.025.
- [48] Ferreira M, Barreiros L, Segundo MA, Torres T, Selores M, Costa Lima SA, et al. Topical co-delivery of methotrexate and etanercept using lipid nanoparticles: A targeted approach for psoriasis management. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017;159:23–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2017.07.080.
- [49] Li B, Ge Z-Q. Nanostructured Lipid Carriers Improve Skin Permeation and Chemical Stability of Idebenone. *AAPS PharmSciTech* 2012;13:276–83. doi:10.1208/s12249-011-9746-3.
- [50] Raza K, Singh B, Lohan S, Sharma G, Negi P, Yachha Y, et al. Nano-lipoidal carriers of tretinoin with enhanced percutaneous absorption, photostability, biocompatibility and anti-psoriatic activity. *Int J Pharm* 2013;456:65–72. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.019.
- [51] P. Shah P, R. Desai P, Channer D, Singh M. Enhanced skin permeation using polyarginine modified nanostructured lipid carriers. *J Controlled Release* 2012;161:735–45. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.011.
- [52] Andrade LM, Silva LAD, Krawczyk-Santos AP, Amorim IC de SM, Rocha PBR da, Lima EM, et al. Improved tacrolimus skin permeation by co-encapsulation with clobetasol in lipid nanoparticles: Study of drug effects in lipid matrix by electron paramagnetic resonance. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;119:142–9. doi:10.1016/j.ejpb.2017.06.014.

- [53] Arora R, Katiyar SS, Kushwah V, Jain S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carrier-based nanotherapeutics in treatment of psoriasis: a comparative study. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;14:165–77. doi:10.1080/17425247.2017.1264386.
- [54] Kurakula M, Ahmed OAA, Fahmy UA, Ahmed TA. Solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of avanafil: optimization, formulation, *in-vitro* and *ex-vivo* studies. *J Liposome Res* 2016;26:288–96. doi:10.3109/08982104.2015.1117490.
- [55] Noor NM, Sheikh K, Somavarapu S, Taylor KMG. Preparation and characterization of dutasteride-loaded nanostructured lipid carriers coated with stearic acid-chitosan oligomer for topical delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;117:372–84. doi:10.1016/j.ejpb.2017.04.012.
- [56] Sanad RA-B, Abdel-Bar HM. Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydr Polym* 2017;173:441–50. doi:10.1016/j.carbpol.2017.05.098.
- [57] Gainza G, Chu WS, Guy RH, Pedraz JL, Hernandez RM, Delgado-Charro B, et al. Development and in vitro evaluation of lipid nanoparticle-based dressings for topical treatment of chronic wounds. *Int J Pharm* 2015;490:404–11. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.05.075.
- [58] Wissing S, Lippacher A, Müller R. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). *J Cosmet Sci* 2001;52:313–24.
- [59] Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus, Part II – In vivo assessment, drug targeting, efficacy, and safety in treatment for atopic dermatitis. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;84:72–83. doi:10.1016/j.ejpb.2012.11.026.
- [60] Castro GA, Oliveira CA, Mahecha GAB, Ferreira LAM. Comedolytic effect and reduced skin irritation of a new formulation of all-trans retinoic acid-loaded solid lipid nanoparticles for topical treatment of acne. *Arch Dermatol Res* 2011;303:513–20. doi:10.1007/s00403-011-1130-3.
- [61] Raza K, Shareef MA, Singal P, Sharma G, Negi P, Katare OP. Lipid-based capsaicin-loaded nano-colloidal biocompatible topical carriers with enhanced analgesic potential and decreased dermal irritation. *J Liposome Res* 2014;24:290–6. doi:10.3109/08982104.2014.911314.
- [62] Charoenputtakun P, Pamornpathomkul B, Opanasopit P, Rojanarata T, Ngawhirunpat T. Terpene composited lipid nanoparticles for enhanced dermal delivery of all-trans-retinoic acids. *Biol Pharm Bull* 2014;37:1139–1148.
- [63] Zhou L, Zhou L, Chen Y, Zhang Z-H, Liu, Wu. Formulation, characterization, and evaluation of in vitro skin permeation and in vivo pharmacodynamics of surface-charged tripterine-loaded nanostructured lipid carriers. *Int J Nanomedicine* 2012:3023. doi:10.2147/IJN.S32476.
- [64] Patlolla RR, Desai PR, Belay K, Singh MS. Translocation of cell penetrating peptide engrafted nanoparticles across skin layers. *Biomaterials* 2010;31:5598–607. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.010.

- [65] Lademann J, Richter H, Meinke MC, Lange-Asschenfeldt B, Antoniou C, Mak WC, et al. Drug Delivery with Topically Applied Nanoparticles: Science Fiction or Reality? *Skin Pharmacol Physiol* 2013;26:227–33. doi:10.1159/000351940.
- [66] Lauterbach A, Müller-Goymann CC. Applications and limitations of lipid nanoparticles in dermal and transdermal drug delivery via the follicular route. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;97:152–63. doi:10.1016/j.ejpb.2015.06.020.
- [67] Griffiths CEM, van de Kerkhof P, Czarnecka-Operacz M. Psoriasis and Atopic Dermatitis. *Dermatol Ther* 2017;7:31–41. doi:10.1007/s13555-016-0167-9.
- [68] Greb JE, Goldminz AM, Elder JT, Lebwohl MG, Gladman DD, Wu JJ, et al. Psoriasis. *Nat Rev Dis Primer* 2016;2:16082. doi:10.1038/nrdp.2016.82.
- [69] Wollenberg A, Barbarot S, Bieber T, Christen-Zaech S, Deleuran M, Fink-Wagner A, et al. Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV* 2018;32:657–82. doi:10.1111/jdv.14891.
- [70] Takahashi H, Tsuji H, Minami-Hori M, Miyauchi Y, Iizuka H. Defective barrier function accompanied by structural changes of psoriatic stratum corneum. *J Dermatol* 2014;41:144–8. doi:10.1111/1346-8138.12393.
- [71] Chiang A, Tudela E, Maibach HI. Percutaneous absorption in diseased skin: an overview. *J Appl Toxicol* 2012;32:537–63. doi:10.1002/jat.1773.
- [72] Bodenlenz M, Dragatin C, Liebenberger L, Tschapeller B, Boulgaropoulos B, Augustin T, et al. Kinetics of Clobetasol-17-Propionate in Psoriatic Lesional and Non-Lesional Skin Assessed by Dermal Open Flow Microperfusion with Time and Space Resolution. *Pharm Res* 2016;33:2229–38. doi:10.1007/s11095-016-1960-y.
- [73] Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. *J Am Acad Dermatol* 2009;60:643–59. doi:10.1016/j.jaad.2008.12.032.
- [74] Nast A, Gisondi P, Ormerod AD, Saiag P, Smith C, Spuls PI, et al. European S3-Guidelines on the systemic treatment of psoriasis vulgaris - Update 2015 - Short version - EDF in cooperation with EADV and IPC. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29:2277–94. doi:10.1111/jdv.13354.
- [75] Jensen JD, Delcambre MR, Nguyen G, Sami N. Biologic Therapy with or Without Topical Treatment in Psoriasis: What Does the Current Evidence Say? *Am J Clin Dermatol* 2014;15:379–85. doi:10.1007/s40257-014-0089-1.
- [76] Sonawane R, Harde H, Katariya M, Agrawal S, Jain S. Solid lipid nanoparticles-loaded topical gel containing combination drugs: an approach to offset psoriasis. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11:1833–47. doi:10.1517/17425247.2014.938634.
- [77] Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79:82–94. doi:10.1016/j.ejpb.2011.02.016.

- [78] Avasatthi V, Pawar H, Dora CP, Bansod P, Gill MS, Suresh S. A novel nanogel formulation of methotrexate for topical treatment of psoriasis: optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Pharm Dev Technol* 2015;1–9. doi:10.3109/10837450.2015.1026605.
- [79] Desai PR, Shah PP, Patlolla RR, Singh M. Dermal Microdialysis Technique to Evaluate the Trafficking of Surface-Modified Lipid Nanoparticles upon Topical Application. *Pharm Res* 2012;29:2587–600. doi:10.1007/s11095-012-0789-2.
- [80] Desai PR, Shah PP, Hayden P, Singh M. Investigation of Follicular and Non-follicular Pathways for Polyarginine and Oleic Acid-Modified Nanoparticles. *Pharm Res* 2013;30:1037–49. doi:10.1007/s11095-012-0939-6.
- [81] Pradhan M, Singh D, Murthy SN, Singh MR. Design, characterization and skin permeating potential of Fluocinolone acetonide loaded nanostructured lipid carriers for topical treatment of psoriasis. *Steroids* 2015;101:56–63. doi:10.1016/j.steroids.2015.05.012.
- [82] Silva LAD, Andrade LM, de Sá FAP, Marreto RN, Lima EM, Gratieri T, et al. Clobetasol-loaded nanostructured lipid carriers for epidermal targeting. *J Pharm Pharmacol* 2016;68:742–50. doi:10.1111/jphp.12543.
- [83] Nam S-H, Ji XY, Park J-S. Investigation of Tacrolimus Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Topical Drug Delivery. *Bull Korean Chem Soc* 2011;32:956–60. doi:10.5012/bkcs.2011.32.3.956.
- [84] Santos Maia C, Mehnert W, Schaller M, Korting HC, Gysler A, Haberland A, et al. Drug Targeting by Solid Lipid Nanoparticles for Dermal Use. *J Drug Target* 2002;10:489–95. doi:10.1080/1061186021000038364.
- [85] Baspinar Y, Borchert H-H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions - Is there a benefit of the positive charge? *Int J Pharm* 2012;430:247–52. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.03.040.
- [86] Maia CS, Mehnert W, Schäfer-Korting M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. *Int J Pharm* 2000;196:165–167.
- [87] Lohan SB, Saeidpour S, Solik A, Schanzer S, Richter H, Dong P, et al. Investigation of the cutaneous penetration behavior of dexamethasone loaded to nano-sized lipid particles by EPR spectroscopy, and confocal Raman and laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;116:102–10. doi:10.1016/j.ejpb.2016.12.018.
- [88] Fang J-Y, Fang C-L, Liu C-H, Su Y-H. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:633–40. doi:10.1016/j.ejpb.2008.05.008.
- [89] Barradas TN, Senna JP, Cardoso SA, Nicoli S, Padula C, Santi P, et al. Hydrogel-thickened nanoemulsions based on essential oils for topical delivery of psoralen: Permeation and stability studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;116:38–50. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.018.
- [90] Lboutounne H, Guillaume YC, Michel L, Makki S, Humbert Ph, Millet J. Study and Development of Encapsulated Forms of 4, 5', 8-Trimethylpsoralen for Topical Drug Delivery. *Drug Dev Res* 2004;61:86–94. doi:10.1002/ddr.10339.

- [91] Jensen LB, Petersson K, Nielsen HM. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;79:68–75. doi:10.1016/j.ejpb.2011.05.012.
- [92] Pinto MF, Moura CC, Nunes C, Segundo MA, Costa Lima SA, Reis S. A new topical formulation for psoriasis: Development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers. *Int J Pharm* 2014;477:519–26. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.10.067.
- [93] Abdel-Salam FS, Mahmoud AA, Ammar HO, Elkheshen SA. Nanostructured lipid carriers as semisolid topical delivery formulations for diflucortolone valerate. *J Liposome Res* 2017;27:41–55. doi:10.3109/08982104.2016.1149866.
- [94] Abdel-Salam FS, Elkheshen SA, Mahmoud AA, Ammar HO. Diflucortolone valerate loaded solid lipid nanoparticles as a semisolid topical delivery system. *Bull Fac Pharm Cairo Univ* 2015;54:1–7.
- [95] Lin Y-K, Huang Z-R, Zhuo R-Z, Fang J-Y. Combination of calcipotriol and methotrexate in nanostructured lipid carriers for topical delivery. *Int J Nanomedicine* 2010;5:117.
- [96] Tuchayi SM, Makrantonaki E, Ganceviciene R, Dessinioti C, Feldman SR, Zouboulis CC. Acne vulgaris. *Nat Rev Dis Primer* 2015:15029. doi:10.1038/nrdp.2015.29.
- [97] Nast A, Dréno B, Bettoli V, Bukvic Mokos Z, Degitz K, Dressler C, et al. European evidence-based (S3) guideline for the treatment of acne - update 2016 - short version. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2016;30:1261–8. doi:10.1111/jdv.13776.
- [98] Raza K, Singh B, Singla S, Wadhwa S, Garg B, Chhibber S, et al. Nanocolloidal Carriers of Isotretinoin: Antimicrobial Activity against *Propionibacterium acnes* and Dermatokinetic Modeling. *Mol Pharm* 2013;10:1958–63. doi:10.1021/mp300722f.
- [99] Raza K, Singh B, Singal P, Wadhwa S, Katare OP. Systematically optimized biocompatible isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs) for topical treatment of acne. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2013;105:67–74. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.12.043.
- [100] Jain AK, Jain A, Garg NK, Agarwal A, Jain A, Jain SA, et al. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;121:222–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.05.041.
- [101] Jain A, Garg NK, Jain A, Kesharwani P, Jain AK, Nirbhavane P, et al. A synergistic approach of adapalene-loaded nanostructured lipid carriers, and vitamin C co-administration for treating acne. *Drug Dev Ind Pharm* 2016;42:897–905. doi:10.3109/03639045.2015.1104343.
- [102] Kelidari HR, Saeedi M, Akbari J, Morteza-Semnani K, Gill P, Valizadeh H, et al. Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;128:473–9. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.02.046.
- [103] Kelidari HR, Saeedi M, Hajheydari Z, Akbari J, Morteza-Semnani K, Akhtari J, et al. Spironolactone loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of mild and

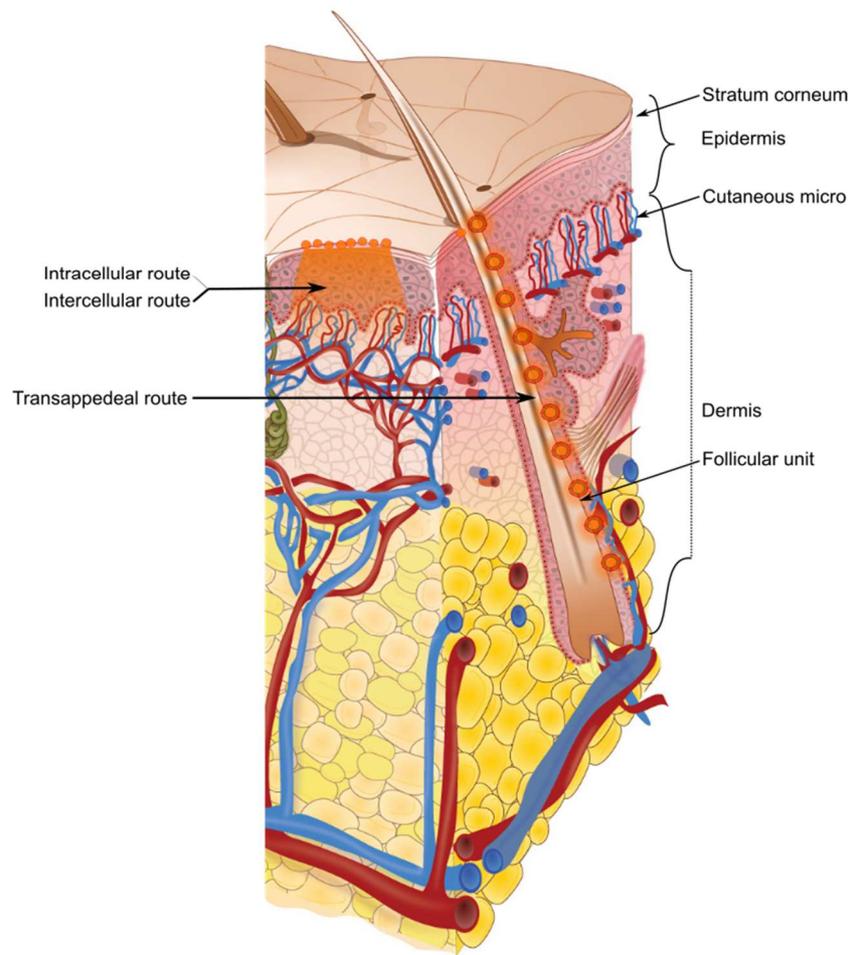
- moderate acne vulgaris: A randomized, double-blind, prospective trial. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;146:47–53. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.05.042.
- [104] Wosicka-Fraćkowiak H, Cal K, Stefanowska J, Głowska E, Nowacka M, Struck-Lewicka W, et al. Roxithromycin-loaded lipid nanoparticles for follicular targeting. *Int J Pharm* 2015;495:807–15. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.09.068.
- [105] Štecová J, Mehnert W, Blaschke T, Kleuser B, Sivaramakrishnan R, Zouboulis CC, et al. Cyproterone Acetate Loading to Lipid Nanoparticles for Topical Acne Treatment: Particle Characterisation and Skin Uptake. *Pharm Res* 2007;24:991–1000. doi:10.1007/s11095-006-9225-9.
- [106] Pokharkar VB, Mendiratta C, Kyadarkunte AY, Bhosale SH, Barhate GA. Skin delivery aspects of benzoyl peroxide-loaded solid lipid nanoparticles for acne treatment. *Ther Deliv* 2014;5:635–52. doi:10.4155/tde.14.31.
- [107] Leiter U, Eigentler T, Garbe C. Epidemiology of skin cancer. *Adv Exp Med Biol* 2014;810:120–40.
- [108] Micali G, Lacarrubba F, Dinotta F, Massimino D, Nasca MR. Treating skin cancer with topical cream. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:1515–27. doi:10.1517/14656566.2010.481284.
- [109] Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24. doi:10.5946/ce.2013.46.1.24.
- [110] Tupal A, Sabzichi M, Ramezani F, Kouhsoltani M, Hamishehkar H. Dermal delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of skin cancer. *J Microencapsul* 2016;33:372–80. doi:10.1080/02652048.2016.1200150.
- [111] Huber LA, Pereira TA, Ramos DN, Rezende LCD, Emery FS, Sobral LM, et al. Topical Skin Cancer Therapy Using Doxorubicin-Loaded Cationic Lipid Nanoparticles and Iontophoresis. *J Biomed Nanotechnol* 2015;11:1975–88. doi:10.1166/jbn.2015.2139.
- [112] Kakumanu S, Tagne JB, Wilson TA, Nicolosi RJ. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2011;7:277–83. doi:10.1016/j.nano.2010.12.002.
- [113] Maisch T, Santarelli F, Schreml S, Babilas P, Szeimies R-M. Fluorescence induction of protoporphyrin IX by a new 5-aminolevulinic acid nanoemulsion used for photodynamic therapy in a full-thickness ex vivo skin model. *Exp Dermatol* 2010;19:e302-305. doi:10.1111/j.1600-0625.2009.01001.x.
- [114] Schmitz L, Novak B, Hoeh A-K, Luebbert H, Dirschka T. Epidermal penetration and protoporphyrin IX formation of two different 5-aminolevulinic acid formulations in ex vivo human skin. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2016;14:40–6. doi:10.1016/j.pdpdt.2015.11.004.
- [115] Morton CA, Dominicus R, Radny P, Dirschka T, Hauschild A, Reinhold U, et al. A randomized, multi-national, non-inferiority, phase III trial to evaluate the safety and efficacy

- of BF-200 ALA gel versus MAL cream in the treatment of non-aggressive basal cell carcinoma with photodynamic therapy (PDT). *Br J Dermatol* 2018. doi:10.1111/bjd.16441.
- [116] Taveira SF, De Campos Araújo LMP, De Santana DCAS, Nomizo A, De Freitas LAP, Lopez RFV. Development of cationic solid lipid nanoparticles with factorial design-based studies for topical administration of doxorubicin. *J Biomed Nanotechnol* 2012;8:219–28. doi:10.1166/jbn.2012.1383.
- [117] Taveira SF, De Santana DCAS, Araújo LMPC, Marquele-Oliveira F, Nomizo A, Lopez RFV. Effect of iontophoresis on topical delivery of doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 2014;10:1382–90. doi:10.1166/jbn.2014.1834.
- [118] Venâncio JH, Andrade LM, Esteves NLS, Brito LB, Valadares MC, Oliveira GAR, et al. Topotecan-loaded lipid nanoparticles as a viable tool for the topical treatment of skin cancers. *J Pharm Pharmacol* 2017;69:1318–26. doi:10.1111/jphp.12772.
- [119] Fan X, Chen J, Shen Q. Docetaxel–nicotinamide complex-loaded nanostructured lipid carriers for transdermal delivery. *Int J Pharm* 2013;458:296–304. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.10.036.
- [120] Shakeel F, Haq N, Al-Dhfyhan A, Alanazi FK, Alsarra IA. Chemoprevention of skin cancer using low HLB surfactant nanoemulsion of 5-fluorouracil: A preliminary study. *Drug Deliv* 2015;22:573–80. doi:10.3109/10717544.2013.868557.
- [121] Ricci-Junior E, de Oliveira de Siqueira LB, Rodrigues RAS, Sancenón F, Martínez-Mañez R, de Moraes JA, et al. Nanocarriers as Phototherapeutic Drug Delivery System: Appraisal of Three Different Nanosystems in an In vivo and In vitro Exploratory Study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017. doi:10.1016/j.pdpdt.2017.11.003.
- [122] Qidwai A, Khan S, Md S, Fazil M, Baboota S, Narang JK, et al. Nanostructured lipid carrier in photodynamic therapy for the treatment of basal-cell carcinoma. *Drug Deliv* 2016;23:1476–85. doi:10.3109/10717544.2016.1165310.
- [123] Primo FL, Bentley MVLB, Tedesco AC. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan®/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment. *J Nanosci Nanotechnol* 2008;8:340–7. doi:10.1166/jnn.2008.004.
- [124] Primo FL, Rodrigues MMA, Simioni AR, Bentley MVLB, Morais PC, Tedesco AC. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *J Magn Magn Mater* 2008;320:e211–4. doi:10.1016/j.jmmm.2008.02.050.
- [125] Gainza G, Pastor M, Aguirre JJ, Villullas S, Pedraz JL, Hernandez RM, et al. A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *J Controlled Release* 2014;185:51–61. doi:10.1016/j.jconrel.2014.04.032.
- [126] Gainza G, Bonafonte DC, Moreno B, Aguirre JJ, Gutierrez FB, Villullas S, et al. The topical administration of rhEGF-loaded nanostructured lipid carriers (rhEGF-NLC) improves healing in a porcine full-thickness excisional wound model. *J Controlled Release* 2015;197:41–7. doi:10.1016/j.jconrel.2014.10.033.

- [127] Ramos R, Silva JP, Rodrigues AC, Costa R, Guardão L, Schmitt F, et al. Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides* 2011;32:1469–76. doi:10.1016/j.peptides.2011.06.005.
- [128] Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* 2012;280:22–35. doi:10.1016/j.cellimm.2012.11.009.
- [129] Grönberg A, Mahlapuu M, Ståhle M, Whately-Smith C, Rollman O. Treatment with LL-37 is safe and effective in enhancing healing of hard-to-heal venous leg ulcers: a randomized, placebo-controlled clinical trial: LL-37 in treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2014;22:613–21. doi:10.1111/wrr.12211.
- [130] Garcia-Orue I, Gainza G, Girbau C, Alonso R, Aguirre JJ, Pedraz JL, et al. LL37 loaded nanostructured lipid carriers (NLC): A new strategy for the topical treatment of chronic wounds. *Eur J Pharm Biopharm* 2016;108:310–6. doi:10.1016/j.ejpb.2016.04.006.
- [131] Chen X, Peng L-H, Li N, Li Q-M, Li P, Fung K-P, et al. The healing and anti-scar effects of astragaloside IV on the wound repair in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol* 2012;139:721–7. doi:10.1016/j.jep.2011.11.035.
- [132] Chen X, Peng L-H, Shan Y-H, Li N, Wei W, Yu L, et al. Astragaloside IV-loaded nanoparticle-enriched hydrogel induces wound healing and anti-scar activity through topical delivery. *Int J Pharm* 2013;447:171–81. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.054.
- [133] Choi SW, PANGENI R, Park JW. Nanoemulsion-Based Hydrogel for Topical Delivery of Highly Skin-Permeable Growth Factor Combinations: Preparation and *In Vitro* Evaluation. *J Nanosci Nanotechnol* 2017;17:2363–9. doi:10.1166/jnn.2017.13318.
- [134] Fumakia M, Ho EA. Nanoparticles Encapsulated with LL37 and Serpin A1 Promotes Wound Healing and Synergistically Enhances Antibacterial Activity. *Mol Pharm* 2016;13:2318–31. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00099.
- [135] Gupta M, Vyas SP. Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. *Chem Phys Lipids* 2012;165:454–61. doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.01.006.
- [136] El-Housiny S, Shams Eldeen MA, El-Attar YA, Salem HA, Attia D, Bendas ER, et al. Fluconazole-loaded solid lipid nanoparticles topical gel for treatment of pityriasis versicolor: formulation and clinical study. *Drug Deliv* 2018;25:78–90. doi:10.1080/10717544.2017.1413444.
- [137] Alalaiwe A, Wang P-W, Lu P-L, Chen Y-P, Fang J-Y, Yang S-C. Synergistic Anti-MRSA Activity of Cationic Nanostructured Lipid Carriers in Combination With Oxacillin for Cutaneous Application. *Front Microbiol* 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.01493.
- [138] Thakur K, Sharma G, Singh B, Jain A, Tyagi R, Chhibber S, et al. Cationic-bilayered nanoemulsion of fusidic acid: an investigation on eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 33591 infection in burn wound. *Nanomed* 2018;13:825–47. doi:10.2217/nmm-2017-0227.

- [139] Vaghasiya H, Kumar A, Sawant K. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Eur J Pharm Sci* 2013;49:311–22. doi:10.1016/j.ejps.2013.03.013.
- [140] Keshri L, Pathak K. Development of thermodynamically stable nanostructured lipid carrier system using central composite design for zero order permeation of Econazole nitrate through epidermis. *Pharm Dev Technol* 2013;18:634–44. doi:10.3109/10837450.2012.659256.
- [141] Sanna V, Caria G, Mariani A. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate. *Powder Technol* 2010;201:32–6. doi:10.1016/j.powtec.2010.02.035.
- [142] Gavini E, Albertini B, Rassu G, Di Sabatino M, Sanna V, Giunchedi P, et al. Evaluation of solid lipid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:559–67. doi:10.1211/jpp/61.05.0003.
- [143] Sanna V, Gavini E, Cossu M, Rassu G, Giunchedi P. Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies. *J Pharm Pharmacol* 2007;59:1057–64. doi:10.1211/jpp.59.8.0002.
- [144] Bhalekar MR, Pokharkar V, Madgulkar A, Patil N, Patil N. Preparation and Evaluation of Miconazole Nitrate-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Delivery. *AAPS PharmSciTech* 2009;10:289–96. doi:10.1208/s12249-009-9199-0.
- [145] Singh S, Singh M, Tripathi CB, Arya M, Saraf SA. Development and evaluation of ultra-small nanostructured lipid carriers: novel topical delivery system for athlete's foot. *Drug Deliv Transl Res* 2016;6:38–47. doi:10.1007/s13346-015-0263-x.
- [146] Das S, Ng WK, Tan RBH. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur J Pharm Sci* 2012;47:139–51. doi:10.1016/j.ejps.2012.05.010.
- [147] Ravani L, Esposito E, Bories C, Moal VL-L, Loiseau PM, Djabourov M, et al. Clotrimazole-loaded nanostructured lipid carrier hydrogels: Thermal analysis and in vitro studies. *Int J Pharm* 2013;454:695–702. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.06.015.
- [148] Souto EB, Wissing SA, Barbosa CM, Müller RH. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int J Pharm* 2004;278:71–7. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.02.032.
- [149] Butani D, Yewale C, Misra A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;139:17–24. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.07.032.
- [150] Santos CM, De Oliveira RB, Arantes VT, Caldeira LR, De Oliveira MC, Egito EST, et al. Amphotericin B-loaded nanocarriers for topical treatment of cutaneous leishmaniasis: Development, characterization, and in vitro skin permeation studies. *J Biomed Nanotechnol* 2012;8:322–9. doi:10.1166/jbn.2012.1385.

- [151] Hussain A, Samad A, Singh SK, Ahsan MN, Haque MW, Faruk A, et al. Nanoemulsion gel-based topical delivery of an antifungal drug: in vitro activity and in vivo evaluation. *Drug Deliv* 2016;23:642–57. doi:10.3109/10717544.2014.933284.
- [152] Chen H, Chang X, Du D, Liu W, Liu J, Weng T, et al. Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting. *J Controlled Release* 2006;110:296–306. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.052.
- [153] Lv Q, Yu A, Xi Y, Li H, Song Z, Cui J, et al. Development and evaluation of penciclovir-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery. *Int J Pharm* 2009;372:191–8. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.01.014.
- [154] Tan YJ, Lee CS, Er HM, Lim WH, Wong SF. In-vitro evaluation of griseofulvin loaded lipid nanoparticles for topical delivery. *J Drug Deliv Sci Technol* 2016;31:1–10. doi:10.1016/j.jddst.2015.11.002.
- [155] Fernández-Campos F, Clares Naveros B, López Serrano O, Alonso Merino C, Calpena Campmany AC. Evaluation of novel nystatin nanoemulsion for skin candidosis infections. *Mycoses* 2013;56:70–81. doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02202.x.
- [156] de Oliveira de Siqueira LB, da Silva Cardoso V, Rodrigues IA, Vazquez-Villa AL, dos Santos EP, da Costa Leal Ribeiro Guimarães B, et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. *Nanotechnology* 2017;28:065101. doi:10.1088/1361-6528/28/6/065101.
- [157] Sharma G, Chopra K, Puri S, Bishnoi M, Rishi P, Kaur IP. Topical delivery of TRP*si*RNA-loaded solid lipid nanoparticles confer reduced pain sensation via TRPV1 silencing, in rats. *J Drug Target* 2017:1–15. doi:10.1080/1061186X.2017.1350857.



*Figure 1 : Skin structure and the main pathway of skin penetration using nanoparticles. The intercellular route is the main pathway for drug penetration however the transappendeal route is now considered to be of huge importance especially in the case of nanoparticle administration.*

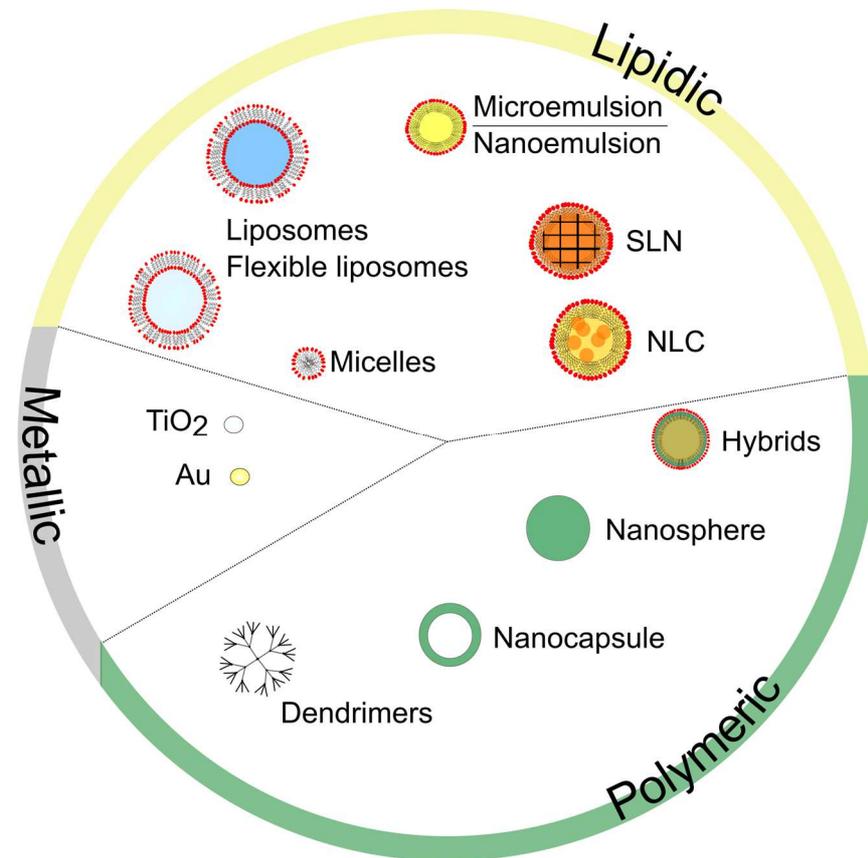


Figure 2 : Schematic representation of the three main classes of nanoparticles used for skin delivery of actives. This classification is only a simplification and not representative of the huge body of work concerning nanoparticles. For example, we did not include classical modification applied to nanoparticles such as PEGylation.

#### 4. Les nanoparticules lipidiques évaluées dans le cadre de ce travail : Les Lipidots

Nous avons montré dans la revue que les nanoparticules lipidiques sont d'excellents vecteurs de médicaments par leur stabilité, biocompatibilité, et capacité de relargage contrôlé. Dans ce travail de thèse, nous évaluerons des nanoparticules lipidiques appelées : Lipidots. Les Lipidots sont des nanoparticules lipidiques de type « nanostructured lipid carriers » (NLC). Les lipidots ont été développés dans le cadre de l'imagerie in vivo pour la délivrance de fluorophores au niveau tumoral.<sup>245</sup> Elles ont fait l'objet de plusieurs travaux de recherche tant au niveau caractérisations qu'au niveau in vivo avec l'évaluation de leur potentiel de délivrance de fluorophores, d'antibiotiques et d'antigènes pour la formulation vaccinale.<sup>246,247</sup> Leur composition générale est résumée dans la Figure 5-1.

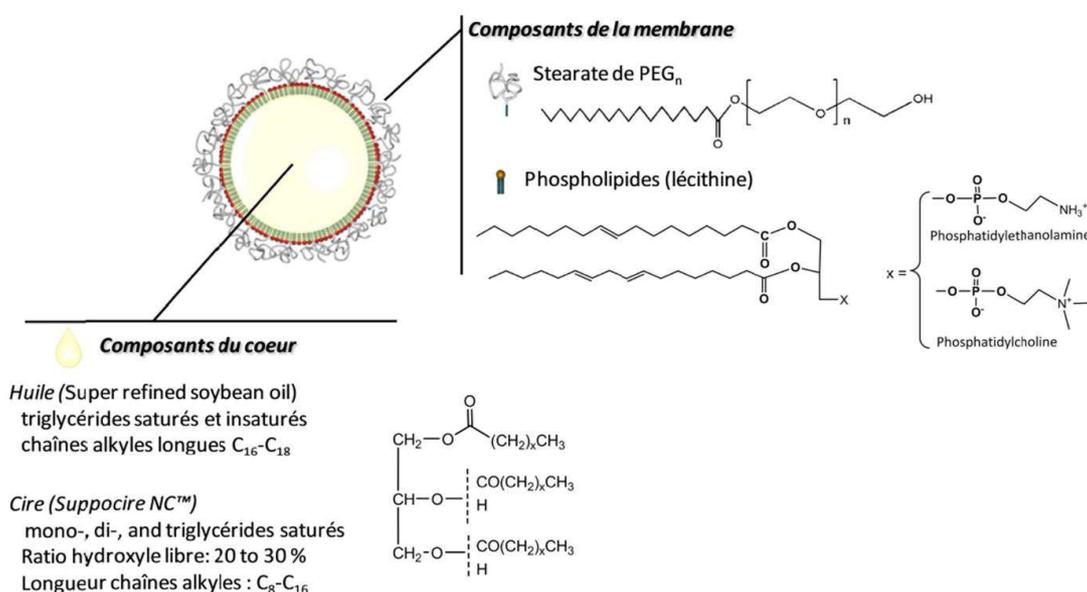


Figure 5-1 : Composition des Lipidots

Les principaux travaux utilisant les lipidots ont été réalisés en cancérologie. En effet, les nanoparticules administrées par voie systémique peuvent se concentrer dans les tissus tumoraux par rétention passive due à la forte vascularisation des tissus cancéreux (effet EPR) même si l'importance clinique de cet effet semble limitée.<sup>248</sup> Les Lipidots n'ont pas été évaluées pour l'administration dermique. Cependant, elles présentent des caractéristiques intéressantes : elles sont extrêmement stables<sup>249,250</sup>, présentent une excellente biocompatibilité in vitro et in vivo pour l'utilisation chez l'homme (statuts GRAS).<sup>251,252</sup>

## E. Définition des Objectifs de la thèse.

L'objectif général est de mettre au point une nouvelle approche pharmacologique par voie locale de vasodilatateurs nanoencapsulés dans l'objectif d'améliorer la cicatrisation des ulcérations diabétiques. De nombreuses étapes vont être nécessaires, et celles réalisées dans le cadre de la thèse sont détaillées ci-dessous.

1. **Screening des principes actifs** : Réaliser des tests de screening de différents vasodilatateurs nanoencapsulés dans les lipidots. Nous avons sélectionné plusieurs principes actifs pour réaliser cette phase de screening et les avons évalués en termes de capacité de nanoencapsulation et de stabilité au long cours. Dans cette étape, nous avons testé la capacité d'encapsulation au sein de différent type de Lipidots en termes de taille et de type neutre ou cationique.
2. **Réalisation et caractérisation des formulations de gel Lipidots** : Dans le cadre de cette thèse, nous avons choisi une administration de Lipidots sous forme de gel afin de pouvoir contrôler facilement la quantité de principes actifs appliqués par rapport à des pansements. Dans cette étape, nous avons choisi un gel et testé la capacité de formulation de gels stables de lipidots.
3. **Évaluation préclinique des gels de principes actifs nanoencapsulés sélectionnés sur des modèles murins** en termes de pharmacodynamie et pharmacocinétique. Nous évaluerons ces deux paramètres sur souris saines (C57Bl/6) ainsi que sur un modèle de cicatrisation diabétique, la souris db/db, ayant une délétion génétique sur le récepteur de la leptine et présentant un retard de cicatrisation.

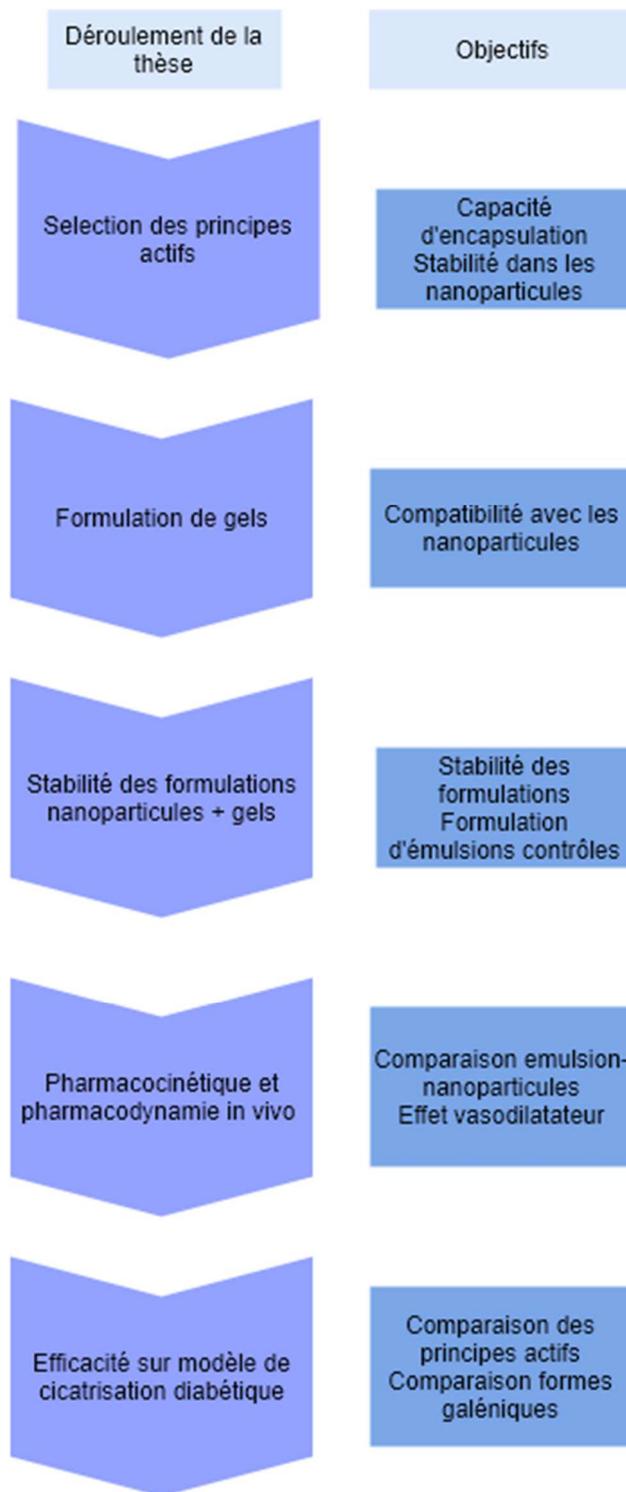


Figure 5-2 : Objectifs de la thèse

## F. Références

1. Larousse, É. Encyclopédie Larousse en ligne - Structure de la peau. [http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Structure\\_de\\_la\\_peau/1001996](http://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Structure_de_la_peau/1001996).
2. *Rook's textbook of dermatology*. (John Wiley & Sons Inc, 2016).
3. Menon, G. K., Cleary, G. W. & Lane, M. E. The structure and function of the stratum corneum. *Int. J. Pharm.* **435**, 3–9 (2012).
4. Collin, M., McGovern, N. & Haniffa, M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* **140**, 22–30 (2013).
5. Herman, A. & Herman, A. P. Antimicrobial peptides activity in the skin. *Skin Res. Technol.* **25**, 111–117 (2019).
6. Brenner, M. & Hearing, V. J. What are melanocytes really doing all day long...?: from the ViewPoint of a keratinocyte: Melanocytes – cells with a secret identity and incomparable abilities. *Exp. Dermatol.* **18**, 799–819 (2009).
7. Abraira, V. E. & Ginty, D. D. The Sensory Neurons of Touch. *Neuron* **79**, 618–639 (2013).
8. Krieg, T. & Aumailley, M. The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions: Extracellular matrix of the dermis. *Exp. Dermatol.* **20**, 689–695 (2011).
9. Tansey, E. A. & Johnson, C. D. Recent advances in thermoregulation. *Adv. Physiol. Educ.* **39**, 139–148 (2015).
10. Braverman, I. M. The Cutaneous Microcirculation. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **5**, 3–9 (2000).
11. Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation. *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 373–384 (2013).
12. Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S. W., Bunnett, N. W. & Steinhoff, M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiol. Rev.* **86**, 1309–1379 (2006).
13. Talavera, K., Nilius, B. & Voets, T. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends Neurosci.* **31**, 287–295 (2008).
14. Dhaka, A., Viswanath, V. & Patapoutian, A. TRP Ion Channels And Temperature Sensation. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 135–161 (2006).
15. Fromy, B. *et al.* Disruption of TRPV3 Impairs Heat-Evoked Vasodilation and Thermoregulation: A Critical Role of CGRP. *J. Invest. Dermatol.* **138**, 688–696 (2018).
16. Abdo, H. *et al.* Specialized cutaneous Schwann cells initiate pain sensation. *Science* **365**, 695–699 (2019).
17. Epstein, F. H., Singer, A. J. & Clark, R. A. F. Cutaneous Wound Healing. *N. Engl. J. Med.* **341**, 738–746 (1999).

18. Guo, S. & DiPietro, L. A. Factors Affecting Wound Healing. *J. Dent. Res.* **89**, 219–229 (2010).
19. Gale, A. J. Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol. Pathol.* **39**, 273–280 (2011).
20. Loscalzo, J. The macrophage and fibrinolysis. *Semin. Thromb. Hemost.* **22**, 503–506 (1996).
21. Li, W.-Y., Chong, S. S. N., Huang, E. Y. & Tuan, T.-L. Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing? *Wound Repair Regen.* **11**, 239–247 (2003).
22. Herkenne, S. *et al.* The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. *Sci. Signal.* **8**, ra117–ra117 (2015).
23. Alexander, R. A. *et al.* VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution. *Cardiovasc. Res.* **94**, 125–135 (2012).
24. Xu, X. R. *et al.* Platelets are versatile cells: New discoveries in hemostasis, thrombosis, immune responses, tumor metastasis and beyond. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **53**, 409–430 (2016).
25. Opneja, A., Kapoor, S. & Stavrou, E. X. Contribution of platelets, the coagulation and fibrinolytic systems to cutaneous wound healing. *Thromb. Res.* **179**, 56–63 (2019).
26. Sinno, H. & Prakash, S. Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. *Plast. Surg. Int.* **2013**, 1–7 (2013).
27. Winterbourn, C. C. & Kettle, A. J. Redox Reactions and Microbial Killing in the Neutrophil Phagosome. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 642–660 (2012).
28. Zawrotniak, M. & Rapala-Kozik, M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim. Pol.* **60**, (2013).
29. Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E. & Taylor, P. R. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* **14**, 986–995 (2013).
30. Langer, H. F. & Chavakis, T. Leukocyte – endothelial interactions in inflammation. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 1211–1220 (2009).
31. *Macrophages*. vol. 62 (Springer International Publishing, 2017).
32. Lucas, T. *et al.* Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J. Immunol.* **184**, 3964–3977 (2010).
33. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
34. Ferrante, C. J. & Leibovich, S. J. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv. Wound Care* **1**, 10–16 (2012).
35. Voll, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350–351 (1997).

36. Kapellos, T. S. & Iqbal, A. J. Epigenetic Control of Macrophage Polarisation and Soluble Mediator Gene Expression during Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2016**, (2016).
37. Willenborg, S. *et al.* CCR2 recruits an inflammatory macrophage subpopulation critical for angiogenesis in tissue repair. *Blood* **120**, 613–625 (2012).
38. Boniakowski, A. E., Kimball, A. S., Jacobs, B. N., Kunkel, S. L. & Gallagher, K. A. Macrophage-Mediated Inflammation in Normal and Diabetic Wound Healing. *J. Immunol.* **199**, 17–24 (2017).
39. Opdenakker, G., Van Damme, J. & Vranckx, J. J. Immunomodulation as Rescue for Chronic Atonic Skin Wounds. *Trends Immunol.* **39**, 341–354 (2018).
40. Martin, P. & Leibovich, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol.* **15**, 599–607 (2005).
41. Martin, P. *et al.* Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr. Biol. CB* **13**, 1122–1128 (2003).
42. Hopkinson-Woolley, J., Hughes, D., Gordon, S. & Martin, P. Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse. *J. Cell Sci.* **107 (Pt 5)**, 1159–1167 (1994).
43. Cowin, A. J., Brosnan, M. P., Holmes, T. M. & Ferguson, M. W. J. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Dev. Dyn.* **212**, 385–393 (1998).
44. Ferguson, M. W. J. & O’Kane, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **359**, 839–850 (2004).
45. Fathke, C. *et al.* Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. *Stem Cells Dayt. Ohio* **22**, 812–822 (2004).
46. Sasaki, M. *et al.* Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 2581–2587 (2008).
47. Driskell, R. R. *et al.* Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* **504**, 277–281 (2013).
48. Martin, P. & Nunan, R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br. J. Dermatol.* **173**, 370–378 (2015).
49. Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 103–111 (1993).
50. Werner, S. & Smola, H. Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends Cell Biol.* **11**, 143–146 (2001).

51. Raja, null, Sivamani, K., Garcia, M. S. & Isseroff, R. R. Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **12**, 2849–2868 (2007).
52. Pastar, I. *et al.* Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv. Wound Care* **3**, 445–464 (2014).
53. Walsh, T. G., Metharom, P. & Berndt, M. C. The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis. *Platelets* **26**, 199–211 (2015).
54. Wong, V. W. & Crawford, J. D. Vasculogenic Cytokines in Wound Healing. *BioMed Res. Int.* **2013**, (2013).
55. Pugh, C. W. & Ratcliffe, P. J. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat. Med.* **9**, 677–684 (2003).
56. Eilken, H. M. & Adams, R. H. Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 617–625 (2010).
57. Okonkwo, U. & DiPietro, L. Diabetes and Wound Angiogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1419 (2017).
58. Invernici, G. *et al.* Human Fetal Aorta Contains Vascular Progenitor Cells Capable of Inducing Vasculogenesis, Angiogenesis, and Myogenesis in Vitro and in a Murine Model of Peripheral Ischemia. *Am. J. Pathol.* **170**, 1879–1892 (2007).
59. Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T. & Herman, I. M. Wound Healing Angiogenesis: Innovations and Challenges in Acute and Chronic Wound Healing. *Adv. Wound Care* **1**, 17–22 (2012).
60. Greaves, N. S., Ashcroft, K. J., Baguneid, M. & Bayat, A. Current understanding of molecular and cellular mechanisms in fibroplasia and angiogenesis during acute wound healing. *J. Dermatol. Sci.* **72**, 206–217 (2013).
61. Wietecha, M. S., Cerny, W. L. & DiPietro, L. A. Mechanisms of Vessel Regression: Toward an Understanding of the Resolution of Angiogenesis. in *New Perspectives in Regeneration* (eds. Heber-Katz, E. & Stocum, D. L.) 3–32 (Springer Berlin Heidelberg, 2013). doi:10.1007/82\_2012\_287.
62. Korn, C. & Augustin, H. G. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev. Cell* **34**, 5–17 (2015).
63. Vedrenne, N., Coulomb, B., Danigo, A., Bonté, F. & Desmoulière, A. The complex dialogue between (myo)fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathol. Biol.* **60**, 20–27 (2012).
64. Xue, M. & Jackson, C. J. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv. Wound Care* **4**, 119–136 (2015).
65. Desmoulière, A., Redard, M., Darby, I. & Gabbiani, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am. J. Pathol.* **146**, 56–66 (1995).

66. Hinz, B. *et al.* Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am. J. Pathol.* **180**, 1340–1355 (2012).
67. Hinz, B. The role of myofibroblasts in wound healing. *Curr. Res. Transl. Med.* **64**, 171–177 (2016).
68. Enoch, S. & Leaper, D. J. Basic science of wound healing. *Surg. Oxf.* **23**, 37–42 (2005).
69. Eming, S. A., Martin, P. & Tomic-Canic, M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci. Transl. Med.* **6**, 265sr6-265sr6 (2014).
70. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* **38**, S8–S16 (2015).
71. Stratégies médicamenteuse du contrôle glycémique du diabète de type 2. (2013).
72. Katsarou, A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primer* **3**, 17016 (2017).
73. DeFronzo, R. A. *et al.* Type 2 diabetes mellitus. *Nat. Rev. Dis. Primer* 15019 (2015) doi:10.1038/nrdp.2015.19.
74. DIAGRAM Consortium. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* **44**, 981–990 (2012).
75. Guilherme, A., Virbasius, J. V., Puri, V. & Czech, M. P. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 367–377 (2008).
76. Kaiser, N. *et al.* Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* **42**, 80–89 (1993).
77. Mandarino, L. J., Finlayson, J. & Hassell, J. R. High glucose downregulates glucose transport activity in retinal capillary pericytes but not endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 964–972 (1994).
78. Rajah, T. T., Olson, A. L. & Grammas, P. Differential Glucose Uptake in Retina- and Brain-Derived Endothelial Cells. *Microvasc. Res.* **62**, 236–242 (2001).
79. Alpert, E. *et al.* A natural protective mechanism against hyperglycaemia in vascular endothelial and smooth-muscle cells: role of glucose and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Biochem. J.* **362**, 413–422 (2002).
80. Gaudreault, N., Scriven, D. R. L. & Moore, E. D. W. Characterisation of glucose transporters in the intact coronary artery endothelium in rats: GLUT-2 upregulated by long-term hyperglycaemia. *Diabetologia* **47**, 2081–2092 (2004).
81. Popov, D. Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *Int. J. Diabetes Mellit.* **2**, 189–195 (2010).
82. Haspula, D. *et al.* Influence of a Hyperglycemic Microenvironment on a Diabetic Versus Healthy Rat Vascular Endothelium Reveals Distinguishable Mechanistic and Phenotypic Responses. *Front. Physiol.* **10**, 558 (2019).

83. Loader, J. *et al.* Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects: Systematic Review and Meta-Analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 2060–2072 (2015).
84. Loader, J. *et al.* Effects of Sugar-Sweetened Beverage Consumption on Microvascular and Macrovascular Function in a Healthy Population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**, 1250–1260 (2017).
85. Loader, J. *et al.* The continuums of impairment in vascular reactivity across the spectrum of cardiometabolic health: A systematic review and network meta-analysis. *Obes. Rev.* **20**, 906–920 (2019).
86. Dewanjee, S. *et al.* Molecular mechanism of diabetic neuropathy and its pharmacotherapeutic targets. *Eur. J. Pharmacol.* **833**, 472–523 (2018).
87. Papadopoulou-Marketou, N., Chrousos, G. P. & Kanaka-Gantenbein, C. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **33**, (2017).
88. Czajka, A. & Malik, A. N. Hyperglycemia induced damage to mitochondrial respiration in renal mesangial and tubular cells: Implications for diabetic nephropathy. *Redox Biol.* **10**, 100–107 (2016).
89. Cheung, N., Mitchell, P. & Wong, T. Y. Diabetic retinopathy. *The Lancet* **376**, 124–136 (2010).
90. Wong, T. Y., Cheung, C. M. G., Larsen, M., Sharma, S. & Simó, R. Diabetic retinopathy. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16012 (2016).
91. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
92. Kizub, I. V., Klymenko, K. I. & Soloviev, A. I. Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *Int. J. Cardiol.* **174**, 230–242 (2014).
93. Mochly-Rosen, D., Das, K. & Grimes, K. V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 937–957 (2012).
94. Goldin, A. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* **114**, 597–605 (2006).
95. Berezin, A. Metabolic memory phenomenon in diabetes mellitus: Achieving and perspectives. *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* **10**, S176–S183 (2016).
96. Fosse-Edorh, S., Mandereau-Bruno, L. & Hartemann-Heurtier, A. Les hospitalisations pour complications podologiques chez les personnes diabétiques traitées pharmacologiquement en France en 2013. *Bull. Epidémiol. Hebd.* 638–44 (2015).
97. Wei, R., Chen, H.-L., Zha, M.-L. & Zhou, Z.-Y. Diabetes and pressure ulcer risk in hip fracture patients: a meta-analysis. *J. Wound Care* **26**, 519–527 (2017).

98. International Best Practice Guidelines : Wound Management in Diabetic Foot Ulcers. (2013).
99. Armstrong, D. G., Cohen, K., Courric, S., Bharara, M. & Marston, W. Diabetic foot ulcers and vascular insufficiency: our population has changed, but our methods have not. *J. Diabetes Sci. Technol.* **5**, 1591–1595 (2011).
100. Armstrong, D. G., Lavery, L. A. & Harkless, L. B. Validation of a Diabetic Wound Classification System: The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. *Diabetes Care* **21**, 855–859 (1998).
101. Usui, M. L., Mansbridge, J. N., Carter, W. G., Fujita, M. & Olerud, J. E. Keratinocyte migration, proliferation, and differentiation in chronic ulcers from patients with diabetes and normal wounds. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **56**, 687–696 (2008).
102. Stojadinovic, O. *et al.* Molecular Pathogenesis of Chronic Wounds: The Role of  $\beta$ -Catenin and c-myc in the Inhibition of Epithelialization and Wound Healing. *Am. J. Pathol.* **167**, 59–69 (2005).
103. Lerman, O. Z., Galiano, R. D., Armour, M., Levine, J. P. & Gurtner, G. C. Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast. *Am. J. Pathol.* **162**, 303–312 (2003).
104. Liang, L. *et al.* Integrative analysis of miRNA and mRNA paired expression profiling of primary fibroblast derived from diabetic foot ulcers reveals multiple impaired cellular functions. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **24**, 943–953 (2016).
105. Reihnsner, R., Melling, M., Pfeiler, W. & Menzel, E.-J. Alterations of biochemical and two-dimensional biomechanical properties of human skin in diabetes mellitus as compared to effects of in vitro non-enzymatic glycation. *Clin. Biomech.* **15**, 379–386 (2000).
106. Tracy, L. E., Minasian, R. A. & Caterson, E. J. Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound. *Adv. Wound Care* **5**, 119–136 (2016).
107. Muller, M. *et al.* Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet. Med.* **25**, 419–426 (2008).
108. Liu, Y. *et al.* Increased Matrix Metalloproteinase-9 Predicts Poor Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers. *Diabetes Care* **32**, 117–119 (2009).
109. Nabzdyk, L. P. *et al.* Expression of Neuropeptides and Cytokines in a Rabbit Model of Diabetic Neuroischemic Wound-Healing. *J. Vasc. Surg.* **58**, 766-775.e12 (2013).
110. Leal, E. C. *et al.* Substance P Promotes Wound Healing in Diabetes by Modulating Inflammation and Macrophage Phenotype. *Am. J. Pathol.* **185**, 1638–1648 (2015).
111. Tellechea, A. *et al.* Mast Cells Regulate Wound Healing in Diabetes. *Diabetes* **65**, 2006–2019 (2016).
112. Adair-Kirk, T. L. & Senior, R. M. Fragments of Extracellular Matrix as Mediators of Inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1101–1110 (2008).

113. Drela, E., Stankowska, K., Kulwas, A. & Rość, D. Endothelial progenitor cells in diabetic foot syndrome. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* **21**, 249–254 (2012).
114. Kim, K.-A. *et al.* Dysfunction of endothelial progenitor cells under diabetic conditions and its underlying mechanisms. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 223–234 (2012).
115. Kulwas, A. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells and angiogenic factors in diabetes complicated diabetic foot and without foot complications. *J. Diabetes Complications* **29**, 686–690 (2015).
116. Costa, P. Z. & Soares, R. Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci.* **92**, 1037–1045 (2013).
117. Osaadon, P., Fagan, X. J., Lifshitz, T. & Levy, J. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye* **28**, 510–520 (2014).
118. Tellechea, A., Pradhan, L., Logerfo, F. & Veves, A. Neuropeptides, Inflammation, and Diabetic Wound Healing: Lessons from Experimental Models and Human Subjects: Medical and Surgical Management. in *The Diabetic Foot* 131–154 (2018). doi:10.1007/978-3-319-89869-8\_8.
119. Société Francophone du diabète. Référentiel de bonnes pratiques : Pour la prévention et le traitement local des troubles trophiques podologiques chez les patients diabétiques à haut risque podologique. (2015).
120. Armstrong, D. G., Lavery, L. A., Wu, S. & Boulton, A. J. M. Evaluation of Removable and Irremovable Cast Walkers in the Healing of Diabetic Foot Wounds: A randomized controlled trial. *Diabetes Care* **28**, 551–554 (2005).
121. Kota, S. K. *et al.* Surgical revascularization techniques for diabetic foot. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **4**, 79–83 (2013).
122. Vitale, V., Monami, M. & Mannucci, E. Prostanoids in patients with peripheral arterial disease. *J. Diabetes Complications* **30**, 161–166 (2016).
123. Ruffolo, A. J., Romano, M. & Ciapponi, A. Prostanoids for critical limb ischaemia. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006544 (2010) doi:10.1002/14651858.CD006544.pub2.
124. Vietto, V. *et al.* Prostanoids for critical limb ischaemia. *Cochrane Database Syst. Rev.* (2018) doi:10.1002/14651858.CD006544.pub3.
125. Chastain, C. A., Klopfenstein, N., Serezani, C. H. & Aronoff, D. M. A Clinical Review of Diabetic Foot Infections. *Clin. Podiatr. Med. Surg.* **36**, 381–395 (2019).
126. Elraiyah, T. *et al.* A systematic review and meta-analysis of adjunctive therapies in diabetic foot ulcers. *J. Vasc. Surg.* **63**, 46S-58S.e2 (2016).
127. Hingorani, A. *et al.* The management of diabetic foot: A clinical practice guideline by the Society for Vascular Surgery in collaboration with the American Podiatric Medical Association and the Society for Vascular Medicine. *J. Vasc. Surg.* **63**, 3S-21S (2016).

128. Driver, V. R. *et al.* A clinical trial of Integra Template for diabetic foot ulcer treatment: A clinical trial of IDRT. *Wound Repair Regen.* **23**, 891–900 (2015).
129. Marston, W. A., Hanft, J., Norwood, P., Pollak, R. & Dermagraft Diabetic Foot Ulcer Study Group. The efficacy and safety of Dermagraft in improving the healing of chronic diabetic foot ulcers: results of a prospective randomized trial. *Diabetes Care* **26**, 1701–1705 (2003).
130. Veves, A., Falanga, V., Armstrong, D. G. & Sabolinski, M. L. Graftskin, a Human Skin Equivalent, Is Effective in the Management of Noninfected Neuropathic Diabetic Foot Ulcers: A prospective randomized multicenter clinical trial. *Diabetes Care* **24**, 290–295 (2001).
131. Smiell, J. M. *et al.* Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: a combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen.* **7**, 335–346 (1999).
132. Bui, T. Q. *et al.* Epidermal Growth Factor is Effective in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Meta-Analysis and Systematic Review. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* **16**, 2584 (2019).
133. Ishihara, J. *et al.* Laminin heparin-binding peptides bind to several growth factors and enhance diabetic wound healing. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
134. Gainza, G. *et al.* A novel strategy for the treatment of chronic wounds based on the topical administration of rhEGF-loaded lipid nanoparticles: In vitro bioactivity and in vivo effectiveness in healing-impaired db/db mice. *J. Controlled Release* **185**, 51–61 (2014).
135. Silva, S. Y. *et al.* Double blind, randomized, placebo controlled clinical trial for the treatment of diabetic foot ulcers, using a nitric oxide releasing patch: PATHON. *Trials* **8**, (2007).
136. Walton, D. M., Minton, S. D. & Cook, A. D. The potential of transdermal nitric oxide treatment for diabetic peripheral neuropathy and diabetic foot ulcers. *Diabetes Metab. Syndr.* (2018) doi:10.1016/j.dsx.2018.07.003.
137. Edmonds, M. E. *et al.* Multicenter, randomized controlled, observer-blinded study of a nitric oxide generating treatment in foot ulcers of patients with diabetes-ProNOx1 study. *Wound Repair Regen. Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissue Repair Soc.* **26**, 228–237 (2018).
138. Rodgers, K. E., Bolton, L. L., Verco, S. & diZerega, G. S. NorLeu3-Angiotensin (1-7) [DSC127] as a Therapy for the Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Adv. Wound Care* **4**, 339–345 (2015).
139. Montgomery, J., Ghatnekar, G. S., Grek, C. L., Moyer, K. E. & Gourdie, R. G. Connexin 43-Based Therapeutics for Dermal Wound Healing. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
140. Kotzki, S. Therapeutic iontophoresis for scleroderma-related cutaneous ulcerations : screening, proof-of-concept study in a mouse scleroderma model. (Université Grenoble Alpes, 2016).

141. Savina, Y. Iontophorèse d'un analogue de la prostacycline pour améliorer la cicatrisation des ulcères liés à une dysfonction microvasculaire cutanée. (2019).
142. O'Callaghan, D. S. Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. 13 (2011).
143. Vane, J. R. Adventures and excursions in bioassay: the stepping stones to prostacyclin. *Br. J. Pharmacol.* **79**, 821–838 (1983).
144. Tsuboi, K., Sugimoto, Y. & Ichikawa, A. Prostanoid receptor subtypes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 535–556 (2002).
145. Hirata, T. & Narumiya, S. Prostanoid Receptors. *Chem. Rev.* **111**, 6209–6230 (2011).
146. Woodward, D. F., Jones, R. L. & Narumiya, S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: Classification of Prostanoid Receptors, Updating 15 Years of Progress. *Pharmacol. Rev.* **63**, 471–538 (2011).
147. Chen, H. Role of thromboxane A2 signaling in endothelium-dependent contractions of arteries. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **134**, 32–37 (2018).
148. Pluchart, H., Khouri, C., Blaise, S., Roustit, M. & Cracowski, J.-L. Targeting the Prostacyclin Pathway: Beyond Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends Pharmacol. Sci.* (2017) doi:10.1016/j.tips.2017.03.003.
149. Paul, Ashby & Sheth. Distribution of prostaglandin IP and EP receptor subtypes and isoforms in platelets and human umbilical artery smooth muscle cells: Prostaglandin Receptors in Platelets. *Br. J. Haematol.* **102**, 1204–1211 (1998).
150. Chu, L., Liou, J.-Y. & Wu, K. K. Prostacyclin protects vascular integrity via PPAR/14-3-3 pathway. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **118–119**, 19–27 (2015).
151. Schuster, V. L. Prostaglandin transport. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68–69**, 633–647 (2002).
152. Syeda, M. M. *et al.* Prostaglandin Transporter Modulates Wound Healing in Diabetes by Regulating Prostaglandin-Induced Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **181**, 334–346 (2012).
153. Kampfer, H., Schmidt, R., Geisslinger, G., Pfeilschifter, J. & Frank, S. Wound Inflammation in Diabetic ob/ob Mice: Functional Coupling of Prostaglandin Biosynthesis to Cyclooxygenase-1 Activity in Diabetes-Impaired Wound Healing. *Diabetes* **54**, 1543–1551 (2005).
154. Cracowski, J.-L. Les isoprostanes : un rôle physiopathologique potentiel en pathologie vasculaire. *Rev. Médecine Interne* **25**, 459–463 (2004).
155. Kinsella, B. T., O'Mahony, D. J. & Fitzgerald, G. A. The human thromboxane A2 receptor alpha isoform (TP alpha) functionally couples to the G proteins Gq and G11 in vivo and is activated by the isoprostane 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **281**, 957–964 (1997).

156. Wilson, S. J., McGinley, K., Huang, A. J. & Smyth, E. M. Heterodimerization of the  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of the human Thromboxane receptor enhances isoprostane signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 397–403 (2007).
157. Lobato, N. S. *et al.* Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin in obese non-diabetic rats. *Life Sci.* **90**, 228–235 (2012).
158. Lee, H. J. *et al.* Metformin prevents vascular prostanoid release alterations induced by a high-fat diet in rats. *Auton. Autacoid Pharmacol.* **37**, 37–43 (2017).
159. Félétou, M., Verbeuren, T. J. & Vanhoutte, P. M. Endothelium-dependent contractions in SHR: a tale of prostanoid TP and IP receptors. *Br. J. Pharmacol.* **156**, 563–574 (2009).
160. Vanhoutte, P. M. & Tang, E. H. C. Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad! *J. Physiol.* **586**, 5295–5304 (2008).
161. Mokhtar, S. S. *et al.* Reduced Expression of Prostacyclin Synthase and Nitric Oxide Synthase in Subcutaneous Arteries of Type 2 Diabetic Patients. *Tohoku J. Exp. Med.* **231**, 217–222 (2013).
162. Du, X. *et al.* Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOS activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J. Clin. Invest.* **116**, 1071–1080 (2006).
163. Randriamboavonjy, V. *et al.* Calpain 1 cleaves and inactivates prostacyclin synthase in mesenteric arteries from diabetic mice. *Basic Res. Cardiol.* **112**, 10 (2017).
164. Kowal-Bielecka, O. *et al.* Update of EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* **76**, 1327–1339 (2017).
165. Davì, G., Santilli, F. & Vazzana, N. Thromboxane Receptors Antagonists and/or Synthase Inhibitors. in *Antiplatelet Agents* (eds. Gresele, P., Born, G. V. R., Patrono, C. & Page, C. P.) vol. 210 261–286 (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
166. Gatfield, J. *et al.* Selexipag Active Metabolite ACT-333679 Displays Strong Anticontractile and Antiremodeling Effects but Low  $\beta$ -Arrestin Recruitment and Desensitization Potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **362**, 186–199 (2017).
167. Awsakulsutthi, S., Punpho, K., Mamom, J., Baikrut, P. & Yingchoorod, P. Beraprost Sodium for Chronic Diabetic Foot Ulcer: A Randomized Controlled Trial in Thammasat University Hospital. *Ann. Vasc. Dis.* **7**, 40–45 (2014).
168. Blaise, S. *et al.* Cathodal iontophoresis of treprostinil and iloprost induces a sustained increase in cutaneous flux in rats: Cutaneous iontophoresis of prostacyclin analogues. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 557–565 (2011).
169. Roustit, M. *et al.* Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 439–445 (2014).
170. Hellmann, M., Roustit, M., Gaillard-Bigot, F. & Cracowski, J.-L. Cutaneous iontophoresis of treprostinil, a prostacyclin analog, increases microvascular blood flux in diabetic malleolus area. *Eur. J. Pharmacol.* **758**, 123–128 (2015).

171. Sato, K. & Mine, T. Analysis of in vitro rat skin permeation and metabolism of SM-10902, prodrug of synthetic prostacyclin analogue. *Int. J. Pharm.* **135**, 127–136 (1996).
172. Yamamoto, T., Horikawa, N., Komuro, Y. & Hara, Y. Effect of topical application of a stable prostacyclin analogue, SM-10902 on wound healing in diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* **302**, 53–60 (1996).
173. Liu, Z., Benard, O., Syeda, M. M., Schuster, V. L. & Chi, Y. Inhibition of Prostaglandin Transporter (PGT) Promotes Perfusion and Vascularization and Accelerates Wound Healing in Non-Diabetic and Diabetic Rats. *PLOS ONE* **10**, e0133615 (2015).
174. Moncada, S., Higgs, A. & Furchgott, R. XIV. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev.* **49**, 137–142 (1997).
175. Forstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* **33**, 829–837 (2012).
176. Derbyshire, E. R. & Marletta, M. A. Biochemistry of soluble guanylate cyclase. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* 17–31 (Springer, 2009).
177. Matthews, J. R., Botting, C. H., Panico, M., Morris, H. R. & Hay, R. T. Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2236–2242 (1996).
178. Ward, C. *et al.* Induction of human neutrophil apoptosis by nitric oxide donors: evidence for a caspase-dependent, cyclic-GMP-independent, mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **59**, 305–314 (2000).
179. Gordge, M. P., Hothersall, J. S. & Noronha-Dutra, A. A. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *Br. J. Pharmacol.* **124**, 141–148 (1998).
180. Witte, M. B. & Barbul, A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.* **183**, 406–412 (2002).
181. Fang, F. C. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio* **2**, (2011).
182. Kobayashi, Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 1157–1162 (2010).
183. Brüne, B. The Intimate Relation Between Nitric Oxide and Superoxide in Apoptosis and Cell Survival. *Antioxid. Redox Signal.* **7**, 497–507 (2005).
184. Kim Young-Myeong, Bombeck Christopher A. & Billiar Timothy R. Nitric Oxide as a Bifunctional Regulator of Apoptosis. *Circ. Res.* **84**, 253–256 (1999).
185. Beyer, C. *et al.* Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann. Rheum. Dis.* **71**, 1019–1026 (2012).
186. Sandner, P. & Stasch, J. P. Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence. *Respir. Med.* **122**, S1–S9 (2017).

187. Siragusa, M. & Fleming, I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflugers Arch.* **468**, 1125–1137 (2016).
188. Schäffer, M. R. *et al.* Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: A possible pathophysiologic correlation. *Surgery* **121**, 513–519 (1997).
189. Witte, M. B., Thornton, F. J., Tantry, U. & Barbul, A. L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism.* **51**, 1269–1273 (2002).
190. Lundberg, J. O., Gladwin, M. T. & Weitzberg, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 623–641 (2015).
191. Bryan, N. S. Nitric oxide enhancement strategies. *Future Sci. OA* **1**, (2015).
192. Armstrong, D. G. *et al.* Effect of oral nutritional supplementation on wound healing in diabetic foot ulcers: a prospective randomized controlled trial. *Diabet. Med.* **31**, 1069–1077 (2014).
193. Jerônimo, M. S. *et al.* Oral or topical administration of L-arginine changes the expression of TGF and iNOS and results in early wounds healing. *Acta Cir. Bras.* **31**, 586–596 (2016).
194. Zandifar, A. *et al.* Comparison of the effect of topical versus systemic L-arginine on wound healing in acute incisional diabetic rat model. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **20**, 233–238 (2015).
195. Miller, C. C., Miller, M. K., Ghaffari, A. & Kunimoto, B. Treatment of chronic nonhealing leg ulceration with gaseous nitric oxide: a case study. *J. Cutan. Med. Surg.* **8**, 233–238 (2004).
196. Moeen Rezakhanlou, A. *et al.* Gaseous nitric oxide exhibits minimal effect on skin fibroblast extracellular matrix gene expression and immune cell viability. *Cell Biol. Int.* **35**, 407–415 (2011).
197. Shekhter, A. B., Serezhenkov, V. A., Rudenko, T. G., Pekshev, A. V. & Vanin, A. F. Beneficial effect of gaseous nitric oxide on the healing of skin wounds. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **12**, 210–219 (2005).
198. Malone-Povolny, M. J., Maloney, S. E. & Schoenfisch, M. H. Nitric Oxide Therapy for Diabetic Wound Healing. *Adv. Healthc. Mater.* **8**, 1801210 (2019).
199. Laursen, J. B., Boesgaard, S., Poulsen, H. E. & Aldershvile, J. Nitrate tolerance impairs nitric oxide-mediated vasodilation in vivo. *Cardiovasc. Res.* **31**, 814–819 (1996).
200. Münzel Thomas, Daiber Andreas & Mülsch Alexander. Explaining the Phenomenon of Nitrate Tolerance. *Circ. Res.* **97**, 618–628 (2005).
201. Stasch, J.-P. & Hobbs, A. J. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* 277–308 (Springer, 2009).

202. Schmidt, H. H. H. W., Schmidt, P. M. & Stasch, J.-P. NO- and Haem-Independent Soluble Guanylate Cyclase Activators. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (eds. Schmidt, H. H. H. W., Hofmann, F. & Stasch, J.-P.) vol. 191 309–339 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
203. Evgenov, O. V. *et al.* NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 755–768 (2006).
204. Stasch, J.-P. *et al.* Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. *J. Clin. Invest.* **116**, 2552–2561 (2006).
205. Stasch, J.-P., Pacher, P. & Evgenov, O. V. Soluble Guanylate Cyclase as an Emerging Therapeutic Target in Cardiopulmonary Disease. *Circulation* **123**, 2263–2273 (2011).
206. Haasbach, E., Beyer, C., Distler, J. & Sandner, P. The Effects of SGC Stimulators on Wound Healing in the Tight Skin (TSK-1) Mouse Skin Fibrosis Model. *Ann. Rheum. Dis.* **74**, 151.1-151 (2015).
207. Hahn, M. *et al.* Branched 3-phenylpropionic acid derivatives and their use. (2019).
208. Zhou, Z. *et al.* Soluble guanylyl cyclase activation by HMR-1766 (ataciguat) in cells exposed to oxidative stress. *AJP Heart Circ. Physiol.* **295**, H1763–H1771 (2008).
209. Schäfer, A. *et al.* Soluble guanylyl cyclase activation with HMR1766 attenuates platelet activation in diabetic rats. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 2813–2818 (2006).
210. Schäfer, A. *et al.* Increased cytochrome P450E1 expression and altered hydroxyeicosatetraenoic acid formation mediate diabetic vascular dysfunction: rescue by guanylyl-cyclase activation. *Diabetes* **59**, 2001–2009 (2010).
211. Ellati, R. T. *et al.* Increased phosphodiesterase type 5 levels in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *J. Sex. Med.* **10**, 362–369 (2013).
212. Wang, L. *et al.* Phosphodiesterase-5 is a therapeutic target for peripheral neuropathy in diabetic mice. *Neuroscience* **193**, 399–410 (2011).
213. Tingey, T., Shu, J., Smuczek, J. & Pope, J. Meta-Analysis of Healing and Prevention of Digital Ulcers in Systemic Sclerosis: SSc and Digital Ulcer Treatment. *Arthritis Care Res.* **65**, 1460–1471 (2013).
214. Farsaie, S., Khalili, H., Karimzadeh, I. & Dashti-Khavidaki, S. An old drug for a new application: potential benefits of sildenafil in wound healing. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **15**, 483–498 (2012).
215. Arslantaş, R. & Arslantaş, M. K. Adverse Effect of Sildenafil on Healing Ischemic Wounds: Results of an In vivo Study. *Ostomy. Wound Manage.* **61**, 32–37 (2015).
216. Barral, S. M. *et al.* Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps. *Acta Cir. Bras.* **26**, 314–319 (2011).
217. Davenport, A. P. *et al.* Endothelin. *Pharmacol. Rev.* **68**, 357–418 (2016).

218. Yanagisawa, M. *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* **332**, 411–415 (1988).
219. Rodríguez-Pascual, F., Busnadiego, O. & González-Santamaría, J. The profibrotic role of endothelin-1: Is the door still open for the treatment of fibrotic diseases? *Life Sci.* **118**, 156–164 (2014).
220. Kähler, J. *et al.* Oxidative stress increases synthesis of big endothelin-1 by activation of the endothelin-1 promoter. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**, 1429–1437 (2000).
221. Schneider, J. G. *et al.* Elevated plasma endothelin-1 levels in diabetes mellitus. *Am. J. Hypertens.* **15**, 967–972 (2002).
222. Solini, A., Santini, E., Madec, S., Cuccato, S. & Ferrannini, E. Effects of endothelin-1 on fibroblasts from type 2 diabetic patients: Possible role in wound healing and tissue repair. *Growth Factors* **25**, 392–399 (2007).
223. Seed, A. *et al.* The dual endothelin converting enzyme/neutral endopeptidase inhibitor SLV-306 (daglutril), inhibits systemic conversion of big endothelin-1 in humans. *Life Sci.* **91**, 743–748 (2012).
224. Jain, A. *et al.* Creating a Soluble Binder to Endothelin-1 Based on the Natural Ligand Binding Domains of the Endothelin-1 (G-Protein-Coupled) Receptor. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **25**, 107–114 (2019).
225. Jain, A., Coffey, C., Mehrotra, V. & Flammer, J. Endothelin-1 traps as a potential therapeutic tool: from diabetes to beyond? *Drug Discov. Today* (2019) doi:10.1016/j.drudis.2019.07.008.
226. Romaniello, A., Viola, G., Salsano, F. & Rosato, E. In systemic sclerosis patients, Bosentan is safe and effective for digital ulcer prevention and it seems to attenuate the development of pulmonary arterial hypertension. *Rheumatology* **53**, 570–571 (2014).
227. Zampogna, G., Paolino, S., Serio, B., Cimmino, M. & Sulli, A. Longterm Treatment with Endothelin Receptor Antagonist Bosentan and Iloprost Improves Fingertip. *J. Rheumatol.* **41**, 881–886 (2014).
228. Makino, K. *et al.* Knockout of endothelial cell-derived endothelin-1 attenuates skin fibrosis but accelerates cutaneous wound healing. *PLoS One* **9**, e97972 (2014).
229. Kingman, M. *et al.* Management of prostacyclin side effects in adult patients with pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **7**, 598–608 (2017).
230. Lane, M. E., Santos, P., Watkinson, A. C. & Hadgraft, J. Passive skin permeation enhancement. in *Transdermal and topical drug delivery: Principles and practice* 23–42 (John Wiley & Sons, New York, 2012).
231. Hadgraft, J. & Lane, M. E. Advanced topical formulations (ATF). *Int. J. Pharm.* **514**, 52–57 (2016).

232. Hadgraft, J. & Lane, M. E. Drug crystallization – implications for topical and transdermal delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 1–14 (2016) doi:10.1517/17425247.2016.1140146.
233. Lane - 2013 - Skin penetration enhancers.pdf.
234. Stott, P. W., Williams, A. C. & Barry, B. W. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J. Controlled Release* **50**, 297–308 (1998).
235. Nash, R. A., Mehta, D. B., Matias, J. R. & Orentreich, N. The Possibility of Lidocaine Ion Pair Absorption Through Excised Hairless Mouse Skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **5**, 160–170 (1992).
236. Grice, J. E., Prow, T. W., Kendall, M. A. F. & Roberts, M. S. Electrical and Physical Methods of Skin Penetration Enhancement. in *Topical and Transdermal Drug Delivery* (eds. Benson, H. A. E. & Watkinson, A. C.) 43–65 (John Wiley & Sons, Inc., 2012). doi:10.1002/9781118140505.ch3.
237. Gill, H. S. & Prausnitz, M. R. Coated microneedles for transdermal delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **117**, 227–237 (2007).
238. Shin, C. I., Jeong, S. D., Rejinold, N. S. & Kim, Y.-C. Microneedles for vaccine delivery: challenges and future perspectives. *Ther. Deliv.* **8**, 447–460 (2017).
239. Bhatnagar, S., Dave, K. & Venuganti, V. V. K. Microneedles in the clinic. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **260**, 164–182 (2017).
240. Kalia, Y. N., Naik, A., Garrison, J. & Guy, R. H. Iontophoretic drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 619–658 (2004).
241. Gratieri, T. & Kalia, Y. N. Mathematical models to describe iontophoretic transport in vitro and in vivo and the effect of current application on the skin barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 315–329 (2013).
242. Denet, A.-R., Vanbever, R. & Pr at, V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **56**, 659–674 (2004).
243. Grey, J. E., Enoch, S. & Harding, K. G. Wound assessment. *Bmj* **332**, 285–288 (2006).
244. Blaise, S., Roustit, M., Forli, A., Imbert, B. & Cracowski, J.-L. Non-healing ischaemic digital ulcer in a systemic sclerosis patient: a challenging clinical case: Digital ulcer in a systemic sclerosis patient: a challenging clinical case. *Int. Wound J.* (2017) doi:10.1111/iwj.12742.
245. Gravier, J. *et al.* Lipidots: competitive organic alternative to quantum dots for in vivo fluorescence imaging. *J. Biomed. Opt.* **16**, 096013–096013 (2011).
246. Delmas, T. Caractérisation physicochimique et compréhension des propriétés de vectorisation des nanoparticules lipidots pour les applications biom dicales. (2011).

247. Courant, T. *et al.* Tailoring nanostructured lipid carriers for the delivery of protein antigens: Physicochemical properties versus immunogenicity studies. *Biomaterials* **136**, 29–42 (2017).
248. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J. Controlled Release* **244**, 108–121 (2016).
249. Delmas, T. *et al.* Preparation and characterization of highly stable lipid nanoparticles with amorphous core of tuneable viscosity. *J. Colloid Interface Sci.* **360**, 471–481 (2011).
250. Delmas, T. *et al.* How To Prepare and Stabilize Very Small Nanoemulsions. *Langmuir* **27**, 1683–1692 (2011).
251. Navarro, F. P. *et al.* Lipid Nanoparticle Vectorization of IndoCyanine Green Improves Fluorescence Imaging for Tumor Diagnosis and Lymph Node Resection. *J. Biomed. Nanotechnol.* **8**, 730–741 (2012).
252. Navarro, F. P. *et al.* Cell Tolerability and Biodistribution in Mice of Indocyanine Green-Loaded Lipid Nanoparticles. *J. Biomed. Nanotechnol.* **8**, 594–604 (2012).

## II. Formulation et caractérisation de gels de nanoparticules

A.	Screening des principes actifs vasodilatateurs.....	109
	1. Choix des vasodilatateurs : Etude bibliographique .....	109
	2. Screening d'encapsulation de différents principes actifs dans les nanoparticules lipidiques .....	112
B.	Formulation de gels de nanoparticules pour application topique .....	143
	1. Stratégie de formulation .....	143
	2. Formulation de gels à partir de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) .....	146
	3. Etude de stabilité d'encapsulation sur 6 mois .....	154
C.	Formulation d'émulsions .....	162
	1. Phase de sélection des formulations .....	162
	2. Stabilité.....	167
D.	Conclusion du chapitre III .....	170
E.	Bibliographie .....	172

## A. Screening des principes actifs vasodilatateurs

### 1. Choix des vasodilatateurs : Etude bibliographique

Nous avons décidé de choisir des principes actifs provenant des classes pharmacologiques présentées lors de l'introduction à partir de la littérature. Nous avons évalué leur potentiel d'effet sur la cicatrisation et leur potentiel d'encapsulation. Dans le cadre de cette thèse, nous avons ainsi choisi 6 principes actifs agissant sur **les voies de la prostacycline/récepteur IP** et de la **NO/guanylate cyclase/phosphodiesterases de type V**. Les médicaments agissant sur la voie de l'endothéline tels que les antagonistes des récepteurs ET-1 (bosentan, macitentan) n'ont pas été retenus dans le cadre de cette thèse du fait de peu de données sur leur possibilité d'encapsulation dans les nanoparticules lipidiques et de leur action antagoniste plus difficile à évaluer en pharmacodynamie, afin de respecter une durée de la thèse en 3 ans.

#### *a) Analogues de la prostacycline*

Dans la bibliographie, il existe plusieurs études évaluant l'encapsulation des analogues de la prostacycline dans différents vecteurs comme montré dans le Tableau II.1. La structure lipidique de la prostacycline et de ses analogues permet théoriquement une encapsulation facile dans des nanoparticules lipidiques.

Principe actif	Référence	Type d'encapsulation	Détails
Iloprost	Jain et al. 2014 <sup>1</sup>	Liposomes	Ex vivo sur artère pulmonaire de souris.
	Kleemann et al. 2006 <sup>2</sup>	Liposomes	Etude d'encapsulation
	Banning et al. 1997 <sup>3</sup>	Plaquettes autologues	Encapsulation dans des plaquettes autologues et évaluation sur modèle d'angioplastie chez le cochon
Treprostinil	Insmmed Incorporated <sup>4,5</sup>	Nanoparticules lipidiques	Modèle rat d'HTAP. Utilisation de prodrug de treprostinil pour améliorer l'encapsulation.
Beraprost	Ishihara et al. 2015 <sup>6</sup>	Nanoparticules polymériques	Modèle murin d'HTAP.

Tableau II.1 : Analyse de la littérature de l'encapsulation des analogues de la prostacycline

Les principes actifs retenus sont résumés dans le Tableau II.2. Nous avons décidé de choisir deux molécules candidates de structure chimique différente. Parmi les analogues de la

prostacycline, malgré les données préalables montrant la capacité d'encapsulation, nous avons décidé de ne pas choisir l'iloprost comme candidat, pour des raisons à la fois de coût (1,903.00 € pour 10 mg) et d'expertise historique très importante de l'équipe pour le treprostinil. En effet, le **treprostinil** est la molécule de référence dans l'équipe pour son utilisation par iontophorèse cathodale dans le cadre du traitement d'ulcérations cutanées sur un modèle de souris sclérodermique et diabétique <sup>7,8</sup>, et est utilisée par l'équipe dans le cadre de protocoles d'études cliniques. Nous utiliserons également un agoniste IP non analogue de la prostacycline, le selexipag ou plus particulièrement son métabolite actif l'**ACT-333679**. En effet, cette nouvelle classe (agoniste IP, de structure chimique non prostanoloïde) présente un profil pharmacodynamique différent, avec une affinité très spécifique pour le récepteur IP tandis que le treprostinil présente quant à lui une activité sur les récepteurs DP1/EP2/IP. Nous avons décidé d'utiliser le métabolite actif du selexipag car le selexipag est peu actif et nécessite une métabolisation faisant intervenir la carboxylestérase hépatique I <sup>9</sup>, cette enzyme n'étant pas ou peu présente dans la peau <sup>10</sup>.

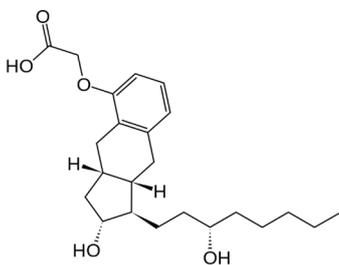
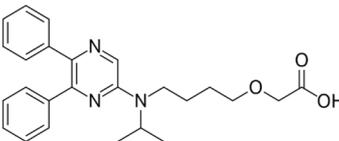
Principe actif	Structure physicochimique	Pharmacologie
Treprostinil		Analogue de la prostacycline : Activité sur les récepteurs DP1/EP2/IP
ACT-333679		Agoniste non prostanoloïde du récepteur IP Sélectif au récepteur IP

Tableau II.2 : Voie de la prostacycline, principes actifs retenus

### *b) Stimulateurs et activateurs de la guanylate cyclase*

Comme décrit dans l'introduction, les stimulateurs et activateurs de la guanylate cyclase sont des nouvelles classes thérapeutiques développées dans les pathologies vasculaires. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons choisi le cinaciguat et le riociguat (voir Tableau II.3). Nous n'avons trouvé aucun travail présentant l'encapsulation de ces deux molécules dans des nanoparticules lipidiques. Sur des données préliminaires, le cinaciguat semble améliorer la cicatrisation d'ulcères chez la souris sclérodermique et son administration topique permettrait

de réduire les effets indésirables décrits lors des études cliniques (hypotensions sévères <sup>11</sup>) que l'on a pu également retrouver lors des phases animales.

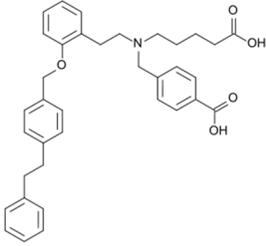
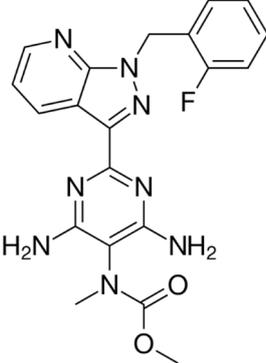
Principe actif	Structure physicochimique	Pharmacologie
Cinaciguat		Activateur de la guanylate cyclase
Riociguat		Stimulateur de la guanylate cyclase

Tableau II.3 : Guanylate cyclase, Principes actifs retenus

### c) Inhibiteurs de la phosphodiesterase 5

Les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5 sont des inhibiteurs de la dégradation du GMPc en GMP, permettant ainsi une amélioration de la vasodilatation. Nous avons retenu le sildenafil ainsi que le tadalafil (voir Tableau II.4). En effet ces deux principes actifs ont déjà été encapsulés dans des nanoparticules lipidiques.<sup>12,13</sup> De plus, ils présentent des structures physicochimiques différentes qui peuvent influencer leur encapsulation dans nos nanoparticules. La différence principale entre les deux est leur demi-vie lors de leur administration orale (17.5 h pour le tadalafil et 3.8 h pour le sildenafil).<sup>14</sup>

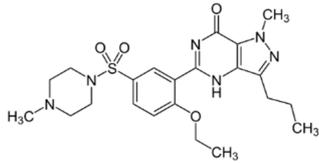
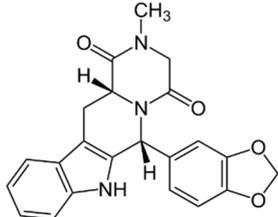
Principe actif	Structure physicochimique	Pharmacologie
Sildenafil		Inhibiteur des phosphodiésterases 5
Tadalafil		

Tableau II.4 : Inhibiteurs des Phosphodiésterases 5, principes actifs retenus

#### d) Conclusion

Six principes actifs ayant des compositions chimiques suggérant des propriétés physico-chimiques favorables pour leur encapsulation et correspondant à 3 classes thérapeutiques ont été sélectionnés (Tableau II.5) pour l'étape de screening.

Principe actif	Classe thérapeutique
Treprostinil	Analogue de la prostacycline
ACT-333679	Agoniste des récepteurs IP
Cinaciguat	Activateur de la guanylate cyclase
Riociguat	Stimulateur de la guanylate cyclase
Sildenafil	Inhibiteur des phosphodiésterases 5
Tadalafil	

Tableau II.5 : Listing des principes actifs utilisés

## 2. Screening d'encapsulation de différents principes actifs dans les nanoparticules lipidiques

### a) Objectif et protocole expérimental général

L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel d'encapsulation des différents principes actifs définis dans la partie II.A.1. Dans ce cadre-là, nous caractériserons les différentes formulations cationiques et neutres avec un taux de charge de 1.5%. Ce taux de charge, correspondant à des valeurs souvent rapportées avec des nanoparticules lipidiques, a été déterminé de manière arbitraire en fonction de la quantité de principes actifs utilisés lors d'une formulation. Un taux

de charge plus élevé est souhaitable et sera évalué mais un taux de charge plus faible limite la formulation par limitation de la quantité pesée de principe actif.

Leur caractérisation concernera leur taille (diamètre moyen mesuré par diffusion dynamique de la lumière), leur charge (charge de surface mesurée par électrophorèse capillaire) et leur rendement d'encapsulation (concentration encapsulée après dialyse). Les différentes méthodes sont décrites dans la partie expérimentale suivante. Si les caractéristiques sont correctes (pas de déstabilisation, pertes lors de la dialyse limitée), nous réaliserons une augmentation du taux de charge en principe actif à 3 puis 5%. Nous réaliserons également un suivi dans le temps des formulations stockées à température ambiante (25°C) ou au frigo.

### *b) Partie expérimentale*

#### Composition des nanoparticules

Les Lipidots sont des nanoparticules nanostructurées développées par le CEA-LETI qui sont composées d'un mélange de cire (Suppocire NC, Gattefosé) et d'huile de soja (Super refined soybean oil, Croda) stabilisées à l'aide de phospholipides de soja (Lipoid S75, Lipoid) et par une couronne de surfactants pegylés (Myrj S40, Croda). Des nanoparticules chargées positivement sont également obtenues par ajout de phospholipides cationiques tels que le DOTAP et le DOPE (Avanti Polar Lipids) et par le remplacement du Lipoid S75 par de la phosphatidylcholine de soja (Lipoid SPC-3).

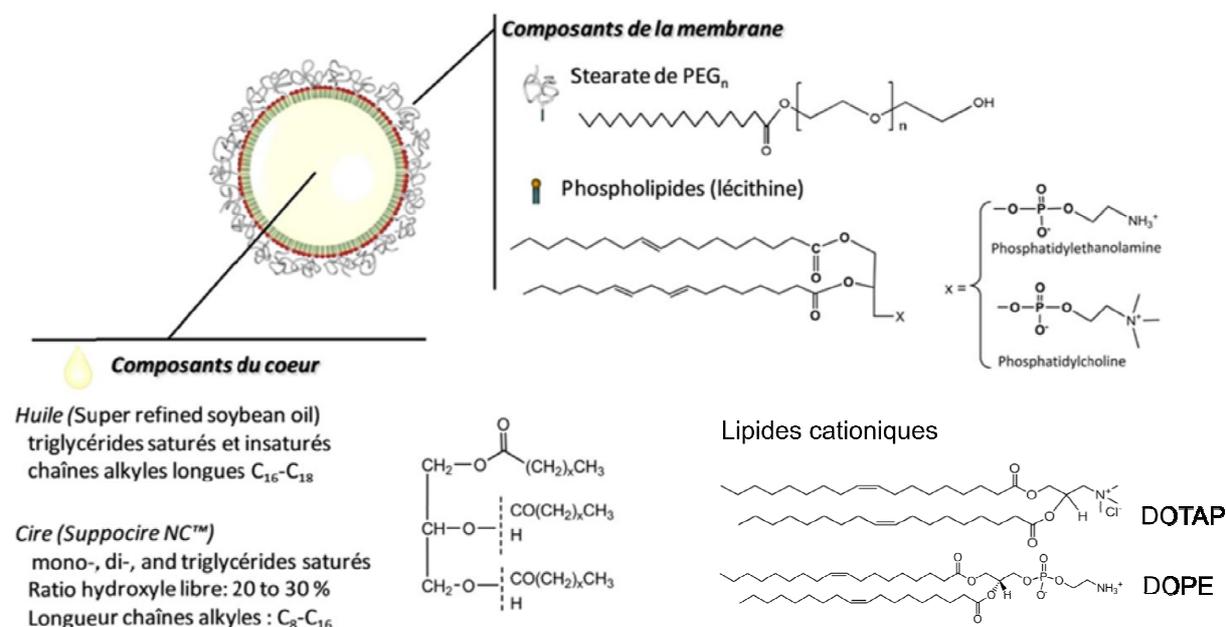


Figure II-1 : Composition générale des lipidots

L'ajustement des ratios massiques des composés permet d'obtenir des tailles différentes de nanoparticules qui sont résumées dans le Tableau II.6. Les formulations sont nommées en fonction de la charge de surface (C pour cationiques et N pour neutres). Les chiffres indiquent la taille moyenne des nanoparticules en nm mesurée par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

Fonction	Cœur des nanoparticules		Phospholipides neutres		Phospholipides cationiques		Surfactant pégylé			
Composants	Huile de soja	Cire	S75	SPC-3	DOTAP	DOPE	Myrj40	Glycérol	PBS	Concentration théorique (mg/ml)
Formulations										
C80	298,7	99,7	X	9,7	66,8	X	191,9	333	950	346
C80 (diluée)	67,1	22,4	X	2,2	15	0	43,1	1000	1800	54,5
C35 (diluée)	19,7	6,6	X	3,7	32,8	3,9	41,3	1000	1800	38,6
N80	307,5	102,5	50	X	X	X	300	X	1240	380
N80 (diluée)	81,6	27,2	13,3	X	X	X	79	1000	1800	72,1
N30	75	25	150	X	X	X	350	X	1400	300
N50	255	85	65	X	X	X	345	X	1250	375
N120	450	150	45	X	X	X	215	X	1140	430

Tableau II.6 : Tableau de formulation des Lipidots en fonction de la charge, de la taille, et de la concentration choisie. Pour chaque formulation, la lettre représente la charge de surface des nanoparticules (C pour cationique et N pour neutre) et les chiffres suivants représentent la taille moyenne des nanoparticules en nm. En orange, on retrouve les composés de la phase huileuse et en bleue ceux de la phase aqueuse.

## Formulation

Les composants de la phase huileuse sont pesés dans un flacon de 4 ml et solubilisés en utilisant du dichlorométhane dans un bain marie à 55 °C. Une fois homogène, le dichlorométhane est évaporé sous un flux d'argon pendant 10 minutes. La phase aqueuse est également chauffée à 55 °C dans un second flacon afin de solubiliser correctement le MyrjS40 et d'atteindre une température similaire à la phase huileuse. La phase aqueuse est ensuite rajoutée dans la phase huileuse et la formulation de nanoparticules est réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons (VCX750 Ultrasonic processor). La sonde de sonication (3 mm de diamètre) est placée au centre du flacon à mi-hauteur du niveau de liquide. Le flacon est maintenu dans un bain à 55 °C durant la sonication. Le protocole de sonication utilise une puissance de 25 % (125 watts) avec des cycles de 10 secondes d'ultrasons espacés de 30 secondes de pause pour un temps effectif de sonication de 5 minutes. Dans le cadre des nanoparticules C35, le protocole de sonication est adapté avec une puissance diminuée à 20 % (100 watts) et un temps effectif de sonication doublé à 10 minutes.

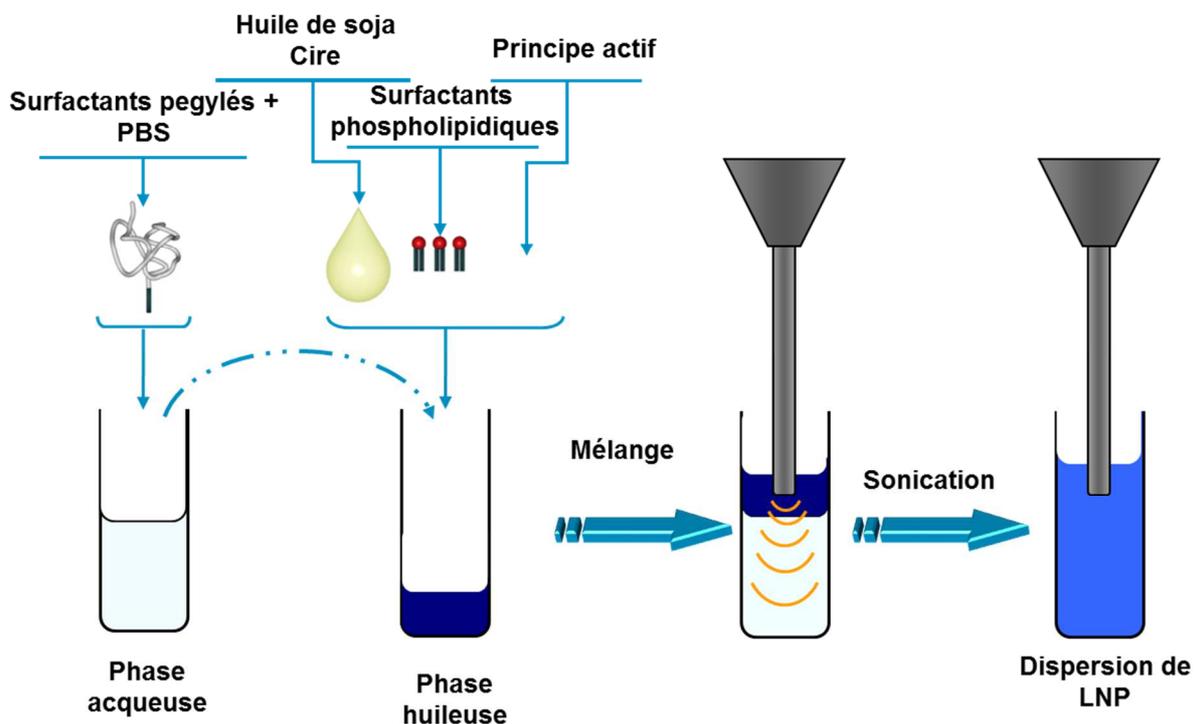


Figure II-2 : Protocole de formulation classique des Lipidots. Après formulation, les dispersions de LNP sont dialysées et filtrées sur 0.2µm afin d'éliminer les composants non encapsulés.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé les formulations diluées pour l'encapsulation des principes actifs du fait d'un prix prohibitif pour des formulations concentrées (lié à la concentration en principe actif importante nécessaire). Les formulations concentrées ont été utilisées pour les phases de mise au point et pour les formulations véhicules.

Après sonication, les formulations concentrées sont diluées avec du PBS pour les amener à une concentration cible de 200 mg/ml. Les nanoparticules sont ensuite transférées dans une membrane de dialyse avec un seuil de coupure de 12-14kDA (ZelluTrans). La dialyse est réalisée dans du PBS (1L) à température ambiante pendant 24 h avec 2 changements du milieu de dialyse. Cette phase permet d'éliminer les composants non encapsulés tels que le glycérol, les principes actifs ainsi qu'une partie du MyrJ S40 (le MyrJ S40 est également composé à 30% de PEG sans groupements C18). Les LNP sont ensuite récupérées et filtrées sur une membrane de cellulose de 0,22 µm (Millipore).

### Encapsulation des principes actifs

Les principes actifs sont rajoutés dans la phase huileuse de la formulation. Pour solubiliser correctement les principes actifs, différents mélanges de solvants volatils ont été testés. Les mélanges utilisés sont résumés dans le Tableau II.7. Les principes actifs sont pesés dans un tube Eppendorf de 0,5 ml et solubilisés par la solution décrite dans le Tableau II.6. La solution est ensuite passée au bain à ultrasons pour correctement solubiliser les principes actifs. La solution est ensuite transférée dans le flacon contenant la phase huileuse et le tube Eppendorf est rincé 3 fois par la solution de solubilisation afin d'éviter les pertes. La durée d'évaporation des solvants organiques est rallongée à 20 minutes afin d'éviter toute trace de solvants dans les formulations destinées à l'application chez l'animal.

Le taux de charge est calculé comme défini dans l'équation ci-dessous.

$$\text{Taux de charge (\%)} = \frac{\text{Masse de principe actif pesé} * 100}{\text{Masse totale des composants des nanoparticules}}$$

*Équation II-1 : Calcul du taux de charge en principe actif des nanoparticules*

Principe actif	Solubilisation
Treprostinil	75 % de dichlorométhane/25 % de Méthanol
ACT-333679	75 % de dichlorométhane/25 % de Méthanol
Cinaciguat	75 % de dichlorométhane/25 % de Méthanol
Riociguat	75 % de dichlorométhane/25 % de Méthanol
Tadalafil	90 % de dichlorométhane/10 % de Méthanol
Sildenafil	90 % de dichlorométhane/10 % de Méthanol

Tableau II.7 : Solubilisation des principes actifs dans la phase huileuse des Lipidots.

### Analyse de taille par diffusion dynamique de la lumière (DLS).

La taille des nanoparticules est un important facteur à caractériser. Une modification de la taille peut avoir des conséquences sur la stabilité de la formulation, le relargage de principe actif, ou l'interaction avec les tissus. La diffusion dynamique de la lumière (appelée DLS pour Dynamic Light Scattering) est la technique la plus utilisée pour caractériser la taille de particules. L'appareil envoie un faisceau laser (633 nm) et les particules en solution, plus petites que la longueur d'onde du faisceau, diffusent la lumière incidente dans toutes les directions (diffusion de Rayleigh). Cette lumière diffusée va fluctuer en fonction du mouvement brownien de ces particules et donc de leur taille. Ainsi la fluctuation de cette intensité (scattering) permet de calculer le coefficient de diffusion ( $D_t$ ) et ensuite de remonter au rayon hydrodynamique ( $R_h$ ) par l'équation de Stokes-Einstein (Équation II-2).<sup>15</sup> La mesure de taille par DLS nous permet également de mesurer la dispersité de l'échantillon (PDI pour polydispersity index) qui mesure l'hétérogénéité de la taille des nanoparticules en solution. Plus la valeur se rapproche de 0, plus l'échantillon est monodisperse et plus les particules présentent une différence de taille limitée.

$$D_t = \frac{k_B * T}{6 * \pi * \eta * R_H} \text{ avec } k_B = \text{Constante de Boltzmann}; T = \text{température}; \eta$$

= viscosité

Équation II-2 : Equation de Stokes-Einstein pour le calcul du diamètre hydrodynamique

Les mesures de tailles sont réalisées à l'aide d'un ZetaSizer NanoZS (Malvern). Le ZetaSizer utilise un laser 633 nm et mesure la lumière dispersée à un angle de 173°. La mesure de taille

est réalisée dans du PBS 1X avec une concentration en nanoparticules < 2mg/ml. Les résultats de taille fournis correspondent au diamètre moyen calculé avec la méthode des cumulants.

### Analyse du potentiel zêta par électrophorèse laser doppler (ELD).

Les particules en solution présentent une double couche électrique liée à la présence d'ions en solutions qui s'adsorbent par complexation ionique.<sup>15</sup> Un courant électrique est appliqué à une solution de nanoparticules, qui vont se déplacer en fonction de leur taille et de leur charge de surface. Plus les particules sont chargées, plus leur mobilité électrophorétique sera élevée et plus le shift doppler produit sera important. La mobilité électrophorétique  $\mu_e$  alors mesurée pourra être reliée au potentiel zêta  $\zeta$  par la formule de Smoluchowski (Équation II-3). Le potentiel zêta des formulations va être un marqueur de stabilité avec la taille des nanoparticules. Plus le potentiel zêta est important, plus les particules auront tendance à se répulser et rester en solution.

$$\zeta = \frac{4\pi\mu_e\eta}{\varepsilon}$$

Équation II-3 : Formule de Smoluchowski pour le calcul du potentiel zêta

Les mesures de potentiel zêta sont également réalisées à l'aide d'un ZetaSizer NanoZS (Malvern) à l'aide d'une cellule capillaire comportant deux électrodes en or. Pour la mesure du potentiel zêta, la solution de LNP est ajustée à 1 et 10 mM [NaCl] pour rendre la conductivité du milieu constante (soit environ 0,14 et 1,4 mS.m<sup>-1</sup> respectivement).

Type de nanoparticules	Taille (nm)	PDI	Potentiel Zéta 1mM (mV)	Potentiel Zéta 10 mM (mV)
C80	80	< 0.15	35	15
C35	35		35	15
N80	80		-20	-10
N50	50		-20	-10

Tableau II.8 : Caractéristiques des formulations de référence

### Mesure de l'efficacité d'encapsulation

La dialyse réalisée lors de la formulation permet l'élimination des composants non encapsulés dont les principes actifs comme montré dans la Figure II-3. Ainsi, il est possible de mesurer l'efficacité d'encapsulation en calculant le rapport entre concentration après dialyse et la

concentration avant dialyse. Les nanoparticules sont diluées dans un solvant organique (Méthanol ou Acétonitrile) afin de les détruire. Ensuite une centrifugation à température ambiante à 13 600 g pendant 10 minutes est réalisée afin d'éliminer les composants ayant précipités lors de cette étape de destruction avec un solvant organique tels que le PEG-stéarate. Le surnageant est ensuite récupéré pour calculer l'efficacité d'encapsulation (EE, Équation II-4).

$$\text{Efficacité d'encapsulation (EE) (\%)} = \frac{100 * \text{Concentration post - Dialyse}}{\text{Concentration pré - Dialyse}}$$

Équation II-4 : Calcul de l'efficacité d'encapsulation

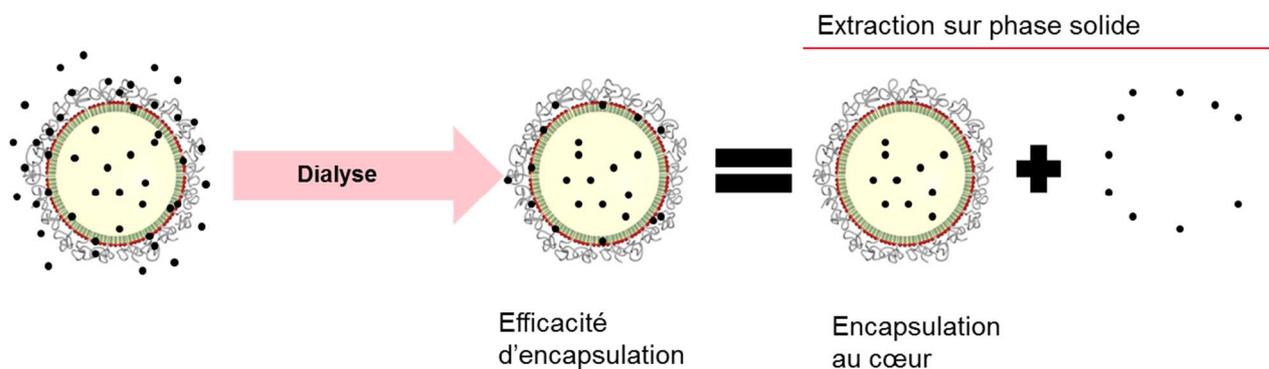


Figure II-3 : Schéma d'évaluation de l'efficacité d'encapsulation par dialyse et de l'encapsulation au cœur des nanoparticules par extraction sur phase solide.

### Mesure de l'encapsulation dans le cœur des nanoparticules par Extraction sur Phase Solide (SPE)

La mesure de l'efficacité d'encapsulation ne permet pas d'obtenir des indications sur la localisation des principes actifs dans les nanoparticules mais seulement la quantité présente après dialyse. Ainsi nous utilisons l'extraction sur phase solide pour déterminer la localisation du principe actif dans les nanoparticules.<sup>16</sup> Le principe de base est de faire passer les échantillons dans une colonne garnie d'une phase stationnaire sur laquelle les particules ne sont pas retenues tandis que les principes actifs liés à la surface et pouvant interagir avec la résine s'adsorbent sur la phase inverse stationnaire par interactions hydrophobes (voir Figure II-4).

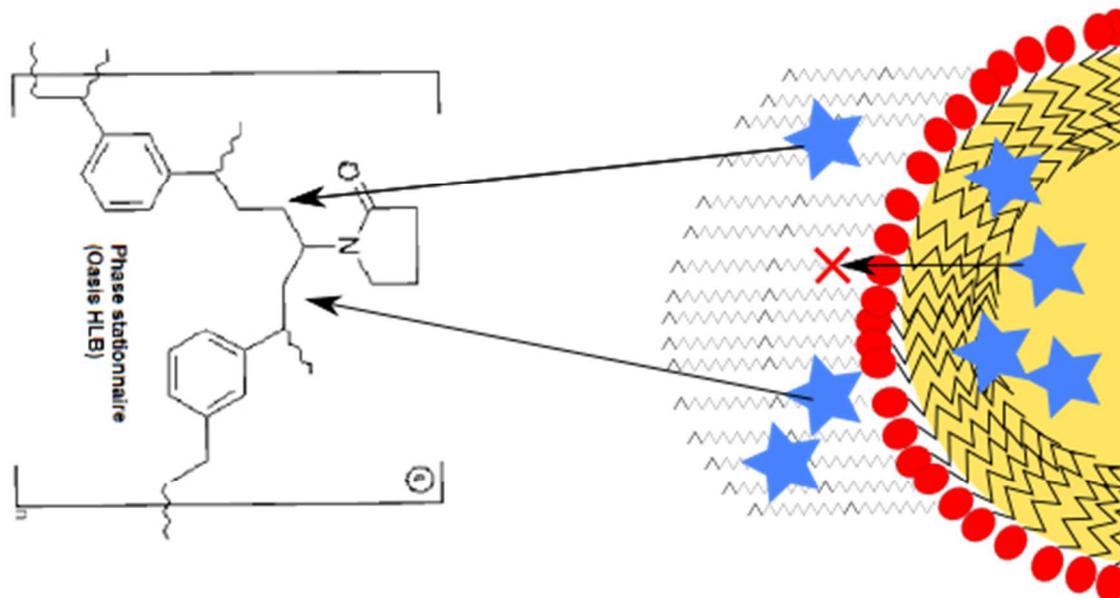


Figure II-4 : Principe de fonctionnement de l'extraction sur phase solide pour les nanoparticules. Le principe actif (étoile bleue) présent en surface des nanoparticules (ici en complexation dans les groupements PEGylés) interagissant plus facilement avec la phase inverse alors que le principe actif présent dans les nanoparticules (cœur) n'a pas de contact possible avec la phase solide et est élué dans la première fraction avec les nanoparticules intactes.

Nous utilisons ainsi des colonnes Oasis HLB composées de 150 mg de polymère (divinylbenzène et vinyl pyrrolidinone) avec une taille de particule de 60  $\mu\text{m}$  et de pore de 80  $\text{\AA}$  (Waters, UK). Le flux d'éluant est produit par une pression négative appliquée de 5 mmHg. Avant le dépôt de l'échantillon, les colonnes sont conditionnées avec du méthanol (2 x 4 ml) et équilibrées avec du PBS 1X (1 x 4 ml). La fraction totale (FT) est déposée et rincée avec 3,5 ml de PBS 1X pour récupérer les nanoparticules avec les principes actifs encapsulés (Fraction F1). L'élué des principes actifs de surface est réalisée avec 4,5 ml de MeOH. Les fractions F1 et F2 sont récupérées dans des fioles jaugées de 5 ml et mises à niveau avec leurs solvants respectifs. Les fractions peuvent être ainsi évaluées en HPLC après destruction des nanoparticules par dilution avec du MeOH. L'extraction est considérée comme correcte lorsque la somme de la fraction F1 + F2 est égale à la fraction FT.

## Quantification en principe actif par HPLC

La quantification de la concentration en principe actif dans les Lipidots a été réalisée par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC) sur un module de séparation Waters 2693 et une colonne en phase inverse Xterra (RP-C<sub>18</sub>, 5 µm x 150mm x 4.6mm, Waters, UK). Les principes actifs sont détectés en UV par un module Waters 2487. Les méthodes analytiques ont été développées afin d'obtenir une gamme de linéarité dans la gamme de concentration de 1 à 10 µg/ml. Lors de chaque quantification, une nouvelle gamme étalon est préparée avec au minimum 5 points sur la gamme de concentration recherchée. Les méthodes utilisées sont résumés dans le Tableau II.9 ci-dessous.

Principe actif	Longueur d'onde de détection (nm)	Temps de rétention (min)	Elution	Solvant A	Solvant B
<b>Treprostinil</b>	277	4,5	Isocratique 1 ml/min 50%A/50 % B	ACN + 0,1 % TFA (v/v)	EMQ + 0,1 % TFA (v/v)
<b>ACT-333679</b>	298	8	Isocratique 1 ml/min 50%A/50 % B	ACN + 0,1 % TFA (v/v)	EMQ + 0,1 % TFA (v/v)
<b>Cinaciguat</b>	271	5.4	Isocratique 1 ml/min 50%A/50 % B	ACN + 0,1 % TFA (v/v)	EMQ + 0,1 % TFA (v/v)
<b>Riociguat</b>	212	6,1	Isocratique 1 ml/min 35%A/65 % B	ACN	H <sub>2</sub> P0 <sub>4</sub> 10mM (ph ~ 6,4)
<b>Sildenafil</b>	291	6,0	Isocratique 1 ml/min 30%A/70 % B	ACN + 0,1 % TFA (v/v)	EMQ + 0,1 % TFA (v/v)
<b>Tadalafil</b>	298	5,7	Isocratique 1 ml/min 40%A/60 % B	ACN + 0,1 % TFA (v/v)	EMQ + 0,1 % TFA (v/v)

Tableau II.9 : Méthodes HPLC réalisés pour la quantification de la concentration en principes actifs dans les nanoparticules.

### c) Tréprostinil

Les premiers tests d'encapsulation du treprostinil ont montré que l'encapsulation du tréprostinil était stable sur 3 mois dans les nanoparticules cationiques avec un taux de charge de 1.5% et une efficacité d'encapsulation de 90% de alors que l'encapsulation n'était pas possible dans les

nanoparticules neutres avec 70% de perte lors de la dialyse et une encapsulation au cœur des nanoparticules de 0%. L'encapsulation du tréprostinil dans les nanoparticules cationiques était également limitée à la membrane avec une encapsulation au cœur d'environ 30%. De nouvelles formulations ont été réalisées afin d'obtenir des résultats de stabilité dans le temps avec un taux de charge augmenté à 3 % et 5 %.

Tableau II.10 : Caractéristiques d'encapsulation des nanoparticules encapsulant le tréprostinil

Nom formulation	Type de nanoparticules*	Taille (nm)*	PDI***	Taux de charge initial***	Efficacité d'encapsulation \$	Taux de charge effectif \$\$	Encapsulation Cœur\$\$\$
TRE 1	C35	34	0.139	3 %	80	2.4 %	38 %
TRE 2	C80	70	0.121	3 %	77	2.3 %	31 %
TRE 3	C35	36	0.132	5 %	82	4 %	45 %

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* taille obtenue mesurée par DLS

\*\*\* polydispersité mesurée par DLS

\*\*\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composés

\$ Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport à avant dialyse

\$\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

On observe dans le Tableau II.10 une bonne encapsulation à un taux de charge de 3% et 5% sans modification des propriétés des nanoparticules. Lorsque le taux de charge est augmenté à 5% (formulation TRE 3), les résultats d'encapsulation sont comparables.

La Figure II-5 montre la bonne stabilité des nanoparticules en termes d'encapsulation. Les données de stabilité colloïdale (taille, zêta) ne sont pas affichées car manquantes en fonction des formulations.

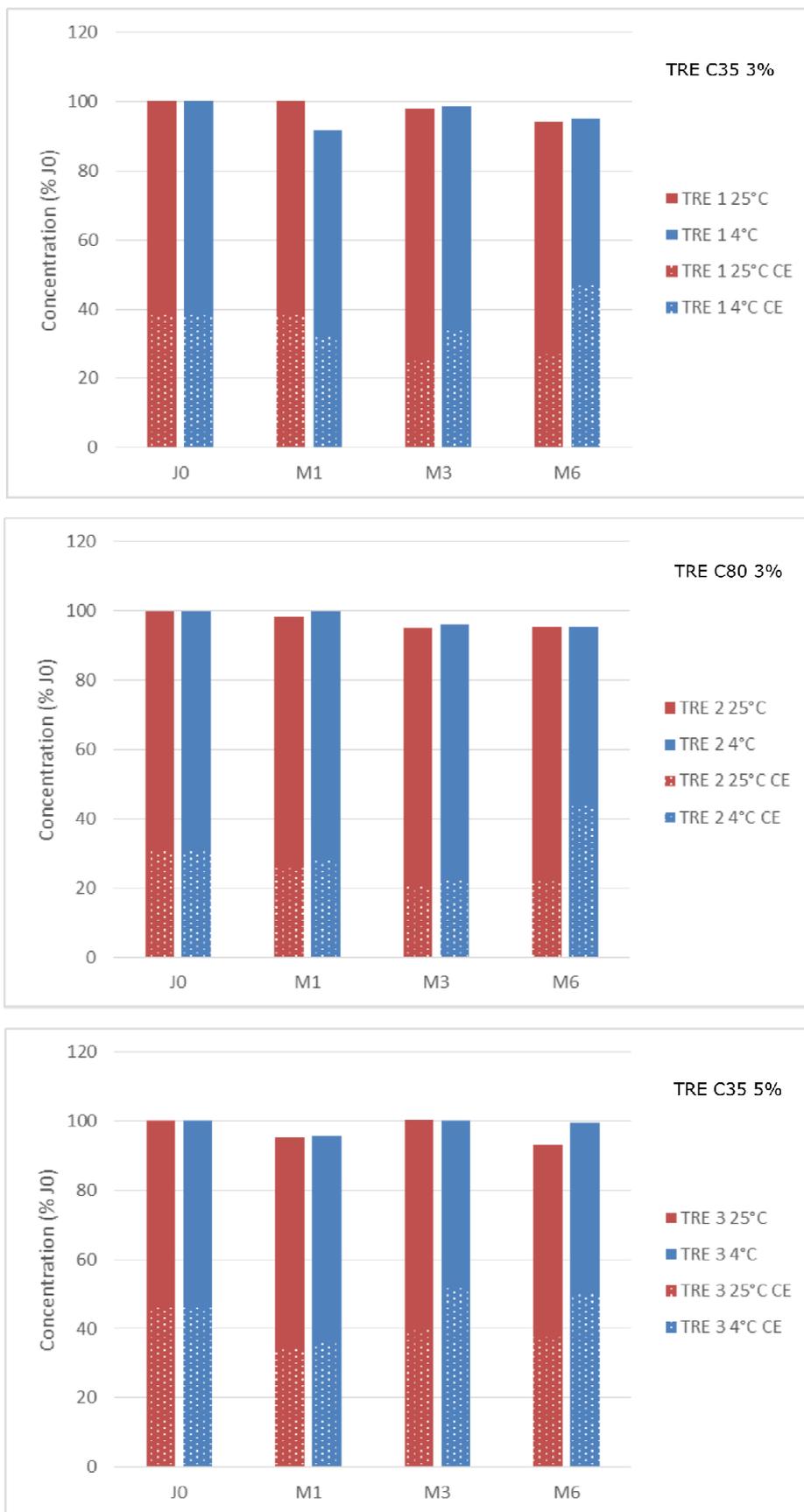


Figure II-5 : Résultats de stabilité d'encapsulation du tréprostiniil. Les valeurs en pointillés représentent l'encapsulation au niveau du cœur des nanoparticules.

d) ACT-333679

L'ACT-333679 possède une structure propice à l'encapsulation dans des nanoparticules lipidiques avec une longue chaîne aliphatique. Comme le tréprostinil, il possède un groupement carboxyl qui doit théoriquement lui permettre d'être encapsulé dans les nanoparticules cationiques grâce à une potentielle stabilisation de l'encapsulation par interaction ionique.

Des nanoparticules ont été formulées avec un taux de charge de 1.5%. Les premières formulations sont décrites dans le Tableau II.11. En comparant aux caractéristiques classiques des formulations, nous n'observons aucune différence de taille et de polydispersité (PDI) lorsque nous encapsulons l'ACT-333679 dans les différentes formulations testées. Les résultats de l'encapsulation sont présents dans le Tableau II.12.

Tableau II.11 : Caractéristiques des nanoparticules encapsulant l'ACT-333679 à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules*	Taux de charge**	Taille (nm)***	PDI \$	Potentiel Zêta 1mM (mV) \$\$	Potentiel Zêta 10 mM (mV) \$\$
ACT 1	C35	1.5%	36	0.138	21.8	12.7
ACT 2	N80		79	0.154	- 24.2	- 10.7
ACT 3	C80		74	0.130	26.5	13.4

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composés des nanoparticules

\*\*\* diamètre moyen obtenu mesuré par DLS

\$ polydispersité mesurée par DLS

\$\$ Potentiel zéta mesuré par ELD à 1mM et 10mM de Na<sup>+</sup>

Tableau II.12 : Caractéristiques d'encapsulation des nanoparticules encapsulant l'ACT-333679 à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules *	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$	Encapsulation Cœur (%) \$\$
ACT 1	C35	1.5%	86	1.29	72
ACT 2	C80		76	1.15	36
ACT 3	N80		82	1.23	71

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport à avant dialyse

\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

Par comparaison aux résultats du tréprostinil, on observe que l'encapsulation est possible également dans les formulations neutres. Il existe par contre des différences majeures en termes d'efficacité d'encapsulation avec une meilleure efficacité d'encapsulation ainsi qu'une meilleure répartition du principe actif au niveau du cœur des nanoparticules pour les formulations cationiques. A partir de ces résultats, nous avons augmenté les taux de charge des nanoparticules afin d'évaluer la capacité d'encapsulation de nanoparticules cationiques de taille théorique 35 et 80 nm et des neutres de taille théorique 80 nm. Ces résultats sont présentés dans le Tableau II.13

Tableau II.13 : Caractéristiques d'encapsulation de formulations additionnelles pour l'ACT-333679

Nom formulation	Type de nanoparticules **	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$	Encapsulation Cœur (%) \$\$
ACT 4	C35	3%	97	2.91	66
ACT 5	C35	5%	90	4.5	68
ACT 6	C80	5%	80	4	60
ACT 9	N80	3%	20	0.6	30

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

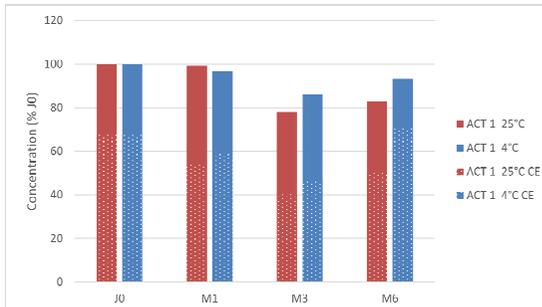
\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

Pour les formulations cationiques, on retrouve une capacité d'encapsulation élevée. Par contre, l'encapsulation dans les nanoparticules neutre est limitée. On observe que la formulation ACT 9 (N80 chargées à 3%) présente un taux de charge limité effectif limité à 0.6% soit plus faible que la formulation ACT 3. On observe que lorsque l'on surcharge une formulation, on peut atteindre un taux de charge effectif plus faible par rapport à des formulations moins chargées. Ce phénomène implique probablement une déstabilisation des nanoparticules.

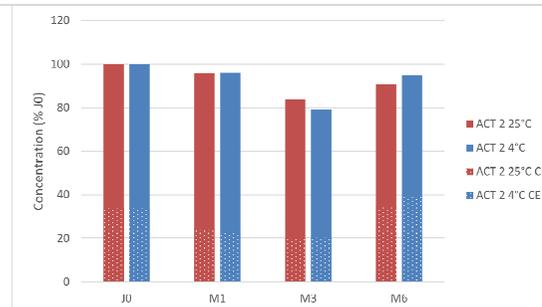
Les formulations ont donc été suivies pendant plusieurs mois à température ambiante et à 4°C afin d'évaluer leur stabilité sur les paramètres de taille, de charge et de taux d'encapsulation au cœur. Les résultats de ce suivi de stabilité sont présentés dans les Figure II-6 et Figure II-7.

Encapsulation

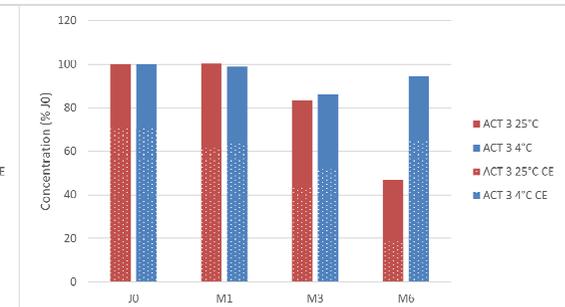
ACT 1 - C35-1.5%



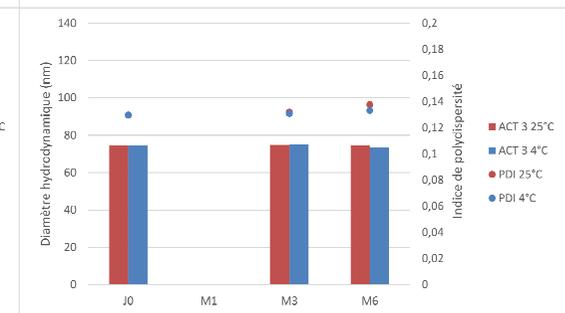
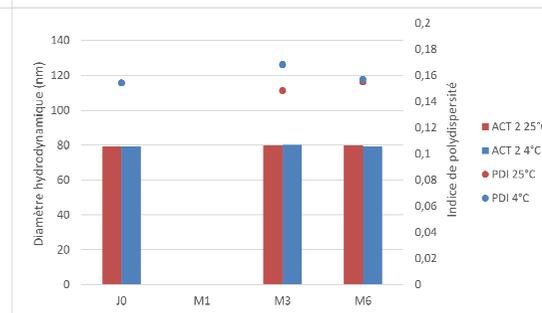
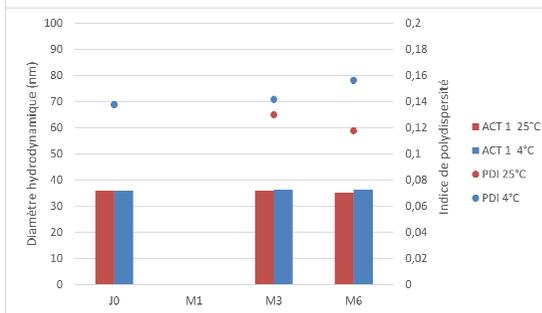
ACT 2 - N80-1.5%



ACT 3 - C80-1.5%



Taille et PDI



Potentiel Zeta

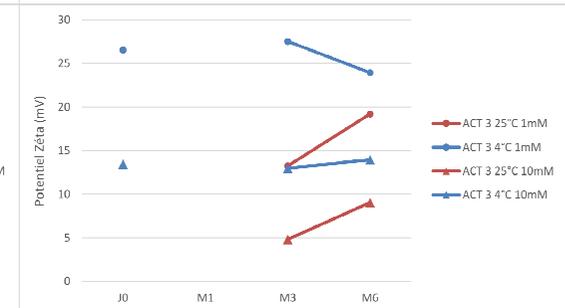
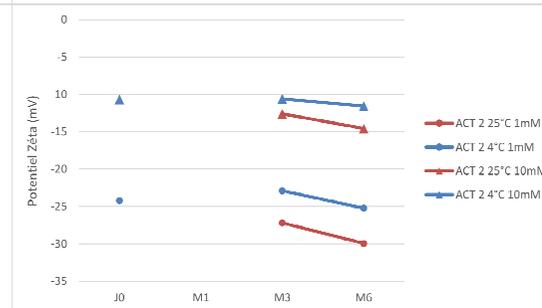
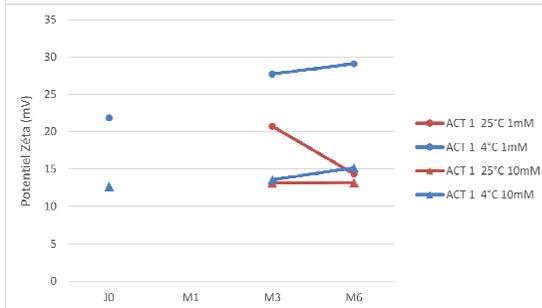


Figure II-6 : Stabilité des nanoparticules encapsulant l'ACT-333679 à un taux de charge de 1.5%. Les données d'encapsulation au cœur sont présentées en pointillés dans les barres d'encapsulation totales.

Encapsulation

Taille et PDI

Potentiel Zeta

ACT 4 - C35 3%

ACT 5 - C35 5%

ACT 6 - C80 5%

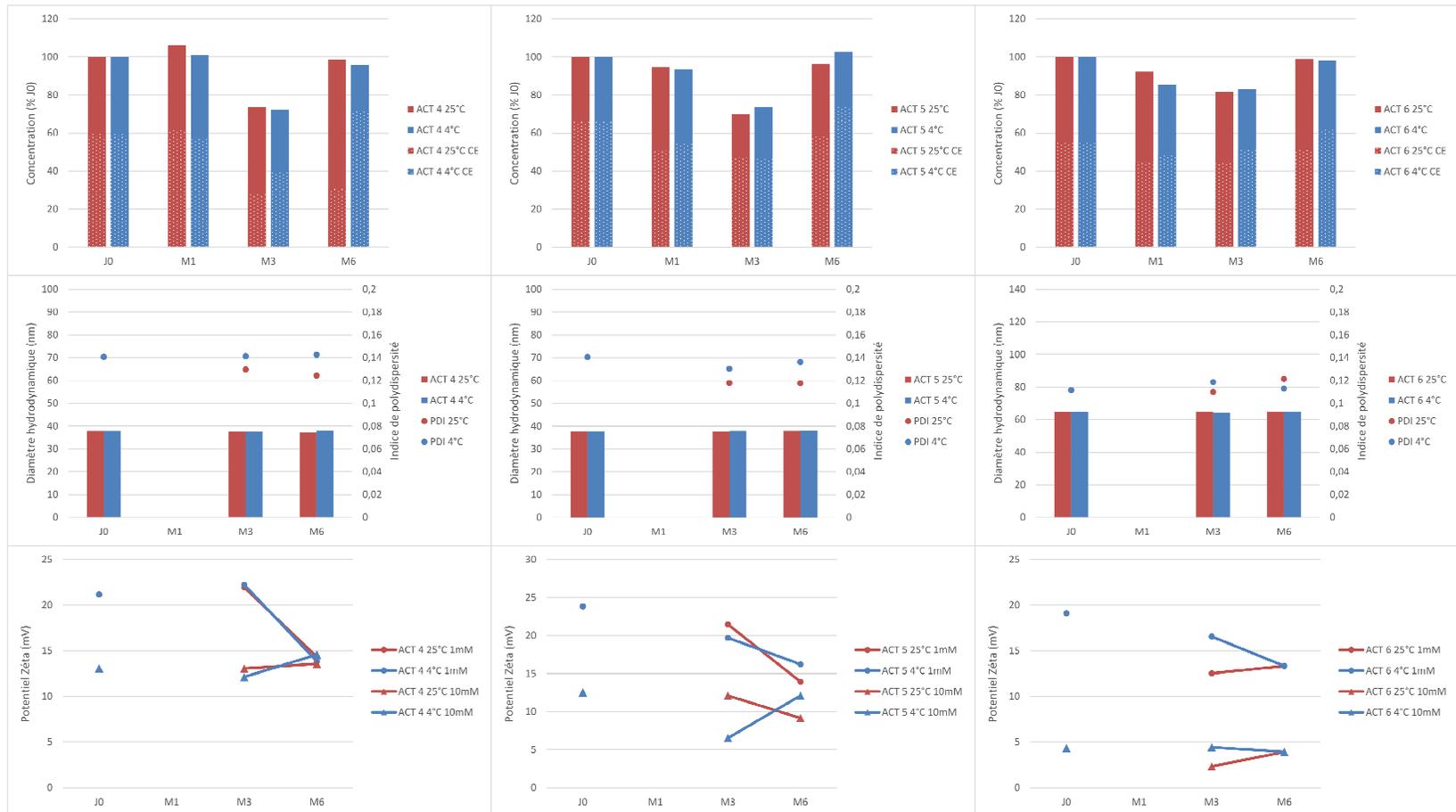


Figure II-7 : Stabilité des nanoparticules encapsulant l'ACT-333679 à un taux de charge de 3 et 5%. Les données d'encapsulation au cœur sont présentées en pointillés dans les barres d'encapsulation totale.

Les résultats précédents montrent que l'encapsulation de l'ACT-333679 est stable sur 6 mois dans les deux types de nanoparticules. Nous pouvons alors retenir ce principe actif comme candidat. Concernant les nanoparticules neutres, nous sommes limités en termes de taux de charge mais il semble important de pouvoir évaluer l'effet de ces traitements sur différents types de nanoparticules pour évaluer l'effet vecteur.

### e) Riociguat

Le riociguat est une molécule dont la structure diffère de celle des analogues de la prostacycline très lipidiques. Le Tableau II.14 résume les caractéristiques des formulations testées.

Tableau II.14 : Caractéristiques de formulation des nanoparticules encapsulant le Riociguat à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules *	Taux de charge **	Taille (nm) ***	PDI \$	Potentiel Zéta 1mM (mV) \$\$	Potentiel Zéta 10 mM (mV) \$\$
RIO 1	C35	1.5%	33	0.173	16.3	10.8
RIO 2	N80		81	0.160	- 16.6	- 5.4
RIO 3	C80		74	0.125	21.4	11.4

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composés des nanoparticules

\*\*\* taille obtenue mesurée par DLS

\$ Polydispersité mesurée par DLS

\$\$ Potentiel Zéta mesuré par ELD à 1mM et 10mM de Na<sup>+</sup>

Tableau II.15 : Caractéristiques d'encapsulation des nanoparticules encapsulant le Riociguat à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules **	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$	Encapsulation Cœur (%) \$\$
RIO 1	C35	1.5%	30	0.45	7
RIO 2	N80		12	0.18	11
RIO 3	C80		12	0.18	11

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport à avant dialyse

\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

La capacité d'encapsulation du riociguat est médiocre dans les différents types de nanoparticules testées à un taux de charge initial de 1.5%. Pour l'expliquer, une hypothèse est

que le riociguat ne possède pas de longues chaînes aliphatiques qui sont des caractéristiques favorisant l'encapsulation dans les nanoparticules lipidiques.

J'ai modifié certains paramètres comme le taux de charge initial et la composition des nanoparticules afin d'évaluer si la modification de la composition du cœur permettrait d'augmenter l'encapsulation en principe actif. En partant des formulations N80, nous avons réalisés 2 formulations (Tableau II.16). L'augmentation du pourcentage de cire dans le cœur des formulations N80 semble avoir augmenté le taux de charge effectif du Riociguat mais nous n'avons pas réalisé de SPE pour évaluer l'encapsulation au cœur des nanoparticules car le taux de charge restait limité.

Tableau II.16 : Formulations additionnelles pour le Riociguat

Nom de la formulation	Type de nanoparticules *	Modification du cœur	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$
RIO 4	N80	75% Cire	1%	32.2	0.32
RIO 5		25% Cire + 75% Huile d'olive		17.6	0.18

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\*  $\text{masse de principe actif} \times 100 / \text{masse des composés des nanoparticules}$

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$  $\text{Taux de charge initial} \times \text{Efficacité d'encapsulation}$

Du fait de ces résultats peu favorables, nous avons ainsi décidé d'interrompre la nanoencapsulation du riociguat. Nous avons envisagé les analogues de la même classe thérapeutique (voir Figure II-8). On retrouve ainsi deux types de structures chimiques (indazole et aryl-acrylamide). La sélection des stimulateurs avec une structure chimique de type aryl-acrylamide (A-350619 par exemple) aurait pu être intéressante mais nous ne les avons pas testés lors de la thèse.

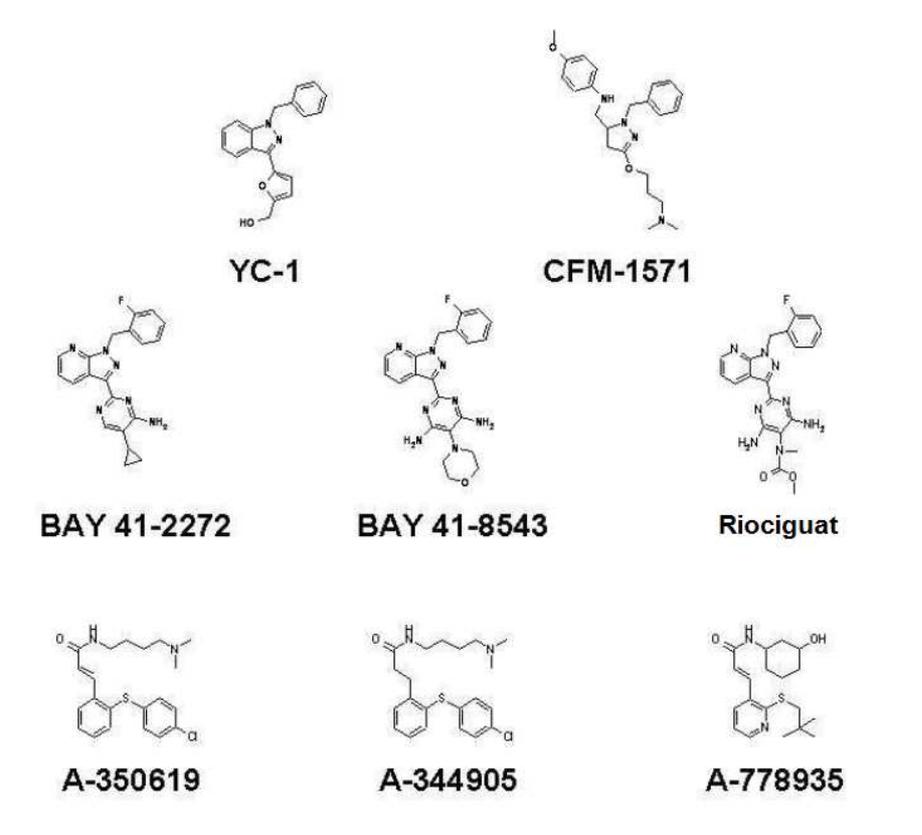


Figure II-8 : Structure physicochimique des stimulateurs de la guanylate cyclase (adapté de <sup>17</sup>)

#### f) Cinaciguat

Le Cinaciguat présente de longues chaînes aliphatiques qui sont bénéfiques pour l'encapsulation dans des nanoparticules lipidiques comme suggéré avec le tréprostinil et l'ACT-333679. Les premières formulations sont résumées dans le tableau Tableau II.17. On n'observe aucune modification des paramètres de taille des nanoparticules. Par contre en termes d'encapsulation, le Cinaciguat n'est pas encapsulé dans les nanoparticules neutres comme affiché dans le Tableau II.18. De plus, l'encapsulation est plus importante au niveau du cœur des nanoparticules par rapport au tréprostinil (60% vs 30%).

Après ces résultats, nous avons décidé une augmentation du taux de charge des nanoparticules pour les formulations cationiques à 3% puis 5%. Ces augmentations n'ont été testées que sur les formulations C35 et sont résumées dans le Tableau II.19.

Tableau II.17 : Caractéristiques de formulation des nanoparticules encapsulant le Cinaciguat à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules*	Taux de charge**	Taille (nm)***	PDI \$	Potentiel Zéta 1mM (mV) \$\$	Potentiel Zéta 10 mM (mV) \$\$
CINA 1	C35	1.5%	35	0.118	19.1	11
CINA 2	N50		55	0.162	-17.3	-6.8

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composés des nanoparticules

\*\*\* taille obtenue mesurée par DLS

\$ Polydispersité mesurée par DLS

\$\$ Potentiel zéta mesuré par ELD à 1mM et 10mM de Na<sup>+</sup>

Tableau II.18 : Caractéristiques d'encapsulation des nanoparticules encapsulant le Cinaciguat à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules *	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$	Encapsulation Cœur (%) \$\$
CINA 1	C35	1.5%	82	1.2	65
CINA 2	F50		0%	0	0

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

Tableau II.19 : Augmentation du taux de charge des formulations Cinaciguat

Nom formulation	Type de nanoparticules *	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$	Encapsulation Cœur (%) \$\$
CINA 3	C35	3%	100%	3 %	61
CINA 4	C35	5%	91%	4.6 %	56

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

Ces résultats indiquent une excellente encapsulation du cinaciguat. Les résultats de stabilité présentés dans la Figure II-9 montrent toutefois que les formulations chargées à 5% (CINA 4) ne sont pas stables.

Après examen plus précis des résultats de formulations et d'encapsulation, on retrouve pour les formulations cationiques des pertes de cinaciguat qui se réalisent pendant la phase de

préparation avant la dialyse comme indiqué dans le Tableau II.20 et qui n'étaient pas prises en compte lors du calcul de rendement d'encapsulation puisque l'on compare alors la concentration de PA avant et après dialyse.

Tableau II.20 : Pertes de cinaciguat lors de la formulation

Nom de la formulation	Type de nanoparticules *	Taux de charge initial théorique (%) **	Perte lors de la formulation (%) ***	Taux de charge initial réel (%) \$	Efficacité d'encapsulation (%) \$\$	Taux de charge effectif (%) \$\$\$
CINA 1	C35	1.5 %	14%	1.29 %	82	1.1
CINA 3	C35	3 %	33%	2.01 %	100	2.01
CINA 4	C35	5 %	36%	3.2 %	91	2.9
CINA 5	F80	1.5 %	9%	1.37 %	0	0

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* Perte en principe actif lors de la sonication des nanoparticules

\$ (100- Pertes lors de la formulation) x Taux de charge initial théorique

\$\$ Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$\$\$ Taux de charge initial réel x Efficacité d'encapsulation

Encapsulation

Taille et PDI

Potentiel Zeta

CINA 1 - C35 1.5%

CINA 2 - C35 3%

CINA 3 - C35 5%

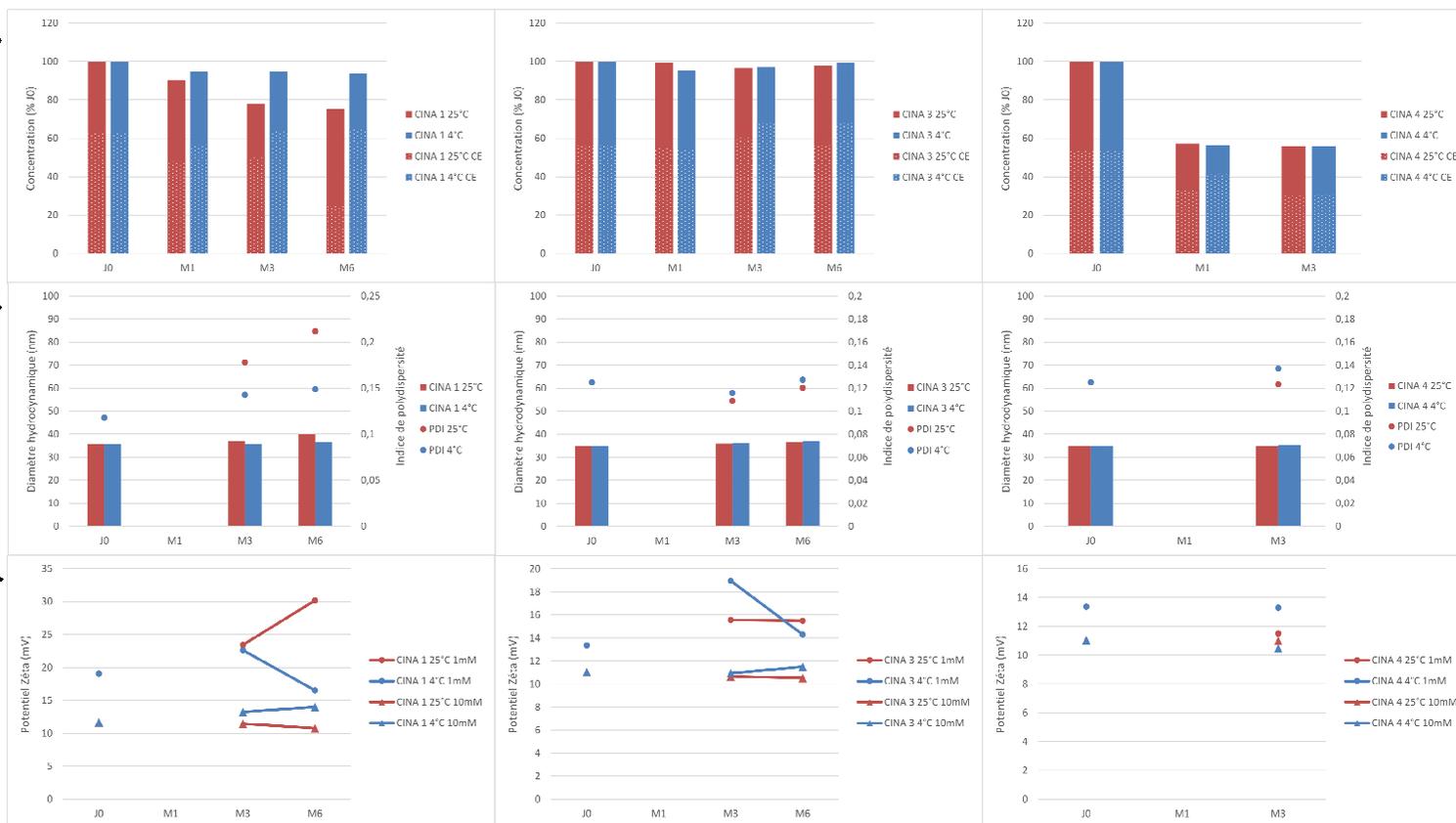


Figure II-9 : Stabilité des formulations de nanoparticules C35 encapsulant le cinaciguat à des taux de charges allant de 1.5 % à 5%. Les données d'encapsulations au cœur sont présentées en pointillés dans les barres d'encapsulation totale.

Nom de la formulation	Type de nanoparticules *	Modification	Observations	Taux de charge initial théorique (%) **	% restant après formulation ***	Taux de charge initial réel (%) \$	Efficacité d'encapsulation (%) \$\$	Taux de charge effectif (%) \$\$\$
CINA 7	C80	Test C80/vs C35	Dépôt	3	75	2.25	87	1.96
CINA 8	C80	Diminution Taux de charge	Dépôt	2	66	1.32	X	X
CINA 9	N80	Autre type d'huile (Eldew)	Mauvais aspect formulation	2	ND	ND	X	X
CINA 10	C80	Diminution Taux de charge	Dépôt	1.5	76	1.14	X	X
CINA 11	C80	↑ T 65°C + Diminution Taux de charge (au taux de charge réel de CINA 10).	Dépôt	1.14	80	0.91	90	0.82
CINA 12	C80	Phase aqueuse pH 2	Moins de précipité mais toujours présent	1.3	72	0.94	82	0.77
CINA 13	C80	Solubilisation dans Acétone	Mauvais aspect	1.6	81	1.3	93	1.21
CINA 14	C80	T 65°C + Solubilisation longue	Dépôt	1.5	87	1.3	75	0.98
CINA 15	C80	5% Cire	Dépôt +	1.6	80	1.28	80	1.02

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\*\*\* 100-Perte en principe actif lors de la sonication des nanoparticules

\$ (100- Pertes lors de la formulation) x Taux de charge initial théorique

\$\$ Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$\$\$ Taux de charge initial réel x Efficacité d'encapsulation

*Tableau II.21 : Essais d'amélioration de la formulation du Cinaciguat dans les nanoparticules cationiques.*

On observe une forte perte de cinaciguat lors de la préparation de formulations cationiques qui se caractérise par un dépôt blanchâtre sur les parois du flacon, ce dépôt n'étant pas présent sur les formulations neutres. L'hypothèse la plus probable est une complexation ionique entre le cinaciguat et les phospholipides chargés positivement. Plusieurs tests ont été réalisés afin de diminuer la présence de ce dépôt notamment une augmentation de la température de solubilisation et de sonication ainsi qu'une formulation à pH 2 (pour diminuer la présence du complexe par protonation des groupements carboxyl du Cinaciguat). Les tests réalisés sont résumés dans le Tableau II.21.

Aucune des formulations cationiques testées n'a permis de diminuer la présence du dépôt. Nous avons donc choisi d'interrompre le développement des nanoparticules chargées de cinaciguat dans l'attente des résultats des autres principes actifs plus prometteurs. Il existe également d'autres activateurs de la guanylate cyclase (Figure II-10). Le BAY 60-2770 possède une structure similaire au cinaciguat alors que le HMR 1776 et S-3448 sont structurellement différents. Nous ne les avons pas testés durant cette thèse.

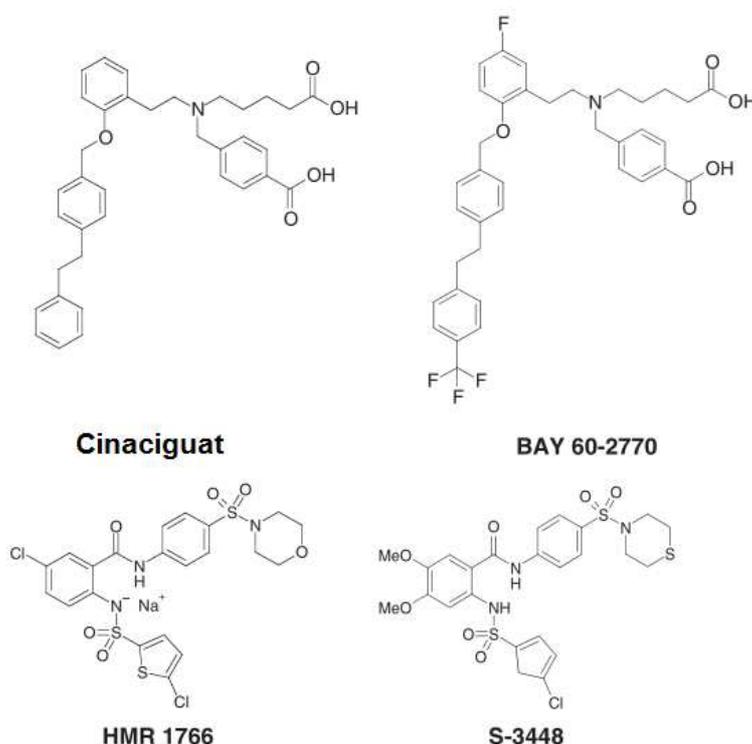


Figure II-10 : Structure physicochimique des activateurs de la guanylate cyclase (adapté de <sup>18</sup>)

*g) Tadalafil*

Le Tadalafil est un inhibiteur de phosphodiesterase qui a déjà été encapsulé dans des nanoparticules lipidiques dans la littérature <sup>13</sup>. Il présente une structure similaire au Riociguat avec beaucoup de cycles aromatiques sans longues chaînes aliphatiques. Les premières formulations réalisées ont démontré que ce principe actif était totalement incompatible avec les formulations de Lipidots. En effet, après formulation, au lieu de retrouver une dispersion limpide, on obtient une dispersion avec un aspect laiteux donc polydisperse comme montré dans le Tableau II.22 et la Figure II-11.

*Tableau II.22 : Caractéristiques de formulation et d'encapsulation des nanoparticules encapsulant le Tadalafil. Les mesures de tailles ont été réalisées avant la dialyse.*

NOM	Type de nanoparticules *	Cœur **	Taux de charge (%) ***	Taille (nm) \$	PDI \$\$	Efficacité d'encapsulation (%) \$\$\$	Taux de charge effectif (%) £	Encapsulation Cœur (%) ££
TAD 1	C35	25% Cire	1.5%	Formulation non réussie				
TAD 2	N50	25% Cire		70	0.358	24	0.36	11
TAD 3	N50	50% Cire		73	0.416	22	0.33	14
TAD 4	N50	75% Cire		79	0.5	23	0.35	11
TAD 5	N50	5% Cire		ND	ND	29	0.44	ND

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* Ratio lipidique du cœur des formulations

\*\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\$ Taille obtenue mesurée par DLS

\$\$ Polydispersité mesurée par DLS

\$\$\$ Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

£ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

££ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

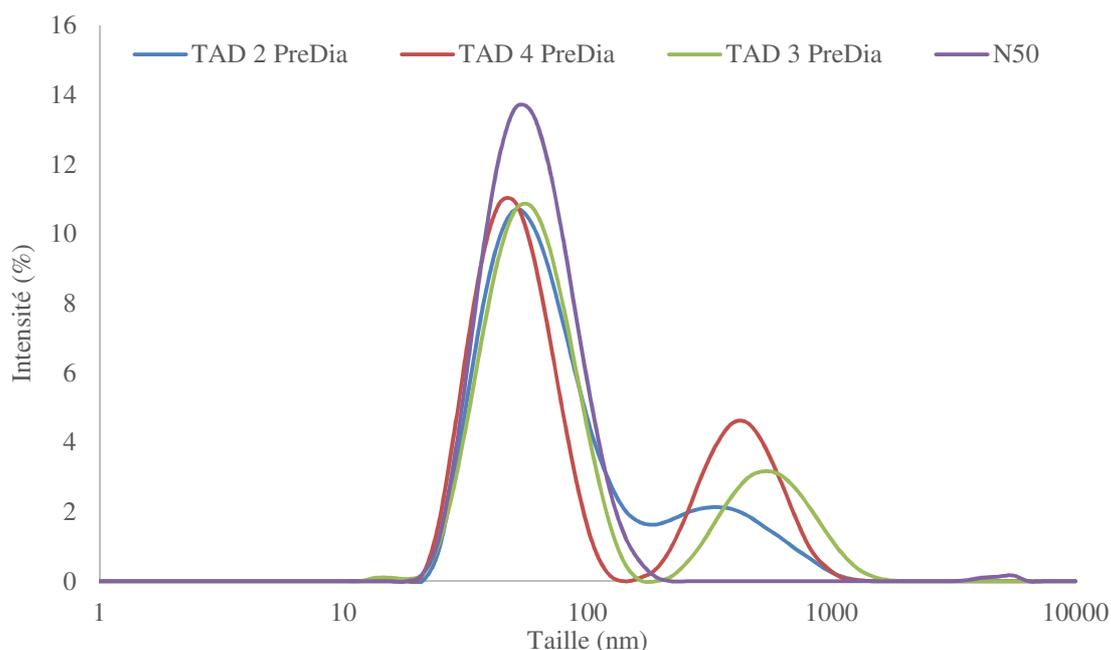


Figure II-11 : Taille des nanoparticules Tadalafil. Pour les formulations contenant du Tadalafil, on retrouve deux populations de nanoparticules à 50 et 500 nm indiquant la déstabilisation des nanoparticules.

Dans l'article de Baek et al, la solubilité était faible dans l'huile de soja avec une concentration maximale de 1.12% et la solubilité était maximale de 1.98% dans de l'huile d'olive (m/m) <sup>13</sup>. Comme la plupart des principes actifs, la solubilité était également plus faible dans les différents lipides solides testés. En calculant par rapport à nos formulations, la concentration du Tadalafil par rapport à la phase huileuse était de 13%, 6.6%, 4.4% et 3.5% pour les formulations TAD 2 à 5 respectivement. Une formulation avec une saturation maximale de l'huile (1.1%) aurait un taux de charge de 0.43 % soit proche des résultats de taux de charge effectif retrouvé pour les formulations confirmant ainsi les résultats de l'article de Baek et al. Nous avons décidé d'abandonner le Tadalafil du fait de la grande quantité d'expériences nécessaires pour modifier le type d'huile et/ou de surfactant des nanoparticules et de les tester.

#### *h) Sildénafil*

Le Sildénafil est un inhibiteur de phosphodiesterase qui a déjà été encapsulé dans des nanoparticules lipidiques dans la littérature <sup>12</sup>. Sa structure physicochimique est également très différente de celle du Tadalafil. Malgré cela, son encapsulation semblait difficile à cause de sa structure physicochimique similaire au Riociguat avec des cycles aromatiques. Pour les premières formulations (1 à 3), nous sommes partis sur des formulations neutres à cause du faible rationnel de l'utilisation de formulations cationiques (pas d'interaction ionique possible entre les tensio-actifs de la couronne et le Sildénafil). Nous avons fait varier la composition en

cire dans le cœur du classique 25% à 75%. Comme montré dans le Tableau II.23, l'encapsulation du Sildénafil dans des nanoparticules neutres de 50 nm ne modifie pas les paramètres de taille des nanoparticules contrairement au Tadalafil.

Tableau II.23 : Caractéristiques de formulation des nanoparticules encapsulant le Sildénafil à un taux de charge de 1.5%.

Nom formulation	Type de nanoparticules *	Cœur **	Taux de charge (%) ***	Taille (nm)\$	PDI \$\$	Potentiel Zéta 1mM (mV) \$\$\$	Potentiel Zéta 10 mM (mV) \$\$
SILD 1	N50	25% Cire	1.5%	54	0.149	-13.2	-6.1
SILD 2	N50	50% Cire		49	0.149	- 12.4	-5.5
SILD 3	N50	75% Cire		47	0.149	- 11.4	-6.2

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* Ratio lipidique du cœur des formulations

\*\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composé des nanoparticules

\$ Taille obtenue mesurée par DLS

\$\$ Polydispersité mesurée par DLS

\$\$\$ Potentiel zéta mesuré par ELD à 1mM et 10mM de Na<sup>+</sup>

Tableau II.24 : Caractéristiques d'encapsulation des nanoparticules encapsulant le Sildénafil à un taux de charge de 1.5%.

Nom de la formulation	Type de nanoparticules *	Cœur **	Taux de charge initial (%) ***	Efficacité d'encapsulation (%) \$	Taux de charge effectif (%) \$\$	Encapsulation Cœur (%) \$\$\$
SILD 1	N50	25% Cire	1.5%	46	0.69	7
SILD 2	N50	50% Cire		44	0.66	8
SILD 3	N50	75% Cire		46	0.69	8

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* Ratio lipidique du cœur des formulations

\*\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composants des nanoparticules lipidiques

\$ Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

Comme montré dans le Tableau II.24, on observe une forte perte du principe actif dans les formulations neutres lors de la dialyse, supérieure à 50%. De plus, l'encapsulation mesurée par SPE est très faible démontrant ainsi la faible capacité d'encapsulation au cœur dans les Lipidots. Nous avons réalisé deux autres formulations pour évaluer l'encapsulation dans des

nanoparticules cationiques ainsi que l'impact de l'utilisation d'eau distillée comme phase dispersive et phase de dialyse. Comme montré dans le Tableau II.25, l'utilisation de nanoparticules cationiques ne modifie pas les paramètres d'encapsulation par rapport aux formulations neutres. L'utilisation d'eau distillée diminue le taux de charge effectif avec une perte de sildénafil encore plus importante (80%). En effet, la solubilité en solution est médiée selon le pH comme décrit dans l'article d'Elnaggar et al avec une solubilité maximale dans un tampon citrate (pH 5) due au groupement pipérazine (pKa 8.7).<sup>12</sup> Une meilleure encapsulation aurait pu être obtenue en utilisant une phase aqueuse basique (tampon bicarbonate) pour limiter l'ionisation du groupement pipérazine et donc diminuer encore la polarité du Sildénafil et ainsi favoriser au maximum son encapsulation. Nous avons cependant décidé d'abandonner le développement des nanoparticules chargées en sildénafil.

Tableau II.25 : Formulation additionnelles pour le Sildénafil

Nom de la formulation	Type de nanoparticules *	Modification du cœur	Taux de charge initial (%) **	Efficacité d'encapsulation (%) ***	Taux de charge effectif (%) \$	Encapsulation Cœur (%) \$\$
SILD 4	N50	Formulée dans l'eau distillée	1.5%	19	0.29	10
SILD 5	C80	Formulation cationique		46	0.69	6

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* masse de principe actif x 100 / masse des composé des nanoparticules

\*\*\* Pourcentage de principe actif restant après dialyse par rapport avant dialyse

\$ Taux de charge initial x Efficacité d'encapsulation

\$\$ Encapsulation au niveau du cœur mesurée par extraction sur phase solide

Concernant les autres inhibiteurs de PDE 5, ils possèdent tous une structure similaire soit au tadalafil ou au sildénafil comme montré dans la Figure II-12. Il semble ainsi peu intéressant d'évaluer l'encapsulation des autres molécules de cette classe.

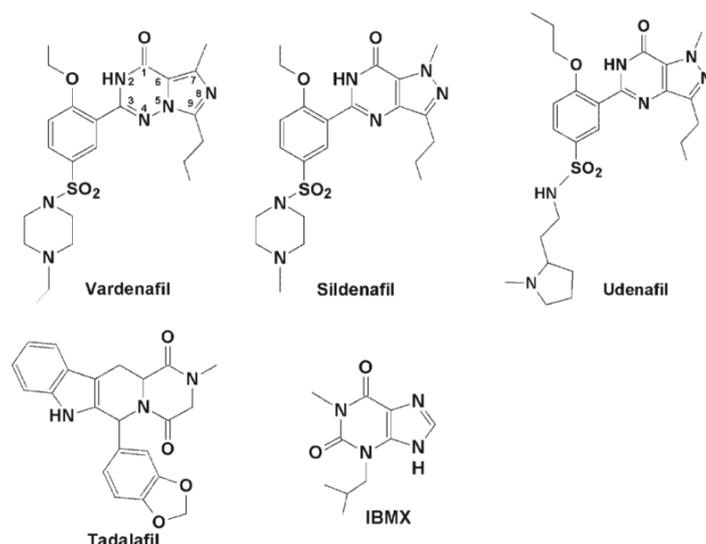


Figure II-12 : Structure physicochimiques des inhibiteurs de phosphodiésterases 5<sup>19</sup>

### *i) Conclusion de l'étude de screening*

Dans cette étude de screening, nous sommes partis de 6 principes actifs candidats issus de 3 classes thérapeutiques, testés dans de nombreux types de formulations, cationiques ou neutres. Nous avons pu ainsi déterminer 2 candidats très prometteurs en termes de capacité d'encapsulation totale, d'encapsulation au cœur et de stabilité à 6 mois: le tréprostinil encapsulé dans des nanoparticules cationiques et l'ACT-333679 encapsulé dans des nanoparticules cationiques et neutres. Le cinaciguat est gardé en candidat de réserve du fait des problèmes de formulations.

Principe actif	Nanoparticule	Taux de charge max	Pourcentage d'encapsulation au cœur
Tréprostinil	Cationiques	5%	30 %
ACT-333679	Cationiques	5%	60 %
	Neutres	1.2%	30 %
Cinaciguat	Cationiques	3%	60 %

Tableau II.26 : Tableau récapitulatif des résultats de la phase de screening

Cette phase de screening nous a permis d'évaluer plusieurs caractéristiques physicochimiques pour l'encapsulation dans nos vecteurs lipidiques. Ainsi il est facile d'obtenir l'encapsulation de principes actifs présentant des groupements aliphatiques longs car ceux-ci augmentent la solubilité dans la phase huileuse. L'utilisation de surfactants chargés permet également

d'augmenter leur encapsulation par rapport à une formulation neutre par le biais d'interactions ioniques. Comme montré par le Cinaciguat, cette complexation ionique n'est pas systématiquement bénéfique pour l'encapsulation. De plus, la complexation ionique provoque une diminution du potentiel zêta. Cette diminution pourrait provoquer une diminution de la stabilité des nanoparticules par diminution de la répulsion ionique. Nous avons cependant montré que nos nanoparticules restaient stables après un stockage 6 mois sans doute grâce à la répulsion stérique provoquée par le surfactant PEGylé. Ces résultats de stabilité colloïdale et d'encapsulation sont néanmoins à confirmer car une seule formulation a été suivie dans le temps afin de réduire les coûts associés à la formulation.

L'étape réalisée en parallèle de cette phase de screening a été le développement de gels de nanoparticules afin de permettre l'application facile sur des ulcères.

## B. Formulation de gels de nanoparticules pour application topique

### 1. Stratégie de formulation

L'application directe d'une formulation « pure » de nanoparticules lipidiques sur la plaie n'est pas souhaitable. En effet, d'une part cela formerait un film lipidique visqueux propice à la macération et d'autre part, cela impliquerait l'application d'une quantité importante de nanoparticules chargées d'où des coûts importants. Dans tous les cas, l'application topique sur ulcère nécessite une formulation maximisant le contact entre la plaie et la formulation. Plusieurs stratégies de délivrance locale existent comme l'utilisation de gels, d'hydrogels ou de pansements. Dans ce travail de thèse, nous avons choisi la formulation sous forme de gel. En effet ces formulations permettraient de contrôler la quantité de produit délivré par rapport à l'utilisation de pansements. Les pansements et certains hydrogels possèdent par contre l'avantage de pouvoir contrôler de manière fine la délivrance des traitements. Ces deux types de délivrance ont déjà fait l'objet de recherche dans le cadre des Lipidots avec la thèse de Lisa Racine sur des hydrogels de CMC-PEG et des éponges de chitosan.<sup>20</sup>

Il existe plusieurs stratégies de formulation de gels. La principale stratégie est l'utilisation d'un excipient épaississant qui augmente la viscosité de la formulation par la réalisation d'un réseau tridimensionnel. Il est également possible de réaliser des gels directement avec les nanoparticules en les formulant sous forme concentrée comme montré dans les travaux de thèse de Thomas Delmas.<sup>21</sup> A partir d'une concentration massique supérieure à 350 mg/ml, on retrouve une augmentation de la viscosité des formulations due à la formation d'un gel physique. Comme expliqué en préambule, nous n'avons pas retenu ce mode de gélification car il fait intervenir des quantités initiales importantes de principes actifs et ne permet pas de contrôler de manière fine la viscosité obtenue.

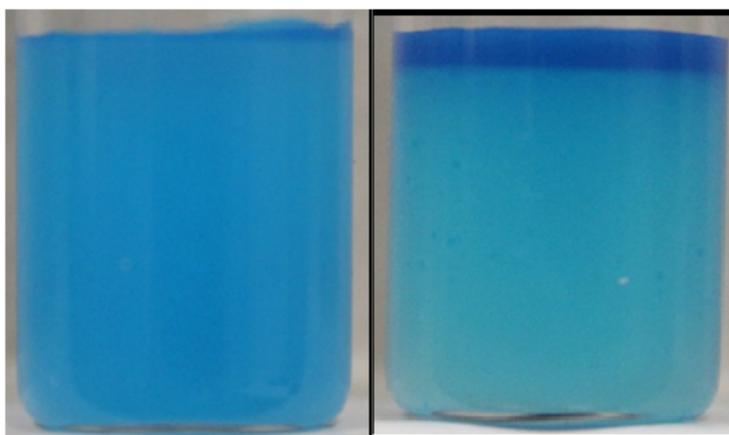
Les principaux polymères utilisés sont soit des polymères de synthèse comme les Carbopols ou des polymères issus de la cellulose comme la carboxyméthylcellulose ou l'hydroxypropylméthylcellulose. Les polymères testés ont été trouvés par recherche bibliographique dans le Handbook of Pharmaceutical Excipients <sup>22</sup> qui liste en détail les excipients utilisés en industrie pharmaceutique.

Le Tableau II.27 représente les différents composés permettant de formuler des gels. Les premiers tests réalisés ont consisté en une solubilisation des polymères (en général par dispersion dans de l'eau chaude ou dans un non solvant) et un ajout d'une formulation de

nanoparticules neutres formulées dans du PBS 1X. Les composés ioniques (**Carboxymethylcellulose, Carbopol, Gomme Xanthane**) ont été rapidement écartés car ils provoquaient une déstabilisation des nanoparticules cationiques liée à une complexation ionique. **Parmi les composés non ioniques, l'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) s'est révélée être le meilleur candidat par sa facilité de formulation et sa compatibilité avec les nanoparticules.** La gomme guar présentait un aspect non homogène lié à la difficulté de solubilisation du polymère.

Les premiers essais de formulations avec l'HPMC ont montré un effet de la phase aqueuse lors de la formulation de gels. Ainsi lorsque les gels étaient formulés en partie à partir de PBS, on retrouve une déstabilisation physique des gels comme montré dans la Figure II-13. Cet effet était présent à des quantités en sels même faibles ( $[\text{NaCl}] = 20\text{mM}$ ). L'augmentation des concentrations en HPMC permet de freiner ce phénomène par l'augmentation de la viscosité mais même des gels à 2% présentaient ce phénomène.

La synérèse des gels en milieu ionique (i.e. séparation d'un liquide de son gel) est liée à une diminution des interactions eau-polymère car les interactions sels-eau deviennent prédominantes. Le polymère interagit alors de manière préférentielle avec lui-même par interaction hydrophobe entraînant sa contraction et expulsion de l'eau avec les nanoparticules.<sup>23</sup> La solution fut de formuler les nanoparticules en milieu aqueux non ionique, permettant d'obtenir un gel stable sans synérèse même en conditions de faible viscosité.



*Figure II-13 : Synérèse des gels d'HPMC en milieu ionique. Les nanoparticules sont formulées avec un fluorophore bleu (DiD) afin de déterminer visuellement l'homogénéité du gel. Après quelques jours, on retrouve une couche concentrée de nanoparticules sur la partie supérieure du gel.*

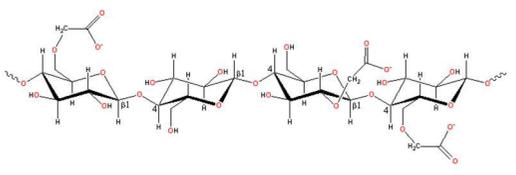
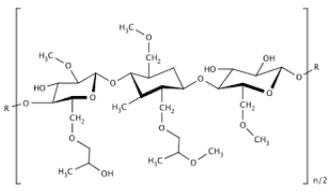
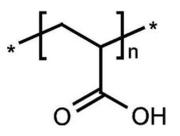
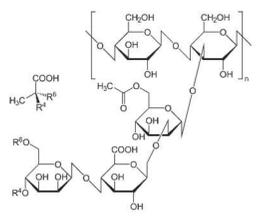
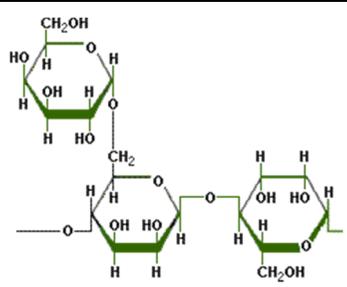
Nom du polymère	Structure chimique	Caractéristiques principales
<b>Carboxyméthylcellulose (CMC)</b>		<b>Ionique (-)</b> Issu de l'hémisynthèse de la cellulose
<b>Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)</b>		<b>Non ionique</b> Issu de l'hémisynthèse de la cellulose
<b>Carbopol</b>		<b>Ionique (-)</b> Polymère synthétique d'acide acrylique
<b>Gomme Xanthane</b>		<b>Ionique (-)</b> Polysaccharide bactérien Comportement thixotropique important
<b>Gomme Guar</b>		<b>Non ionique</b> Polysaccharide végétal

Tableau II.27 : Polymères testés lors de la phase de sélection de polymères épaississants

## 2. Formulation de gels à partir de l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)

L'hydroxypropylméthylcellulose représente ainsi le meilleur polymère candidat par son caractère non ionique et sa simplicité de formulation.

### a) Mise au point du protocole de formulation

#### Caractéristiques de l'HPMC utilisée

L'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) est un polymère issu de la modification chimique de la cellulose par ajout de groupements hydroxypropyles et de groupements méthyles (voir Figure II-14). L'HPMC utilisée correspond à la spécification de la Pharmacopée américaine (USP) avec un poids moléculaire moyen de 80 kDa et une répartition en groupement hydroxypropyles de 7 à 12 % et de groupements méthyles de 28 à 30 %. (Sigma). On s'attend à obtenir une viscosité d'environ  $4 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$  à une concentration massique de 20mg/g et une température de 20°C.

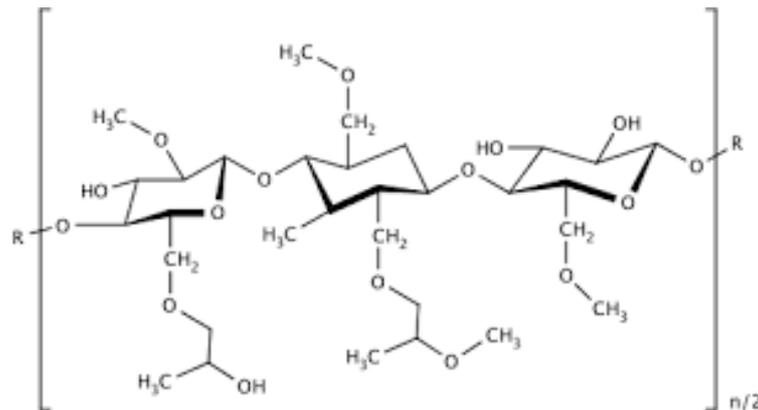


Figure II-14 : Structure chimique de l'hydroxypropylméthylcellulose.

#### Protocole final de formulation

Pour rajouter les nanoparticules dans le gel d'HPMC, il est nécessaire d'avoir une concentration initiale élevée pour réduire au maximum le facteur de dilution. Pour cela une étape de concentration de la dispersion de nanoparticules est réalisée avec des filtres à centrifuger (Amicon) ayant un seuil de coupure de 100 kDa. Après pesée du filtre vide, un nettoyage ce celui-ci avec 3 rinçages à l'eau distillée est effectué afin d'enlever le glycérol utilisé comme conservateur du filtre. La solution de nanoparticules est ensuite ajoutée et le filtre pesé à nouveau afin de déterminer la masse de nanoparticules ajoutée. Le filtre est ensuite centrifugé à 4000 rpm à 20 °C pendant 15 minutes pour les formulations cationiques (C80/C35) et

30 minutes pour les formulations neutres (N80). Le rétentat est pesé afin de déterminer la concentration finale en nanoparticules après un nettoyage à l'eau distillée du filtre afin de récupérer les nanoparticules restantes sur le filtre. Cette méthode permet d'obtenir des formulations de nanoparticules à environ 100 mg/ml avec peu de pertes en principe actif lors de cette phase de filtration (<5 %).

Après pesée de l'HPMC dans un flacon de 4 ml, on rajoute de l'eau distillée préalablement chauffée à 85 °C. On agite ensuite la dispersion d'HPMC à l'aide d'un barreau aimanté pendant 5 minutes afin de bien hydrater le polymère tout en maintenant le vial à 85 °C avec un bain marie. Le flacon est ensuite mis à température ambiante et on rajoute de l'eau distillée à 4 °C afin de former le gel. L'ajout des nanoparticules ou des émulsions se fait après 2 minutes d'agitation afin d'éviter l'impact des hautes températures sur la stabilité des particules. Le gel est ensuite agité pendant 1 heure à température ambiante afin d'homogénéiser la formulation. Une fois homogènes, les gels sont stockés à 4 °C et sont caractérisés le lendemain (taille, concentration, encapsulation, et rhéologie).

### Essais préliminaires avec les nanoparticules

Lors de ce travail de screening, nous avons pu tester plusieurs types de nanoparticules : des nanoparticules neutres de 80 nm ainsi que des nanoparticules cationiques de 35 et 80 nm (N80, C35 et C80 respectivement). Nous avons donc préparé plusieurs gels à partir de ces nanoparticules à une concentration en nanoparticules dans le gel de 25mg/g et nous avons suivi ces formulations en DLS afin d'évaluer l'impact de la formulation gel sur la stabilité des nanoparticules.

Tableau II.28 : Caractéristiques colloïdales des nanoparticules formulées dans un gel à 1% d'HPMC.

Formulation *	J0		M1	
	Taille (nm) **	PDI ***	Taille (nm) **	PDI ***
C80	70.7	0.164	73.6	0.172
N80	81.0	0.168	80.9	0.169
C35	29.4	<b>0.234</b>	31.6	<b>0.250</b>

\* CXX : nanoparticules lipidiques cationiques de taille moyenne de XX nm ; NXX : nanoparticules lipidiques neutres de taille moyenne XX nm.

\*\* Taille mesurée par DLS

\*\*\* Polydispersité mesurée par DLS

Les résultats de DLS sont présentés dans le Tableau II.28. On observe une bonne stabilité des formulations cationiques et neutres de 80nm. Pour les formulations C35, on retrouve une modification de taille mesurée par DLS comme montré dans la Figure II-15. Cette modification est associée à la charge des nanoparticules mais également à la faible taille des nanoparticules car on la retrouve également pour des nanoparticules neutres de 30nm (N30).

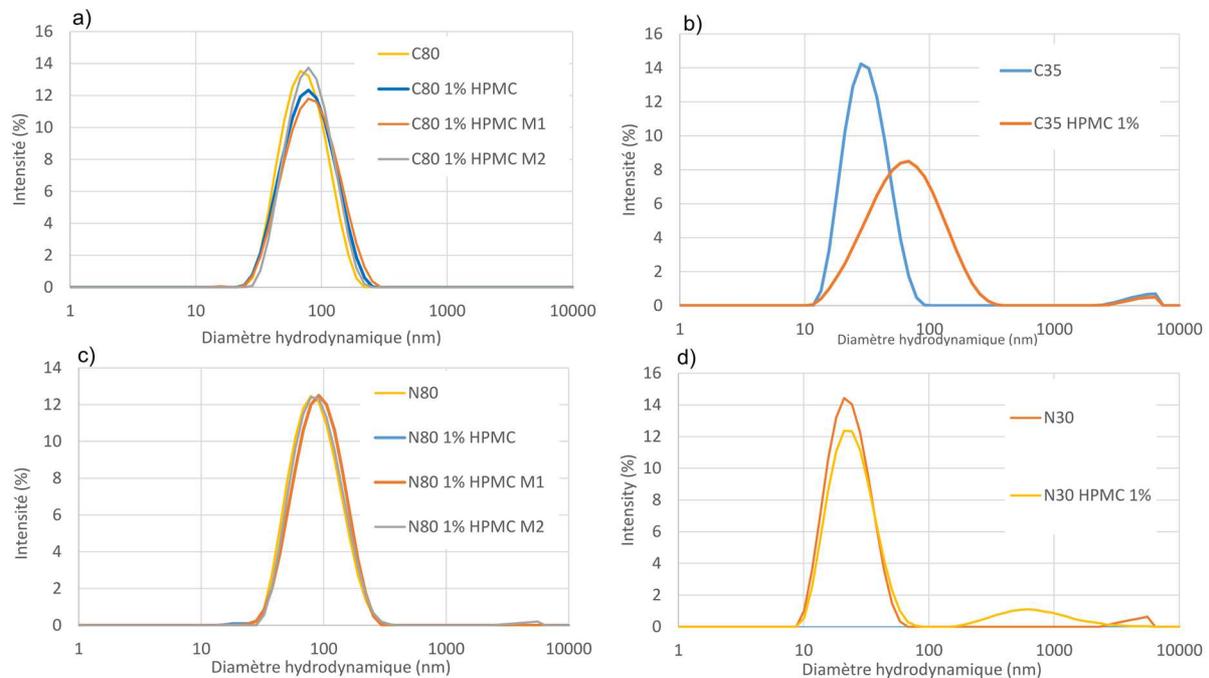


Figure II-15 : Mesure par DLS de la taille des nanoparticules formulées dans un gel d'HPMC. Pour les formulations C35 et N30 (b et d respectivement), on retrouve une déstabilisation lors de la formulation dans un gel d'HPMC 1%. Les caractéristiques de tailles ne sont pas modifiées pour les formulations C80 et N80 (a et c respectivement).

**Au vu de l'instabilité des formulations de petites tailles (C35) en gel d'HPMC, nous avons décidé de n'utiliser que les formulations C80 et N80.**

### *b) Analyse des caractéristiques des formulations finales : Rhéologie*

#### Méthodologie et Protocole expérimental

La rhéologie permet de caractériser la structure d'un gel et des interactions gel-nanoparticules.

L'étude rhéologique des gels permet d'évaluer la stabilité de ceux-ci en conditions de stockage et de caractériser les propriétés de délivrance du gel. Nous avons premièrement étudié les caractéristiques du gel seul avant d'observer l'impact des nanoparticules dans le gel. Il était également intéressant d'observer l'impact de la présence de sels sur les propriétés rhéologiques du gel car nous avons démontré que lorsque les gels sont formulés en présence de sels, on retrouve un phénomène de synergie important.

Les gels formulés ont été analysés à l'aide d'un rhéomètre Kinexus Pro (Malvern Instruments). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un système cône-plan de rayon 40 mm et d'angle 4°.

Les mesures de viscosités ont été réalisées à une température constante de 25°C avec des taux de cisaillement compris entre 0.15 et 100 s<sup>-1</sup>. Les mesures ont été réalisées en triplicata sur trois échantillons de gels indépendants et sont exprimées sous la forme de moyenne ± écart type.

### Impact de la concentration d'HPMC

La Figure II-16 résume la viscosité des gels d'HPMC (1%, 1.5% et 2% m/m) pour des forces de cisaillement croissantes. On observe l'augmentation attendue de la viscosité lors de l'augmentation des concentrations avec les formulations à 2%.

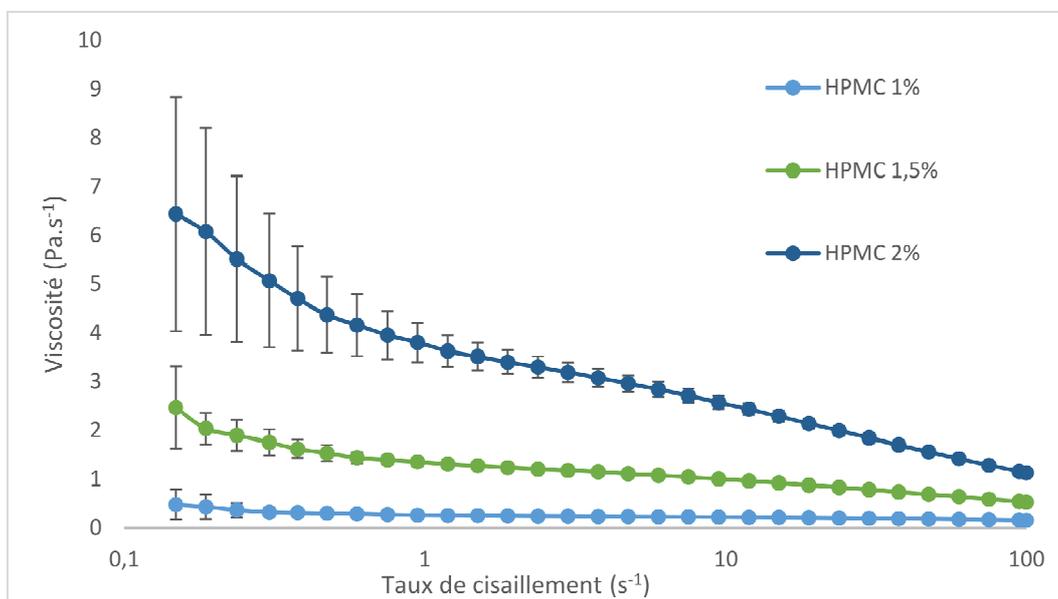


Figure II-16 : Rhéologie des gels formulés à base d'HPMC sans nanoparticules.

### Impact de la formulation : Concentration ionique.

Durant la phase de screening, nous avons remarqué que l'utilisation de PBS ou de NaCl dans les formulations d'HPMC provoquaient une instabilité du gel nécessitant une viscosité importante afin de retarder le phénomène de synérèse. **On ne retrouve pas de modification des caractéristiques de la viscosité lors d'une application d'un taux de cisaillement croissant pour des gels à 1%** (Figure II-17).

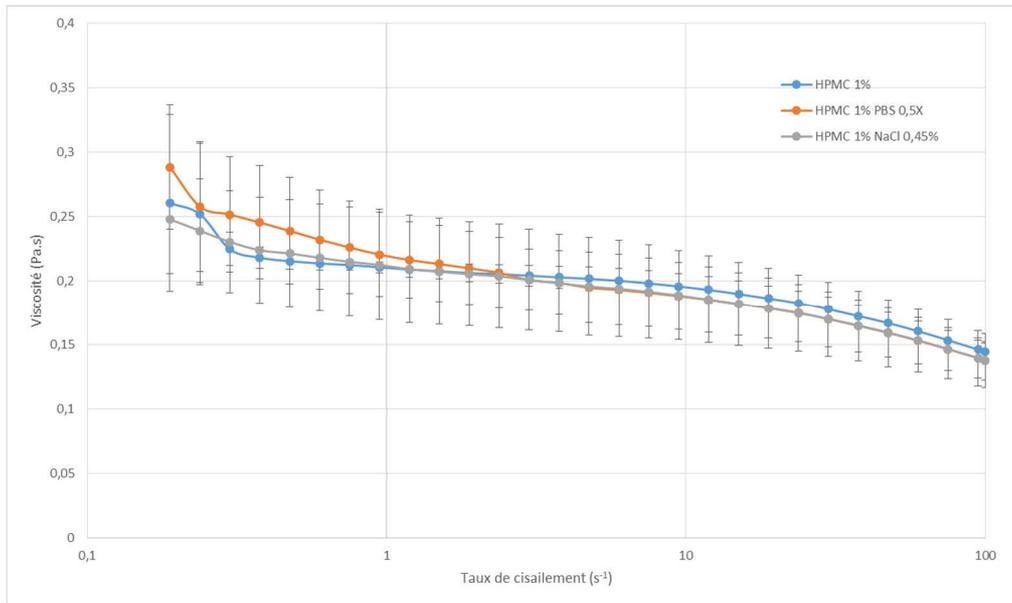


Figure II-17 : Rhéologie de gels 1% HPMC avec une variation de la concentration ionique ( $n=3$ ) ( $\text{NaCl } 0,45\% = 0,077 \text{ M}$ ).

### Impact des nanoparticules sur les caractéristiques rhéologiques : rôle de la taille

Nous avons fait varier la taille des nanoparticules introduites dans le gel d'HPMC avec une concentration massique de nanoparticules constante à 2,5% et une concentration massique constante en HPMC à 1%. Les résultats sont résumés dans la Figure II-18. On observe une diminution de la viscosité aux faibles taux de cisaillement (entre 0,15 et 1 s<sup>-1</sup>) lors de l'introduction de nanoparticules dans les gels. Ceci va pouvoir impacter sur la viscosité de stockage et donc sur la stabilité des formulations.

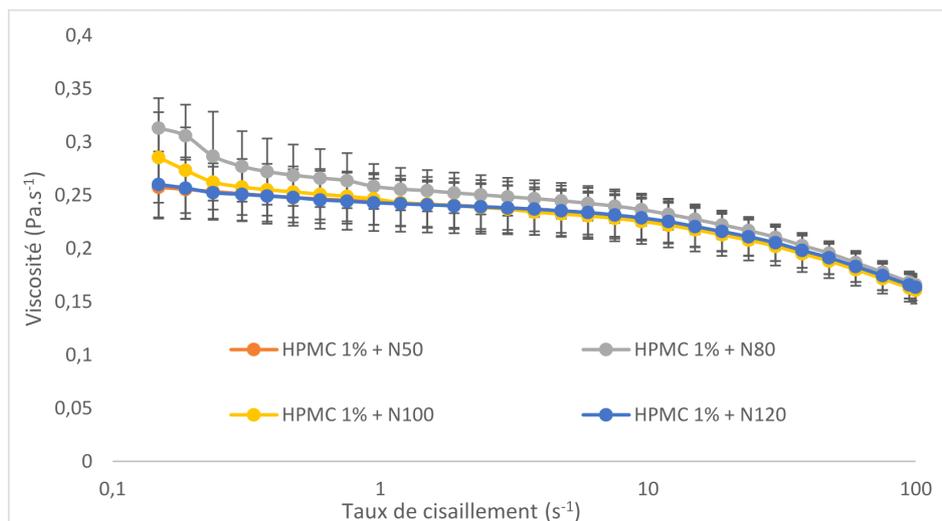


Figure II-18 : Impact de la taille des nanoparticules sur la viscosité des gels. Les résultats sont affichés en moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ).

## Impact des nanoparticules : Rôle de la charge de surface

Sachant que la majeure partie de nos candidats s'encapsulent avec de bonnes caractéristiques dans les nanoparticules cationiques, nous avons vérifié les caractéristiques du gel en présence de nanoparticules cationiques. Lors de l'étape de screening, nous avons observé visuellement une augmentation de la viscosité des gels avec les nanoparticules cationiques. La Figure II-19 montre qu'à taille et concentration massique constante (80 nm et 2.5%), nous retrouvons une augmentation de la viscosité des gels ayant des nanoparticules cationiques.

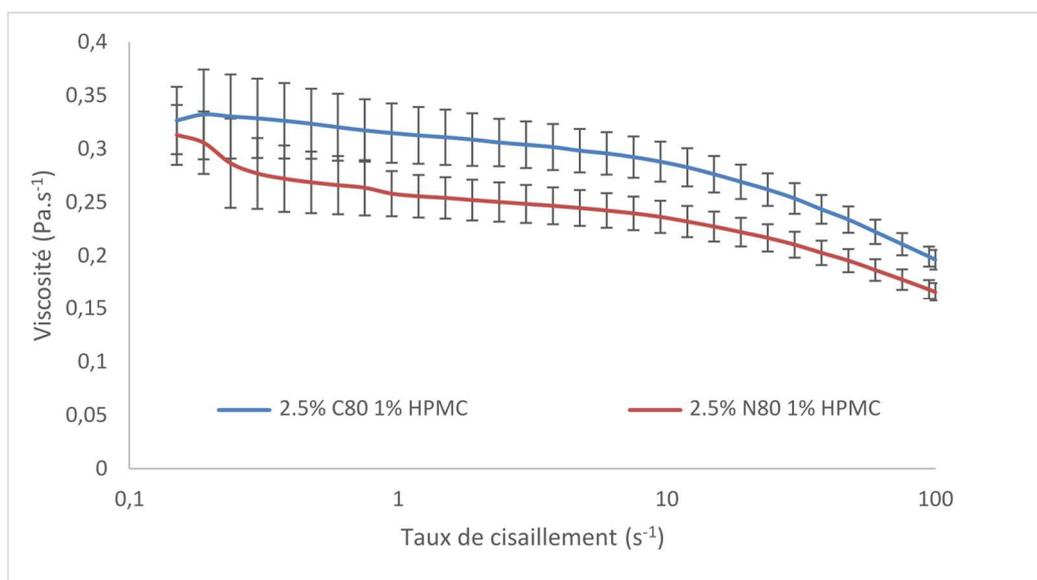


Figure II-19 : Impact de la charge de surface des nanoparticules sur la viscosité des gels. Les résultats sont affichés en moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$ ).

### c) Essai de stérilisation par autoclavage

L'HPMC est un polymère qui peut se stériliser de deux manières différentes : la stérilisation de la poudre sèche puis la formulation en conditions stériles ou un autoclavage terminal afin de stériliser la formulation. La filtration terminale à 0.22  $\mu\text{m}$  n'est pas possible à cause de la viscosité élevée des formulations.

Nous avons évalué l'effet de l'autoclavage sur différentes formulations :

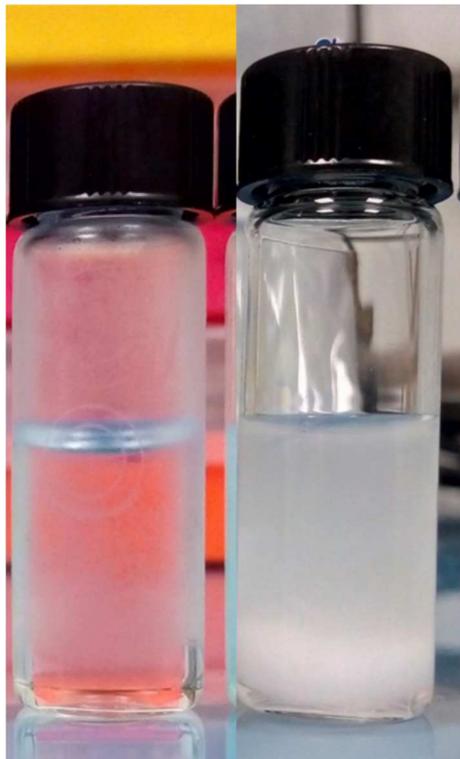
- Un gel d'HPMC 1%
- Un gel d'HPMC 1% + nanoparticules N80 à 2.5%
- Un gel d'HPMC 1% + nanoparticules N80 à 2.5%

- 3 gels d'HPMC 1% + nanoparticules N80 à 2.5% encapsulant l'ACT-333679 à 0.9%.

Les gels d'ACT-333679 ont été comparés avant et après autoclavage et comparés à la formulation initiale réalisée pour la formulation de ces 3 gels.

Les résultats de mesure de taille, de potentiel zêta, d'encapsulation et de rhéologie sont présentés dans la Figure II-21. L'Homogénéité correspond à la variation totale de la concentration en principe actif dans le gel. Une valeur inférieure à 10% est considérée comme bonne.

Comme montré sur la Figure II-20, après autoclavage, on trouve une précipitation de l'HPMC due à la forte température liée à l'autoclavage. L'HPMC peut ensuite se disperser avec une agitation légère.



*Figure II-20 : Précipitation de l'HPMC avant (gauche) et immédiatement après autoclavage (droit). On observe une précipitation de l'HPMC lors de l'autoclavage des formulations.*

On observe une augmentation de taille des nanoparticules de 80 nm à 140 nm après autoclavage. On observe par contre une diminution de l'index de polydispersité et les courbes obtenues en DLS ne présentent aucun agrégat. Au niveau de la charge de surface des nanoparticules, on observe une augmentation légère du potentiel Zêta.

Concernant les caractéristiques d'encapsulation, on retrouve une faible diminution de l'encapsulation de l'ACT-333679 mais celle-ci restant acceptable

Concernant les paramètres rhéologiques, l'autoclavage des gels d'HPMC provoque une diminution de la viscosité. Dans les gels chargés en nanoparticules, on retrouve au contraire une augmentation de la viscosité qui pourrait être liée à la taille plus importante des nanoparticules.

Ainsi l'autoclavage ne représente pas une méthode acceptable de stérilisation des gels de nanoparticules. Un procédé plus simple consisterait en l'autoclavage du gel et ajout en conditions stériles de nanoparticules filtrés sur 0.22 $\mu$ m. Dans le cadre de la thèse, nous avons choisi des formulations non stériles par facilité de préparation et du faible risque infectieux présent chez les murins.

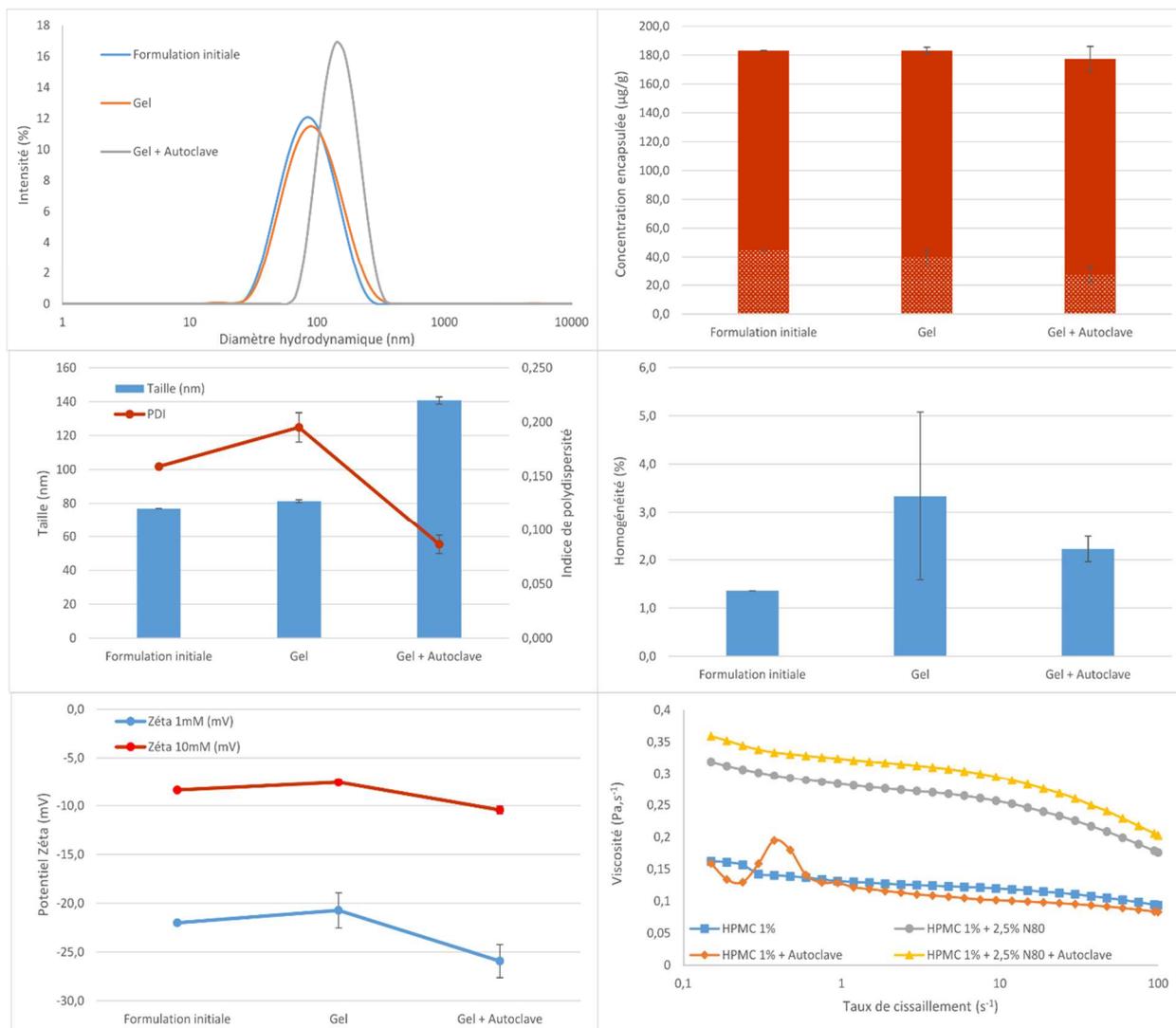


Figure II-21 : Résultats de taille, de charge, d'encapsulation et de rhéologie des formulations 1% HPMC N80 autoclavés en comparaison à la formulation initiale et aux gels initiaux. Pour les résultats d'encapsulation, les barres hachurées représentent la concentration au cœur des nanoparticules.

### 3. Etude de stabilité d'encapsulation sur 6 mois

#### a) Protocole expérimental

Les gels ont été analysés de la même manière que les solutions de nanoparticules « pures ». Pour l'analyse de la concentration en principe actif, nous réalisons une mesure de la concentration du gel en triplicata à trois hauteurs distinctes afin de calculer la disparité de la concentration en principe actif selon l'Équation II-5. L'homogénéité de la formulation est bonne lors que la valeur est inférieure à 10% (moins de 10% de variation de la concentration en principe actif dans le gel). Les échantillons de gels prélevés sont pesés et dilués dans du PBS 1X afin d'obtenir une concentration en particules de 1 mg/g. Pour l'analyse de la concentration encapsulée par SPE, nous avons réalisé une dilution de gel à 2,5 mg/g dans du

PBS 1 X. Nous avons également réalisé un suivi de stabilité similaire sur les formulations initiales n'ayant pas HPMC avec une concentration en nanoparticule fixée à 25mg/ml.

$$Disparité (\%) = \frac{100 * \textit{Ecart Type}}{\textit{Moyenne}}$$

*Équation II-5 : Calcul de l'homogénéité des gels*

Nous sommes partis sur un taux de charge effectif à 3% dans les nanoparticules cationiques et de 0.9% pour l'ACT-333679 dans les nanoparticules neutres. Le treprostinil a été encapsulé à un taux de charge effectif de 3% dans les nanoparticules cationiques. Un essai de formulation du cinaciguat à un taux de charge effectif de 2% a également été réalisé. Nous avons également sélectionné une concentration d'HPMC finale à 1% (m/m) afin de faciliter l'application sur les plaies par rapport à une concentration de 1.5% par rapport aux viscosités observées en rhéologie.

Les figures Figure II-22 à Figure II-25 résument les différents suivis de stabilités pour chaque couple nanoparticule-principe actif. Les résultats obtenus avec les gels sont présentés pour au minimum n=3. Les résultats de stabilités sont affichés en termes de moyenne  $\pm$  écart type.

b) Stabilité des formulations tréprostinil

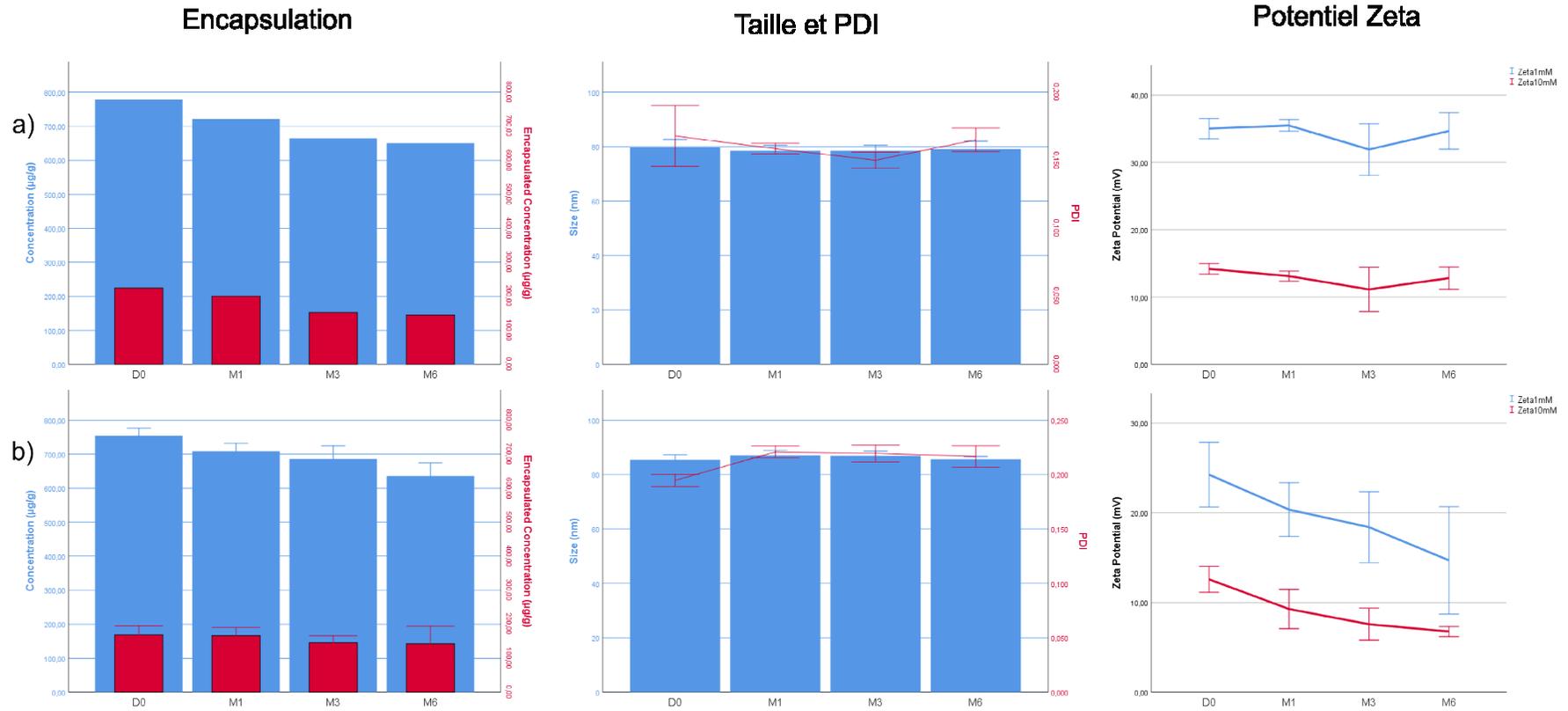


Figure II-22 : Suivi de stabilité des nanoparticules cationiques encapsulant le tréprostinil. a) formulations de références en milieu aqueux b) formulations HPMC 1%

c) Stabilité des formulations ACT-333679

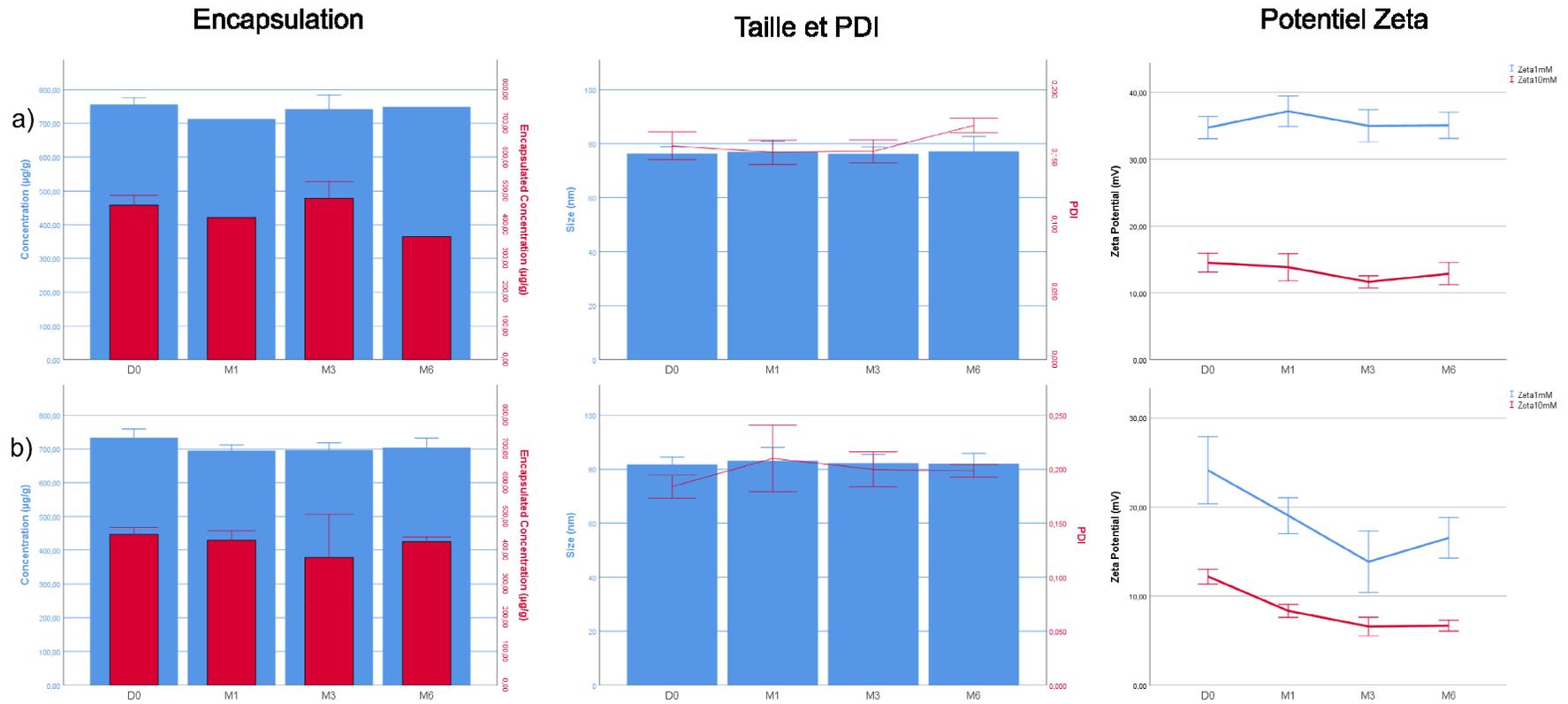


Figure II-23 : Suivi de stabilité des nanoparticules cationiques encapsulant l'ACT-333679 a) formulations de références en milieu aqueux b) formulation HPMC 1%

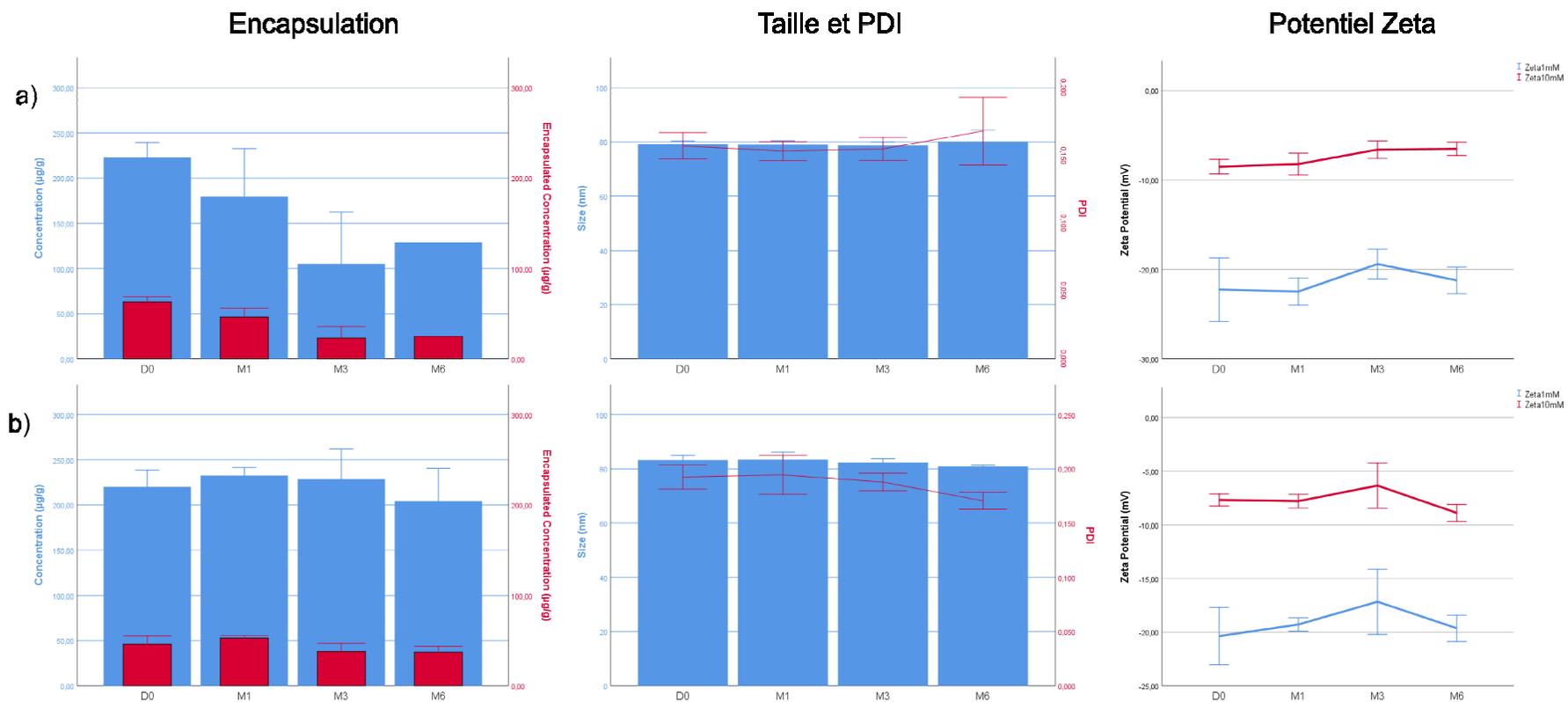


Figure II-24 : Suivi de stabilité des nanoparticules neutres encapsulant ACT-333679 a) formulations de références en milieu aqueux b) formulation HPMC 1%

d) Stabilité des formulations Cinaciguat

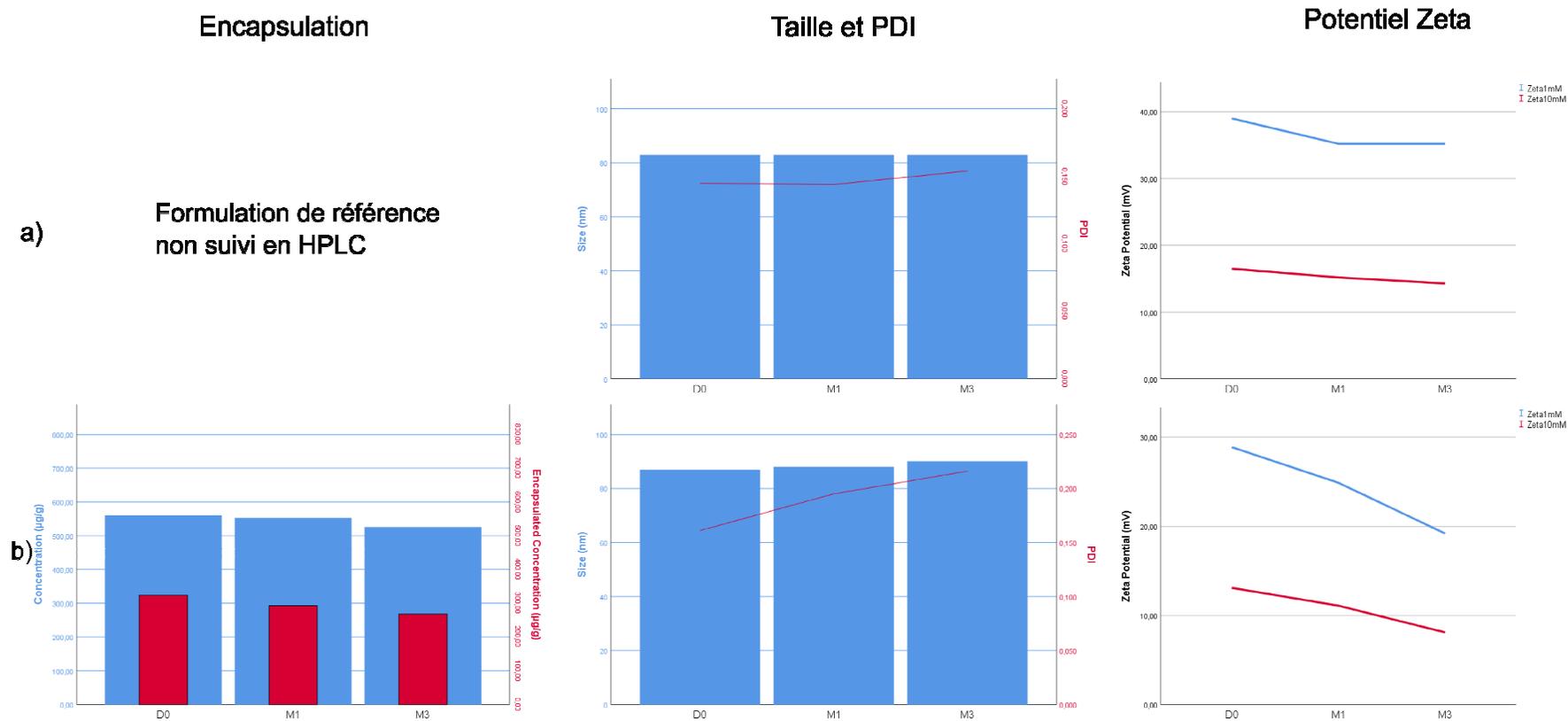


Figure II-25 : Suivi de stabilité des nanoparticules cationiques encapsulant le cinaciguat a) formulations de références en milieu aqueux b) formulation HPMC 1%

### *e) Conclusion de la phase de stabilité des gels*

Cette phase d'étude a permis d'évaluer la stabilité des gels contenant des nanoparticules avec principe actif en conditions similaires de concentration de principe actif (25mg/g) et de stockage (4°C). Pour toutes les formulations, on retrouve une excellente homogénéité démontrant ainsi une absence de synérèse.

**Pour le tréprostinil encapsulé dans les nanoparticules cationiques, on observe une diminution constante de l'encapsulation dans les deux types de formulation liquides et gel.**

Lors de l'étape de stabilité de la phase de screening, nous n'avons pas observé ce phénomène. Il s'agit de l'impact défavorable de la formulation des nanoparticules dans l'eau distillée par rapport aux formulations PBS.

On ne peut pas conclure pour le cinaciguat dans les nanoparticules cationiques car un seul gel a été testé et nous n'avons pas de contrôle liquide dans les mêmes conditions de concentration (25mg/g LNP).

**Pour l'ACT 333679 encapsulé dans des nanoparticules cationiques, on observe une excellente stabilité des gels à 6 mois** malgré une faible baisse initiale de 750 µg/g (soit 3% de taux de charge effectif) à 700µg/g (soit 2.8 % de taux de charge effectif). Il ne semble pas y avoir cette diminution pour les formulations liquides.

**L'ACT 333679 encapsulé dans des nanoparticules neutres est également stable.** On observe cependant une forte différence de stabilité entre les formes liquides et les formes gels. Ainsi l'ACT 333679 n'est plus stable dans les formulations liquides dans l'EMQ par rapport aux tests initiaux réalisés dans les formulations PBS. On observe un effet stabilisateur des formulations gels vis-à-vis de l'encapsulation.

Concernant les paramètres de taille et de charge des nanoparticules, comme dans la phase de sélection des gels, on observe une augmentation légère de la taille et de la polydispersité qui semble beaucoup plus importante dans les formulations cationiques que dans les formulations neutres. De plus on observe une différence marquée au niveau de la stabilité du potentiel zêta. Ainsi la formulation dans les gels apporte une diminution de la valeur du potentiel zêta mais cette diminution est également plus importante dans le temps (Figure II-26). Cette diminution va pouvoir impacter la stabilité des nanoparticules par diminution des effets électrostatiques répulsifs.

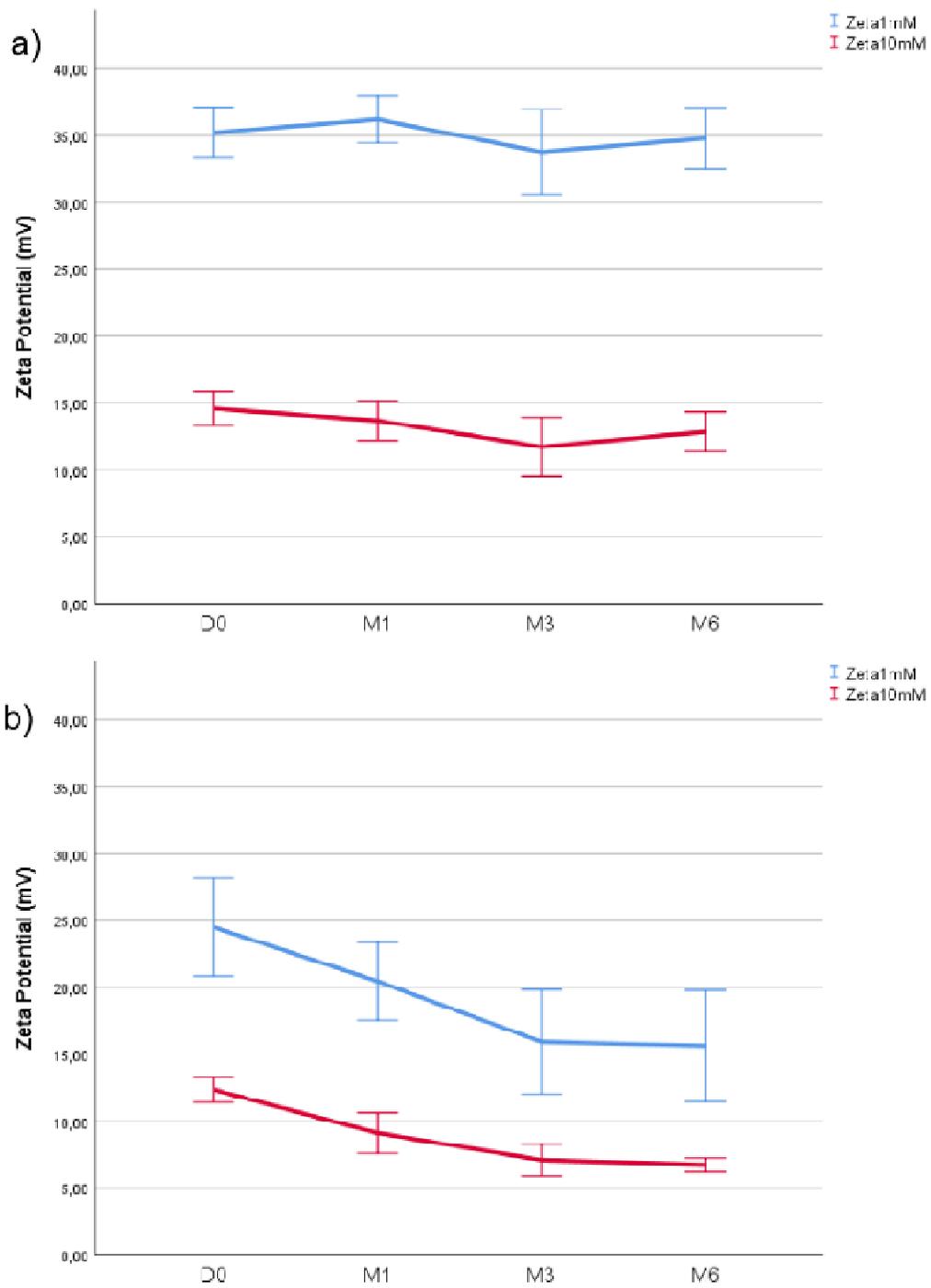


Figure II-26 : Impact de l'HPMC sur le potentiel Zêta des formulations cationiques. a)formulations aqueuses b) formulations gels.

## C. Formulation d'émulsions

Comme décrit dans la revue, il est nécessaire d'évaluer l'effet de la nanoencapsulation par rapport à une formulation de référence. Le tréprostinil est disponible uniquement sous forme liquide (Remodulin, liquide pour administration sous-cutanée) et l'ACT-333679 se présente uniquement sous la forme de comprimé sous la forme de sa prodrogue, le selexipag (UPTRAVI). Il aurait été possible de formuler un gel pour application topique à partir de la solution commerciale de tréprostinil mais cette solution comporte plusieurs excipients et n'est donc pas comparable.

Nous avons donc testé la formulation d'émulsions ayant une composition similaire à nos nanoparticules afin d'évaluer le bénéfice de la forme nanoparticule.

### 1. Phase de sélection des formulations

Lors de cette phase, nous avons choisi les deux types de nanoparticules qui, issues de notre phase de sélection des combinaisons nanoparticules - principes actifs, ont été utilisées pour les formulations gels.

Fonction	Cœur des nanoparticules		Phospholipides neutres		Phospholipides cationiques		Surfactant pégylé			
Composants	Huile de soja	Cire	S75	SPC-3	DOTAP	DOPE	Myrj40	Glycérol	PBS	Concentration théorique (mg/ml)
Formulations										
C80 (diluée)	67,1	22,4	X	2.2	15	X	43,1	1000	1800	54,5
EM_C_1	59.7		X	1.5	10	X	28.8	0	900	100
N80 (diluée)	81,6	27,2	13,3	X	X	X	79	1000	1800	72,1
EM_N_1	53.9		6.6	X	X	X	39.5	0	900	100

Le premier composant enlevé pour obtenir une émulsion était la cire dont la masse a été remplacée par de l'huile. Nous avons également fixé une concentration finale de 100mg/ml afin de pouvoir facilement incorporer les émulsions dans les gels avec une faible dilution du gel. Enfin, nous avons préparé les émulsions dans l'eau distillée au lieu du PBS pour être dans des conditions identiques à celles retenues pour les nanoparticules.

Les premiers tests utilisant les formulations EM\_C\_1 et EM\_N\_1 ont montré leur limite pour la formulation de préémulsions. Ainsi pour le tréprostinil et l'ACT-333679 on retrouve une déstabilisation massive de ces formulations avec une diminution importante de l'homogénéité du gel comme montré dans la Figure II-27. Les formulations EM\_C\_1 ne sont donc pas adaptées. Nous avons réalisé également quelques tests sur les formulations EM\_N\_1. Sur ces formulations, on retrouve le même comportement général en plus d'un précipité majeur de l'ACT lors de son incorporation à un taux de charge de 3%.

Nous avons donc décidé d'enlever le surfactant pegylé de ces formulations comme résumé dans le Tableau II.29.

Composants Formulations	Huile de soja	Cire	S75	SPC-3	DOTAP	DOPE	Myrj40	Glycérol	PBS	Concentration théorique (mg/ml)
EM_C_1	59.7		X	1.5	10	X	28.8	0	900	100
EM_C_2	59.7		X	<b>30.3</b>	10	X	<b>X</b>	X	900	100
EM_N_1	53.9		6.6	X	X	X	39.5	0	900	100
EM_N_2	53.9		<b>46.1</b>	X	X	X	<b>X</b>	X	900	100

Tableau II.29 : Modification additionnelles des formulations émulsions. En gras, modifications par rapport aux formulations initiales

Les formulations EM\_N\_2 ont montré un mauvais aspect général avec une forte viscosité et une homogénéité faible. Sur un test de formulation avec 1% d'ACT, on retrouve une déstabilisation des émulsions comme montré sur la Figure II-28.

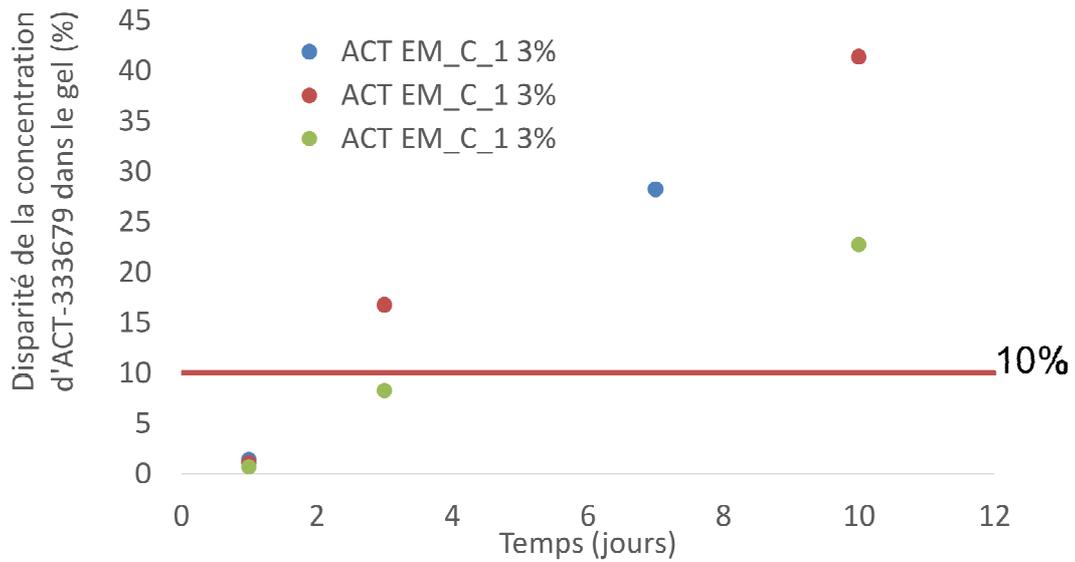


Figure II-27 : Homogénéité des cationiques ACT dans les formulations cationiques.

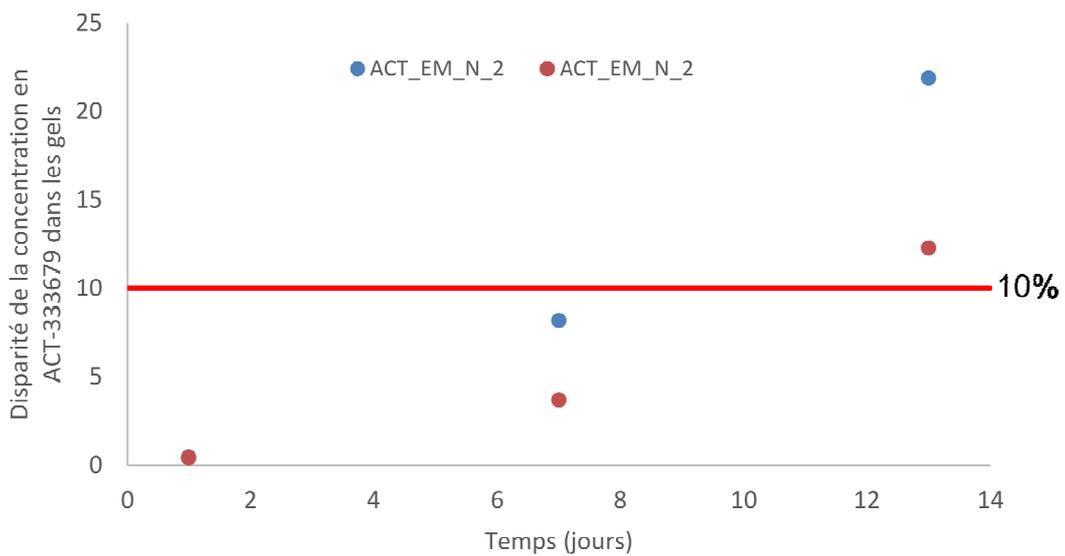


Figure II-28 : Homogénéité des formulations ACT dans les émulsions neutres.

Ainsi nous avons choisi les formulations EM\_C\_2 qui présentent un bon aspect général. Ainsi le tréprostinil est capable d'être vectorisé dans cette émulsion à un taux de 3% comme démontré dans la Figure II-29. Cette solubilisation est stable mais inférieure à celle des nanoparticules C80. En effet, on retrouve une forte déstabilisation sur deux de nos formulations avec une diminution de l'homogénéité du gel.

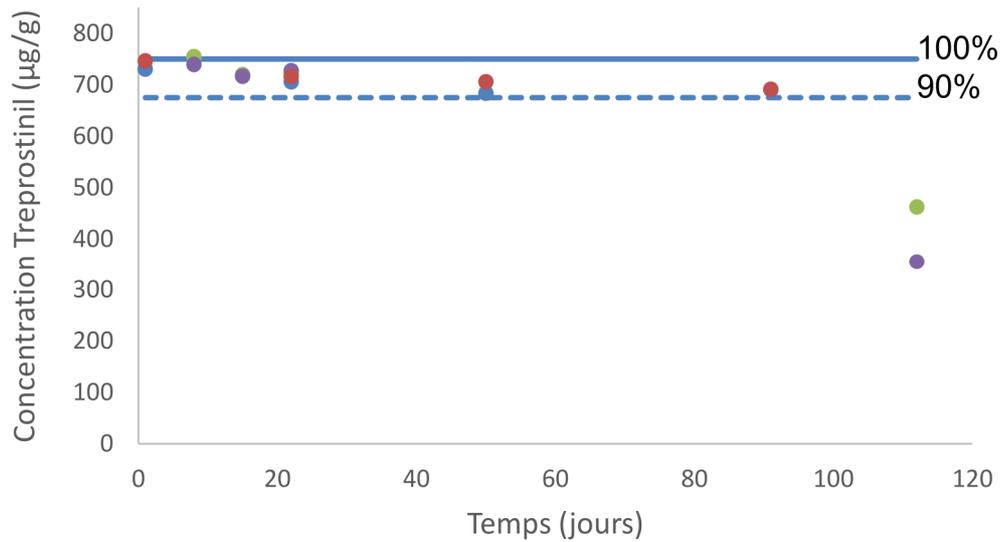


Figure II-29 : Stabilité du tréprostnil à 3% dans EM\_C\_2.

Concernant l'encapsulation de l'ACT-333679 dans les EM\_C\_2, on retrouve une stabilité très différente par rapport aux nanoparticules. En effet, à un taux de charge initial de 3%, on retrouve une forte baisse de la concentration seulement 7 jours après la formulation avec une augmentation de l'homogénéité du gel comme montré dans la Figure II-30. Un deuxième test a été réalisé avec un taux de charge à 2%. On retrouve également une déstabilisation avec un plateau atteint à un taux de charge d'environ 1.3%.

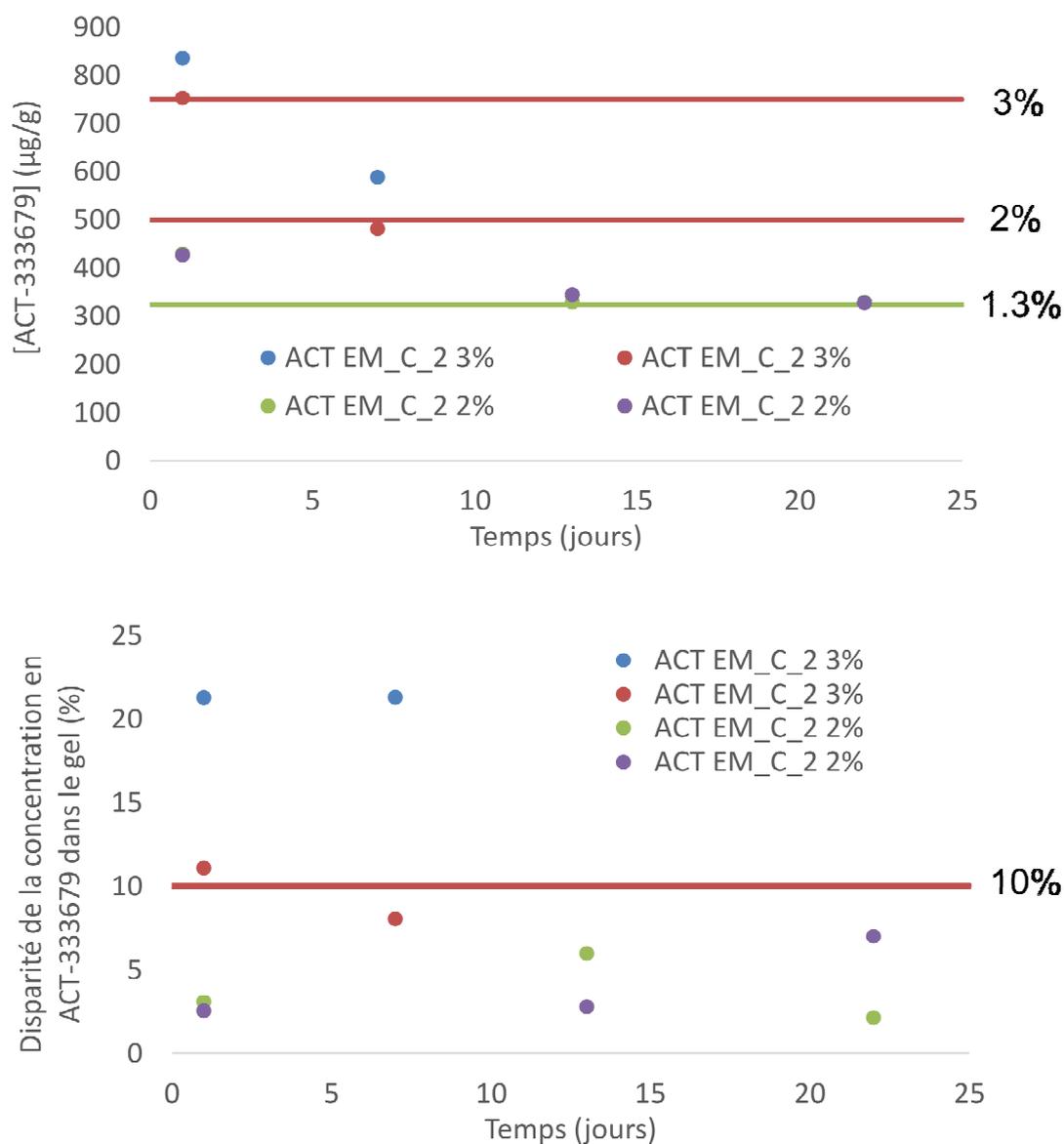


Figure II-30 : Sélection du taux de charge des formulations en émulsions pour l'ACT-333679.

Nous avons utilisé un taux de charge de 1.2% comme cible et nous avons ainsi obtenu des émulsions stables comme indiqué dans la Figure II-31. Les formulations semblent stables pendant au minimum 2 semaines ce qui va permettre la réalisation des études animales.

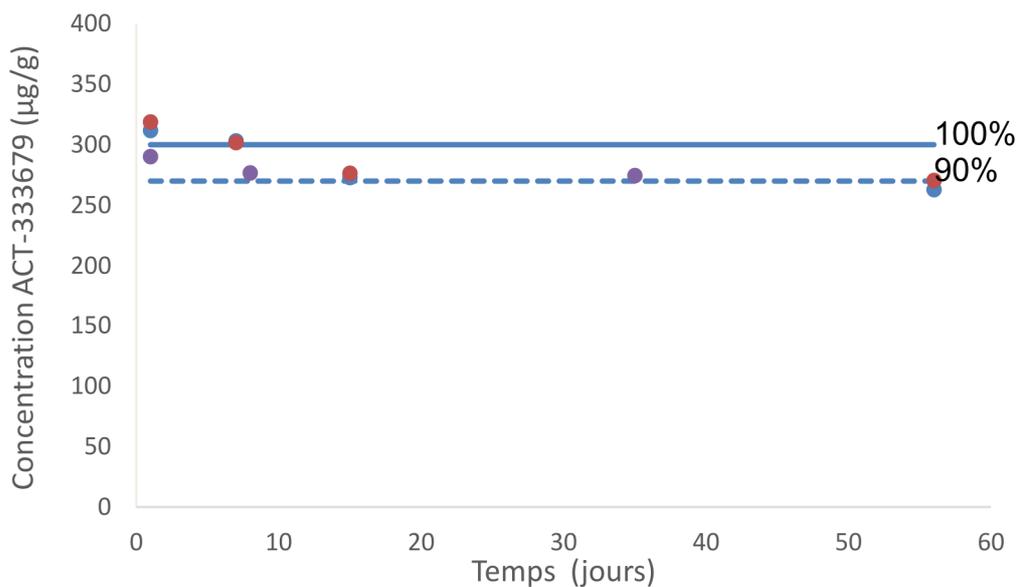


Figure II-31 : Emulsion ACT 333679 à un taux de charge de 1.23%

## 2. Stabilité

Afin de confirmer les résultats de stabilité observés dans la phase initiale, nous avons relancé une série d'analyse afin de confirmer les résultats de stabilités observés dans la phase de formulation. Dans ce cadre, 3 émulsions ont été réalisées pour chaque traitement avec un taux de charge de 3 % pour le tréprostinil et de 1.3 % pour l'ACT-333679. Chaque émulsion a permis de réaliser deux gels, soit 6 gels au total suivis pour chaque molécule. Ces formulations ont été suivies en termes de concentration totale dans le gel et d'encapsulation par extraction en phase solide.

a) Tréprostinil

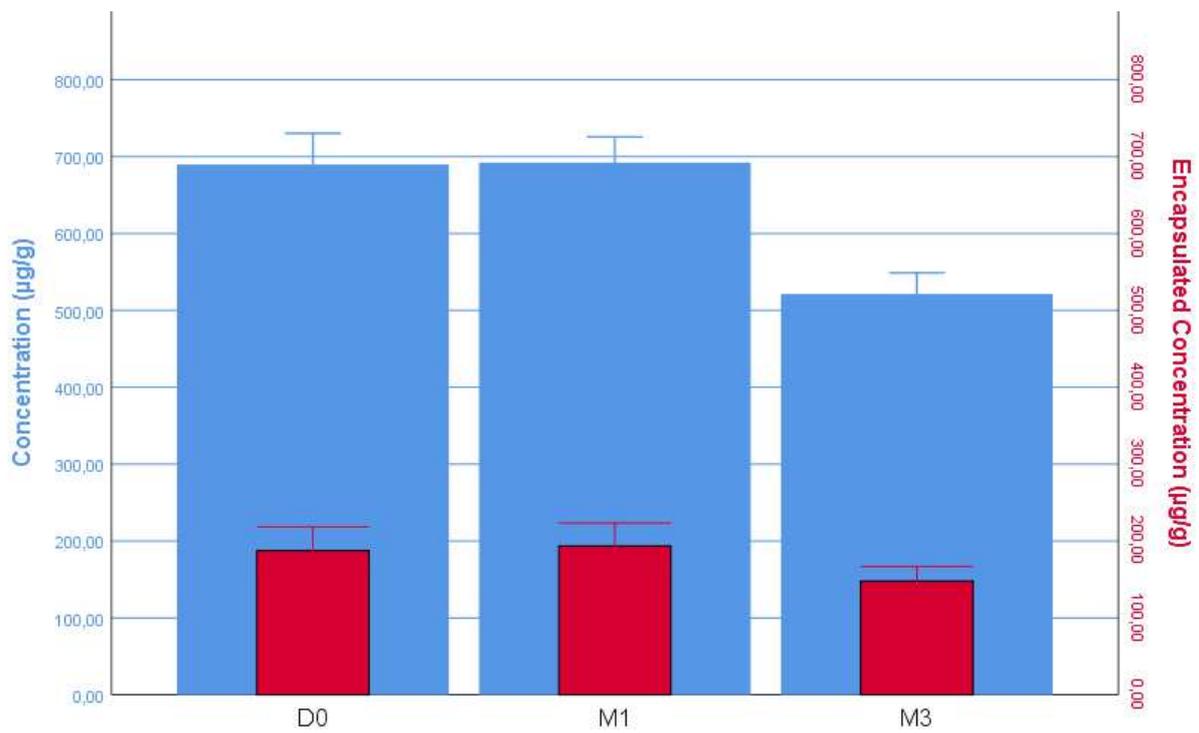


Figure II-32 : Stabilité des formulations Emulsions contenant le tréprostinil à un taux de charge initial de 3 %. Après un suivi pendant 3 mois à 4°C, on retrouve une diminution significative de la concentration en tréprostinil.

b) ACT-333679

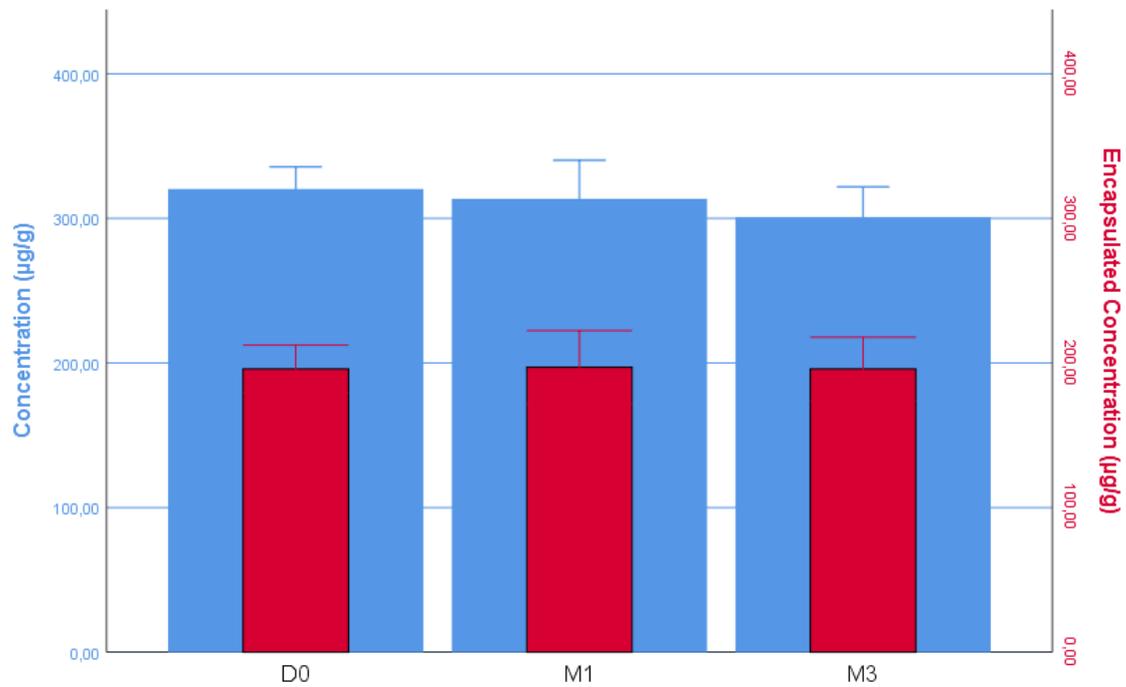
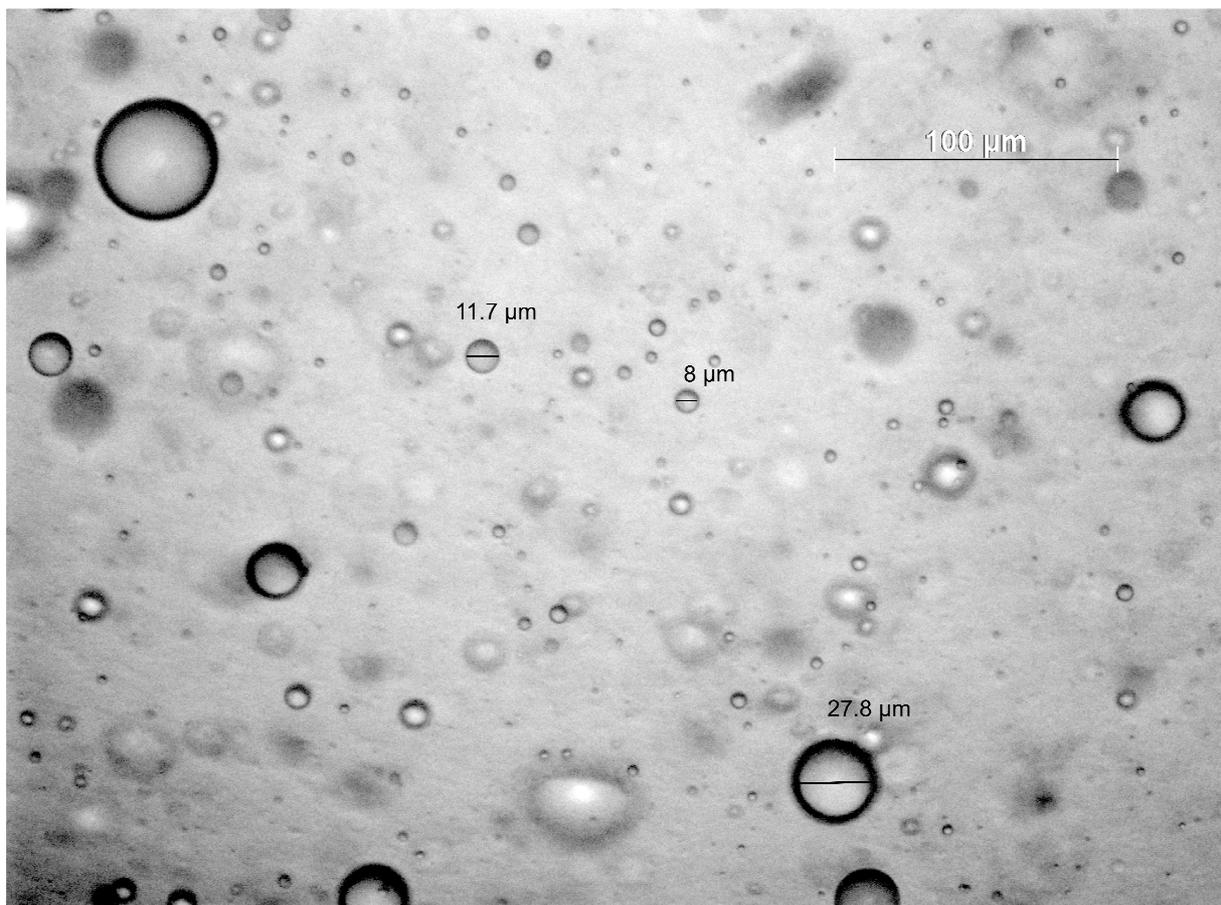


Figure II-33 : Stabilité des formulations Emulsions contenant l'ACT-333679 à un taux de charge initial de 1.3 %. Après un suivi pendant 3 mois à 4°C, on retrouve une diminution significative de la concentration en ACT-333679

### *c) Conclusion de la phase de stabilité des émulsions*

En conclusion de cette étape, nous sommes arrivés à formuler des émulsions « contrôles » à partir de nos formulations de nanoparticules. Ces formulations ont été modifiées par le retrait de la cire et du surfactant pegylé et conduisent à des émulsions contrôles qui possèdent une certaine stabilité en termes de vectorisation. Malgré cela, le processus de préparation est grossier et donc variable. Une étude plus poussée sur la composition des émulsions aurait peut-être pu améliorer leur stabilité. Au niveau de la caractérisation des émulsions, nous étions limités à une analyse visuelle. En effet, la DLS utilisée pour les nanoparticules n'est pas adaptée pour la mesure de taille de formulations polydisperses et ayant une taille micrométrique. En effet, par microscopie optique, on observe une forte variabilité de la taille des nanoparticules avec des formulations présentant un diamètre de  $40\mu\text{m}$  et d'autres particules autour du  $\mu\text{m}$  comme montré dans la Figure II-34. Une mesure de taille adaptée aurait pu être réalisée par des techniques de granulométrie par diffraction laser plus adaptées à la mesure de taille d'émulsions micrométriques.



*Figure II-34 : Observation des émulsions par microscopie optique.*

## D. Conclusion du chapitre II

Dans cette partie, nous avons réalisé une phase de sélection de principes actifs qui a permis de sélectionner à partir de 6 candidats 2 principes actifs, le tréprostinil et l'ACT-333679. Un autre principe actif, le cinaciguat, est un candidat moins prometteur mais restant toutefois possible à exploiter si cela s'avérait nécessaire. Nous avons ensuite sélectionné un polymère épaississant, l'hydroxypropylméthylcellulose afin de formuler les nanoparticules sous forme de gel pour leur application topique. Ces formulations sont stables sur 3 mois pour le tréprostinil et 6 mois pour l'ACT-333679. Afin de contrôler l'effet de la nanoencapsulation, nous avons formulé des émulsions cationiques. Ces formulations ont été réalisées par la modification des formulations de base des Lipidots et démontrent une bonne stabilité au niveau de la concentration en principe actif malgré l'instabilité macroscopique observée.

A partir de ces formulations de nanoparticules et des émulsions « contrôles », nous pouvons ainsi réaliser les études sur l'animal en disposant d'un contrôle permettant d'estimer l'effet propre des nanoparticules. Ce prochain chapitre présente deux études précliniques. La première évalue l'effet pharmacodynamique ainsi que la pharmacocinétique sur un modèle d'ulcère réalisé sur des souris saines. La seconde étude évalue le potentiel d'amélioration de la cicatrisation lors d'une application quotidienne sur un modèle d'ulcération sur des souris diabétiques.

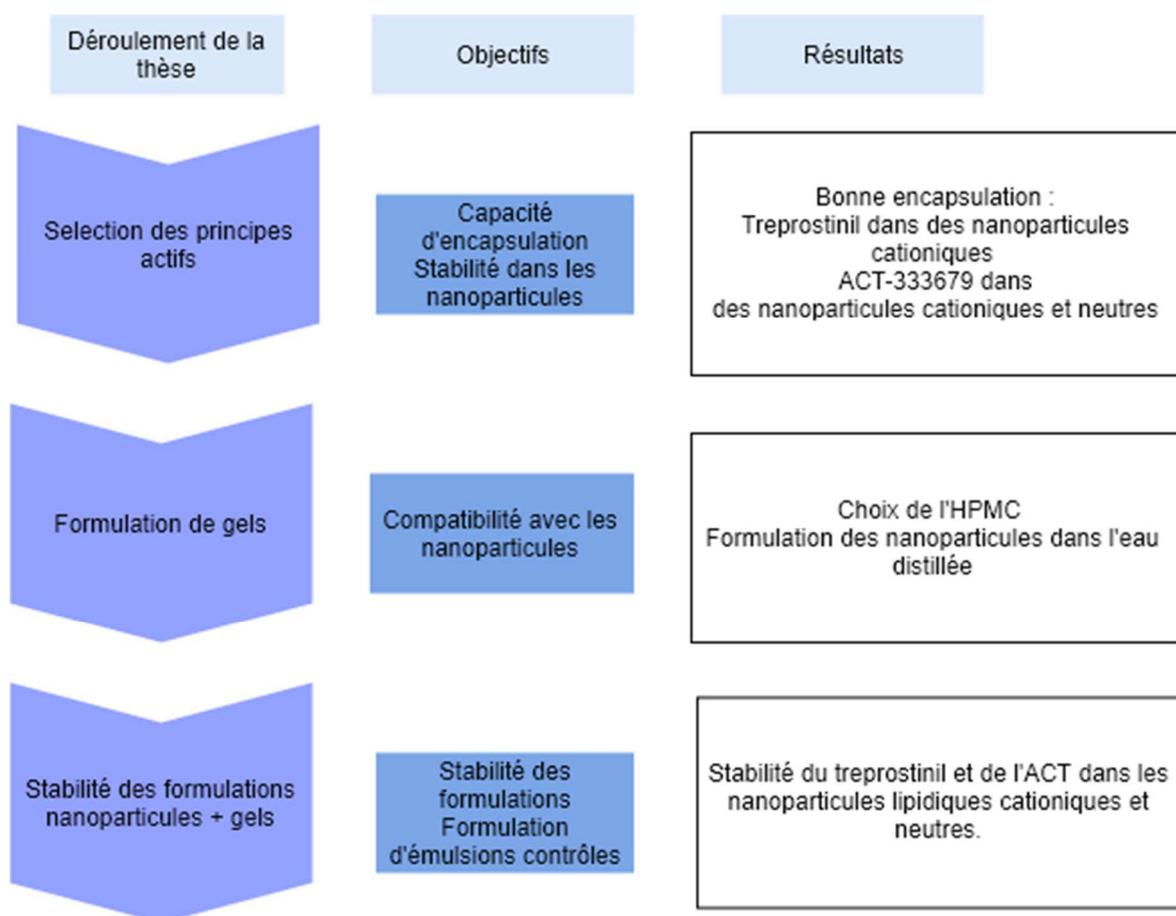


Figure II-35 : Objectifs et Résultats de thèse après la phase de formulation et de stabilité des nanoparticules.

## E. Bibliographie

1. Jain, P. *et al.* Liposomal nanoparticles encapsulating iloprost exhibit enhanced vasodilation in pulmonary arteries. *Int. J. Nanomedicine* 3249 (2014). doi:10.2147/IJN.S63190
2. Kleemann, E. *et al.* Iloprost-Containing Liposomes for Aerosol Application in Pulmonary Arterial Hypertension: Formulation Aspects and Stability. *Pharm. Res.* **24**, 277–287 (2007).
3. Banning, A. *et al.* Local delivery of platelets with encapsulated iloprost to balloon injured pig carotid arteries: effect on platelet deposition and neointima formation. *Thromb. Haemost.* **77**, 190–196 (1997).
4. Leifer, F. *et al.* Inhaled Treprostinil-Prodrug Lipid Nanoparticle Formulations Provide Long-Acting Pulmonary Vasodilation. *Drug Res.* (2018). doi:10.1055/s-0044-100374
5. Leifer, F. *et al.* Prolonged activity of inhaled treprostinil prodrug nanoparticles in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **44**, P2356 (2014).
6. Ishihara, T. *et al.* Encapsulation of beraprost sodium in nanoparticles: Analysis of sustained release properties, targeting abilities and pharmacological activities in animal models of pulmonary arterial hypertension. *J. Controlled Release* **197**, 97–104 (2015).
7. Savina, Y. Iontophorèse d'un analogue de la prostacycline pour améliorer la cicatrisation des ulcères liés à une dysfonction microvasculaire cutanée. (2019).
8. Kotzki, S. Therapeutic iontophoresis for scleroderma-related cutaneous ulcerations: screening, proof-of-concept study in a mouse scleroderma model. (Université Grenoble Alpes, 2016).
9. Gnerre, C. *et al.* The metabolism and drug-drug interaction potential of the selective prostacyclin receptor agonist selexipag. *Xenobiotica* 1–50 (2017). doi:10.1080/00498254.2017.1357088
10. Fagerberg, L. *et al.* Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **13**, 397–406 (2014).
11. Erdmann, E. *et al.* Cinaciguat, a soluble guanylate cyclase activator, unloads the heart but also causes hypotension in acute decompensated heart failure†. *Eur. Heart J.* **34**, 57–67 (2013).
12. Elnaggar, Y., El-Massik & Abdallah. Fabrication, appraisal, and transdermal permeation of sildenafil citrate-loaded nanostructured lipid carriers versus solid lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 3195 (2011). doi:10.2147/IJN.S25825
13. Baek, J.-S., Pham, C. V., Myung, C.-S. & Cho, C.-W. Tadalafil-loaded nanostructured lipid carriers using permeation enhancers. *Int. J. Pharm.* **495**, 701–709 (2015).
14. Doggrell, S. Do vardenafil and tadalafil have advantages over sildenafil in the treatment of erectile dysfunction? *Int. J. Impot. Res.* **19**, 281–295 (2007).

15. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
16. Guillot, A. *et al.* Solid Phase Extraction as an Innovative Separation Method for Measuring Free and Entrapped Drug in Lipid Nanoparticles. *Pharm. Res.* **32**, 3999–4009 (2015).
17. Stasch, J.-P. & Hobbs, A. J. NO-independent, haem-dependent soluble guanylate cyclase stimulators. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* 277–308 (Springer, 2009).
18. Schmidt, H. H. H. W., Schmidt, P. M. & Stasch, J.-P. NO- and Haem-Independent Soluble Guanylate Cyclase Activators. in *cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications* (eds. Schmidt, H. H. H. W., Hofmann, F. & Stasch, J.-P.) **191**, 309–339 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
19. Wang, H., Ye, M., Robinson, H., Francis, S. H. & Ke, H. Conformational Variations of Both Phosphodiesterase-5 and Inhibitors Provide the Structural Basis for the Physiological Effects of Vardenafil and Sildenafil. *Mol. Pharmacol.* **73**, 104–110 (2007).
20. Racine, L. Elaboration de biomatériaux pour la délivrance contrôlée de principes actifs hydrophobes. (2016).
21. Delmas, T. Caractérisation physicochimique et compréhension des propriétés de vectorisation des nanoparticules lipidotes pour les applications biomédicales. (2011).
22. *Handbook of pharmaceutical excipients.* (APhA, (PhP) Pharmaceutical Press, 2009).
23. Joshi, S. C. Sol-Gel Behavior of Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) in Ionic Media Including Drug Release. *Materials* **4**, 1861–1905 (2011).

### III. Evaluation pharmacocinétique et pharmacodynamique des formulations d'agonistes des récepteurs de la prostacycline nanoencapsulés

A.	Etude 1 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie après application des formulations d'agonistes des récepteurs de la prostacycline nanoencapsulés sur souris saines.....	176
	1. Introduction et protocole expérimental .....	176
	2. Méthodes .....	177
	3. Effet pharmacodynamique de l'administration de treprostinil ou d'ACT-333679 ....	181
	4. Pharmacocinétique du Treprostinil et de l'ACT-333679 lors de l'application sur ulcère .....	186
	5. Discussion et conclusion de l'étude de pharmacocinétique et pharmacodynamie.....	189
B.	Étude 2 : Cicatrisation sur modèle d'ulcération diabétique sur la souris db/db .....	192
	1. Introduction et Protocole expérimental .....	192
	2. Méthodes .....	193
	3. Résultats de cicatrisation sur 24 jours .....	196
	4. Résultats histologiques de cicatrisation intermédiaire à 4 et 9 jours.....	205
	5. Analyse histologique de la peau .....	207
C.	Conclusion des études animales .....	210
D.	Références .....	212

## A. Etude 1 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie après application des formulations d'agonistes des récepteurs de la prostacycline nanoencapsulés sur souris saines

### 1. Introduction et protocole expérimental

Dans la partie précédente, nous avons sélectionné des principes actifs encapsulés dans des nanoparticules lipidiques au sein d'une formulation de type gel en fonction de leur capacité d'encapsulation totale et au cœur des nanoparticules et de leur stabilité sur 6 mois. Les 3 formulations candidates retenues étaient le tréprostinil nanoencapsulé dans des nanoparticules lipidiques cationiques de 80 nm (C80) ; et l'ACT 333679 dans des nanoparticules lipidiques neutres et cationiques de 80 nm (N80 et C80). Nous avons ensuite réalisé deux formulations de type émulsion lipidique correspondant aux nanoparticules lipidiques cationiques et neutres de 80 nm pour pouvoir évaluer l'effet propre des nanoparticules non chargées. En effet, la nature des nanoparticules lipidiques cationiques de 80 nm est la même pour le treprostinil et l'ACT-333679, ce qui nous a permis d'utiliser une seule émulsion comparatrice.

Dans cette partie, nous avons réalisé une étude de pharmacocinétique et de pharmacodynamie des formulations, in vivo après application sur ulcère sur modèle murin. Nous avons choisi de nous rapprocher de notre modèle expérimental de cicatrisation avec un ulcère excisionnel complet, l'alternative non choisie aurait été de réaliser des études de pénétration/permeation ex vivo.

Ce protocole expérimental a été accepté par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation sous le numéro 12029-2017100309291846. Le protocole expérimental est représenté dans la Figure III-1.

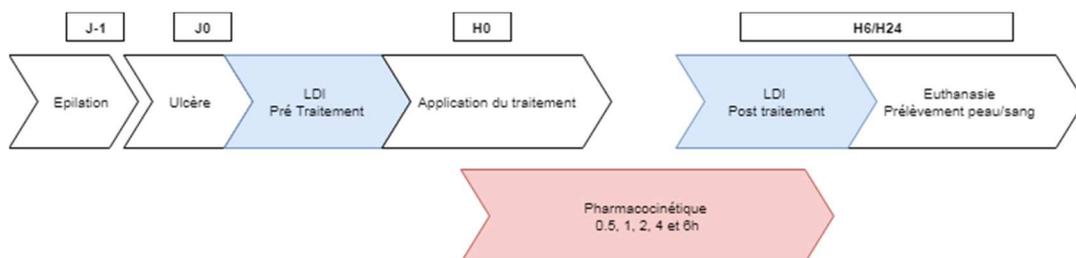


Figure III-1 : Protocole expérimental de pharmacocinétique et de pharmacodynamie sur ulcère sur souris saines

Nous avons utilisé des souris C57Bl/6 males âgées de 12 semaines provenant d'Envigo. Un jour avant la réalisation des ulcères, nous réalisons une épilation au niveau du dos de l'animal avec un rasoir électrique et de la crème dépilatoire (Veet). Le jour de l'ulcère, nous réalisons une injection sous cutanée de buprénorphine (0.1mg/kg) en préopératoire afin de limiter les douleurs liées à la réalisation des ulcères. Nous réalisons ensuite deux ulcères sur le dos de l'animal à l'aide d'un punch à biopsie de 6mm et de ciseaux. Une mesure du flux basal par des techniques d'imagerie bidimensionnelles détaillées plus loin, le *Laser Doppler Imaging* (LDI) et *Tissue Viability Imaging* (TiVI), est ensuite réalisée 5 minutes après la réalisation des ulcères. La formulation est ensuite appliquée directement sur l'ulcère (environ 50 µL) et les ulcères sont protégés par un film adhésif transparent (Tegaderm). Pour chaque animal, un ulcère sert de contrôle avec l'administration du véhicule associé au traitement, la position du traitement étant randomisée entre la droite et la gauche.

Les traitements ont été appliqués pendant une durée totale de 6 ou 24 h. Durée après laquelle, une mesure de flux post traitement est réalisée et l'animal est euthanasié. Pour chaque groupe de traitement, 8 animaux ont été utilisés pour chaque série soit 16 animaux pour obtenir les points post traitements à 6 et 24 h. La moitié des animaux (4 par temps de suivi) ont subi un suivi pharmacocinétique pour la quantification du passage systémique du traitement.

## 2. Méthodes

### a) *Pharmacocinétique systémique et tissulaire*

Le prélèvement de sang a été réalisé au niveau de la queue de l'animal. Cette méthode permet de diminuer le nombre d'animaux utilisés par rapport aux méthodes classiques de prélèvement pharmacocinétique.<sup>1</sup> L'extrémité de la queue est coupée aux ciseaux lors de l'anesthésie et ensuite on peut venir prélever du sang à l'aide d'un microcapillaire hépariné.

Nous récoltons ainsi 70 µl de sang qui sont ensuite centrifugés à 5000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C afin de récolter le plasma (environ 30µL). Le plasma est conservé à -80 °C avant l'analyse par HPLC MS/MS réalisée par le CHU Grenoble dans le service du Pr F Stanke-Labesque. Pour les prélèvements terminaux (à 6 ou 24 h), le sang a été prélevé par ponction intracardiaque.

Les échantillons de peau sont prélevés aux temps terminaux (6 h ou 24 h). Il s'agit d'un carré d'environ 144 mm<sup>2</sup> comprenant les berges circulaires de l'ulcère. L'échantillon de peau est pesé avant d'être congelé dans de l'azote liquide et stocké à -80 °C. Les principes actifs ont été

extraits de la peau totale en la broyant la peau à l'aide d'un Precellys et de 0,5 ml d'un mélange de 70 % de méthanol et de 30 % d'acide formique 0.1%. Le tube est lavé 3 fois avec 0,5 ml de la solution de broyage et les 2 ml résultants sont centrifugés à 4 °C à 15 000 rpm pendant 15 minutes afin de récolter le surnageant. Le surnageant est stocké à -80 °C avant l'analyse par HPLC MS/MS réalisée par le CHU Grenoble.

### *b) Mesure de flux par Imagerie Laser Doppler (LDI)*

L'imagerie par Laser Doppler est l'une des méthodes qui permet d'évaluer le flux sanguin de la microcirculation cutanée. Elle repose sur l'interaction d'une source de lumière proche infrarouge monochromatique (780 nm) avec les globules rouges circulants dans la microcirculation cutanée. Les photons rencontrant des structures cutanées sont diffusés et réfléchis. Lorsque ces structures sont en mouvement (principalement les globules rouges), les ondes réfléchies subissent un décalage de leur longueur d'onde apparente, l'effet Doppler. L'effet doppler est corrélé à la fois au nombre et à la vitesse des globules rouges présents dans la microcirculation cutanée. Nous utilisons un imageur doppler (PeriSCAN PIM 3, Perimed) qui permet la mesure du flux sanguin cutané sans contact et sur une région donnée.<sup>2</sup>

Nous avons réalisé des mesures sur 5 minutes afin d'obtenir un flux moyenné avec environ 1 minute/scan. Ces mesures sont réalisées en prétraitement (après la réalisation de l'ulcère) et en post traitement (à 6 h ou 24 h de suivi). Pour l'analyse des résultats, le logiciel d'analyse nous permet de définir des aires d'intérêts circulaires concentriques qui représentent les différentes zones de la plaie comme montré sur la Figure III-2.

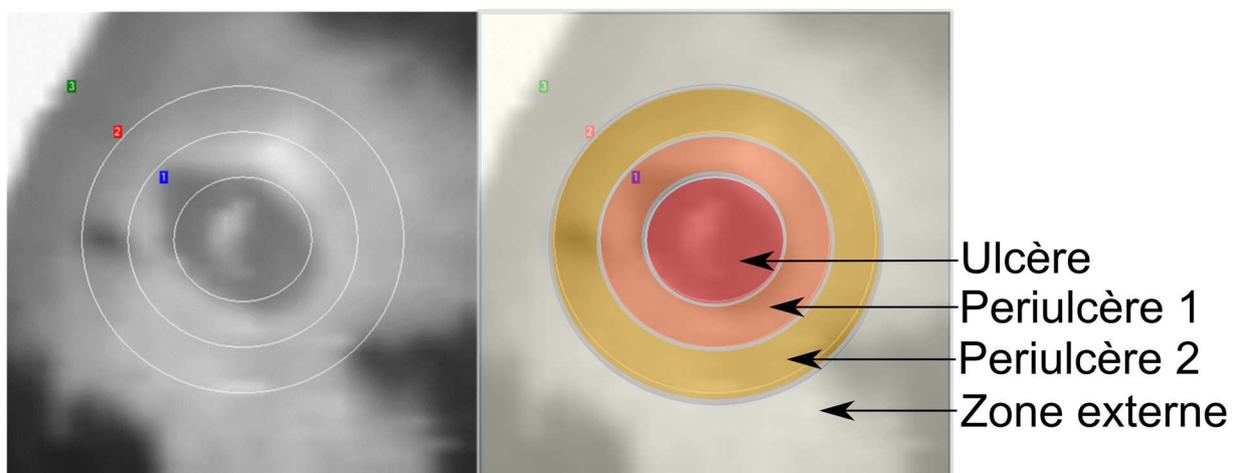


Figure III-2 : Quantification du flux sanguin au niveau de l'ulcère (cercle central), de sa berge périulcéreuse (cercle intermédiaire) sur le logiciel PimSoft La zone 1 correspond à la zone de l'ulcère, la zone 2 la zone périulcérée et la zone 3 une zone périulcérée extérieure.

Afin de quantifier la perfusion uniquement dans les zones péri-ulcérées, nous avons soustrait de son aire la perfusion de la zone ulcérée. L'Équation III-1 rapporte le calcul utilisé pour cette mesure pour la zone 2 qui représente la peau périulcère.

$$\text{Perfusion dans la zone périulcérée uniquement} = \frac{(\text{Perfusion}_2 \times \text{Aire}_2) - (\text{Perfusion}_1 \times \text{Aire}_1)}{(\text{Aire}_2 - \text{Aire}_1)}$$

*Équation III-1 : Calcul de la perfusion dans la zone péri-ulcéré*

Dans cette étude, les animaux ont un suivi temporel prolongé pour lequel il est difficile de disposer des conditions de réalisation strictement identiques et contrôlées. Par conséquent, nous avons choisi de normaliser l'analyse des données en pourcentage de l'ulcère contrôle avec le véhicule sur chaque animal afin de limiter les variabilités du flux sanguin liées à l'animal au cours du temps prolongé d'observation. Nous exprimons donc la perfusion d'une zone traitée par rapport à la perfusion de la zone controlatérale véhicule sur le même animal selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Perfusion de la zone}_i \text{ (Ulcère Traité) (\%)} = \frac{\text{Perfusion Ulcère Traité}_{\text{zone } i} \times 100}{\text{Perfusion Ulcère véhicule}_{\text{zone } i}}$$

*Équation III-2 : Calcul de la perfusion sur l'ulcère traité*

### *c) Mesure de perfusion par imagerie de viabilité tissulaire*

L'imagerie de viabilité tissulaire (Tissue Viability Imaging ou TiVI) est une technique de quantification de la microcirculation utilisant la spectroscopie de lumière polarisée. Une lumière blanche polarisée est envoyée sur la peau. Un filtre polarisant placé au niveau de la caméra permet de séparer la lumière directement réfléchiée par le tissu qui conserve son état de polarisation, de la lumière qui diffuse dans le tissu et qui se dépolarise (voir Figure III-3). La différence d'absorption des globules rouge dans le spectre visible permet d'estimer la concentration locale en globules rouge et ainsi une estimation de la perfusion cutanée.<sup>3,4</sup> Comme le LDI, les mesures ont été réalisées en pré et post traitement. La perfusion a été estimée sur la zone ulcérée et sur la peau périphérique car il était impossible de quantifier dans la zone périulcérée comme décrit dans la Figure III-3. En effet, le logiciel utilisé ne permettait pas la réalisation de zones d'intérêt circulaires comme le LDI. L'avantage principal de cette méthode est la vitesse d'acquisition des images par rapport au LDI mais elle est limitée par la profondeur de pénétration de la lumière blanche et par le capteur.

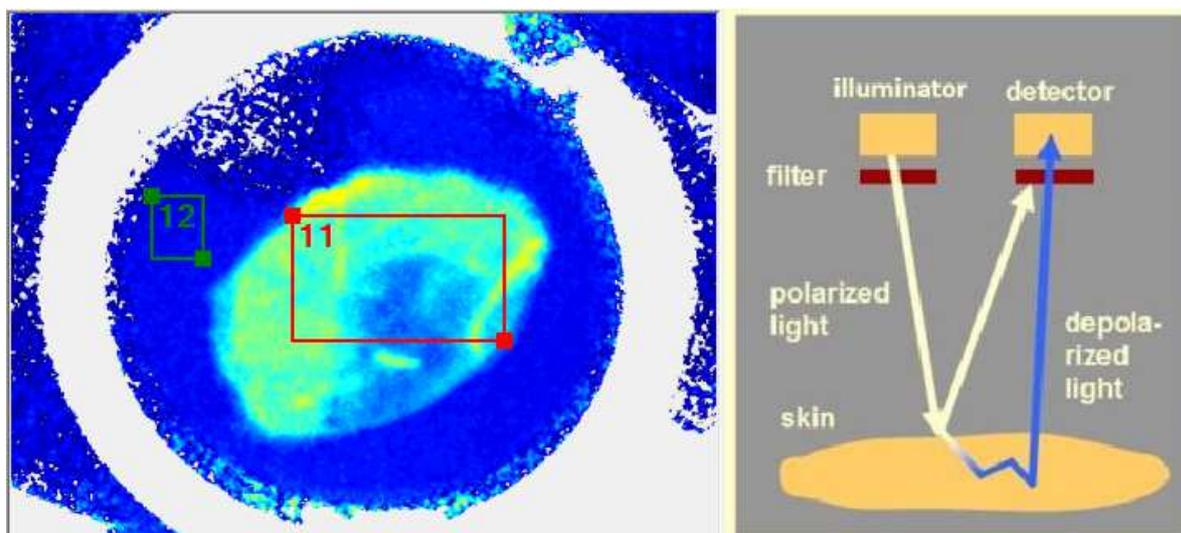


Figure III-3 : Protocole de mesure de concentration en globule rouge et Principe de mesure du TiVI

#### d) Méthodes HPLC

Les méthodes HPLC utilisées pour ce travail nécessitaient une précision importante afin de déterminer la concentration. C'est pourquoi nous avons utilisé une méthode avec une limite de détection faible (ordre du pg/ml).

#### Tréprostinil

La méthode pour la détection plasmatique du Tréprostinil est décrite dans la littérature.<sup>5</sup> La limite de quantification a été fixée à 7.2pg/ml dans cette étude.

#### ACT-333679

La méthode de quantification de l'ACT-333679 n'est pas décrite, et doit être totalement mise au point. Elle est en cours de mise au point dans le laboratoire du Pr Stanke-Labesque mais n'a pas pu être réalisée afin de quantifier les prélèvements réalisés dans le cadre de cette thèse.

#### e) Analyse statistique

La quantification des données (emplacement des régions d'intérêt (ROI) et calcul des perfusions dans chaque zone) de LDI et TiVI a été réalisée en aveugle. L'analyse statistique a été réalisée sous SPSS (IBM, version 25). Les données de LDI et de TiVI ne suivaient pas une loi normale, nous avons réalisé un Test non paramétrique pour la comparaison des données pré et post traitement (Wilcoxon Rank Signed Test). Nous avons analysé les données de perfusion au

niveau de l'ulcère et au niveau de la peau périulcérée. Les résultats de pharmacocinétiques sont représentés en données individuelles ainsi qu'en médiane  $\pm$  écart interquartile.

### 3. Effet pharmacodynamique de l'administration de treprostinil ou d'ACT-333679

Lors de l'administration du treprostinil directement au niveau de la plaie, nous avons observé visuellement des saignements dans deux groupes (EM et C80), l'effet étant présent au minimum 30 minutes après l'application. Ces saignements ne dépendaient pas de la nature de la formulation, les saignements ayant été présents sur 9/16 et 7/16 souris pour les formulations EM et C80 respectivement. Par contre, le saignement était strictement limité à l'ulcère traité par treprostinil, l'ulcère controlatéral ne présentant aucun saignement, ce qui impliquait la responsabilité du treprostinil. Le saignement apparaissait sur les animaux de façon répétable environ 30 minutes après l'application du treprostinil, il n'était cependant pas possible de quantifier précisément le volume de cette perte sanguine. Cette perte sanguine a probablement influencé la pharmacocinétique et la pharmacodynamie du treprostinil.

Lors de l'application de l'ACT-333679 sous ses 3 formulations, aucun saignement n'est apparu.

#### *a) Perfusion cutanée mesurée par Laser Doppler Imaging*

Pour tous les groupes expérimentaux, on observe une forte variabilité du flux sanguin basal intersujet qui est surtout présente sur la zone ulcérée comme montré dans la Figure III-4. Les coefficients de variations (écart type\*100/moyenne) sont de 66% et de 38% dans la zone de l'ulcère et dans la zone périulcérée respectivement.

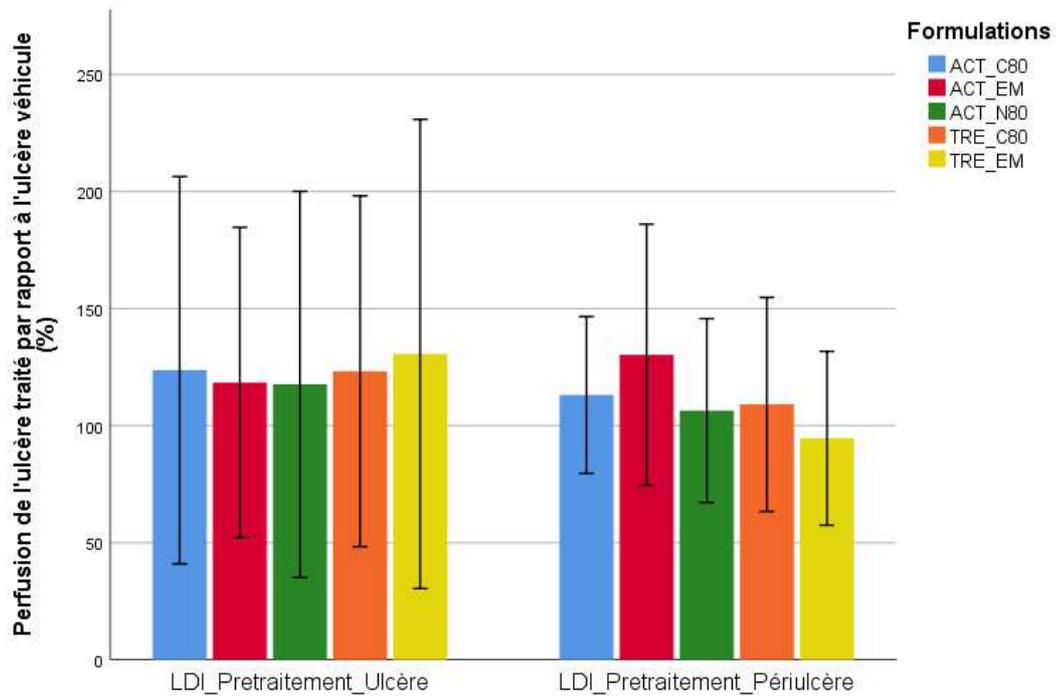


Figure III-4: Variabilité de la mesure de perfusion par LDI (moyenne  $\pm$  écart type, n=16 par traitement).

Les résultats de perfusions et les analyses statistiques sont présentés dans la Figure III-5 et le Tableau III.1. Pour l'ACT-333679, il existe une tendance à l'augmentation du flux dans toutes les zones, mais significative seulement pour la formulation ACT\_N80 au niveau de l'ulcère ( $p=0.025$ ) 6 h après l'administration. 24h après l'application, aucune variation de flux n'est observée.

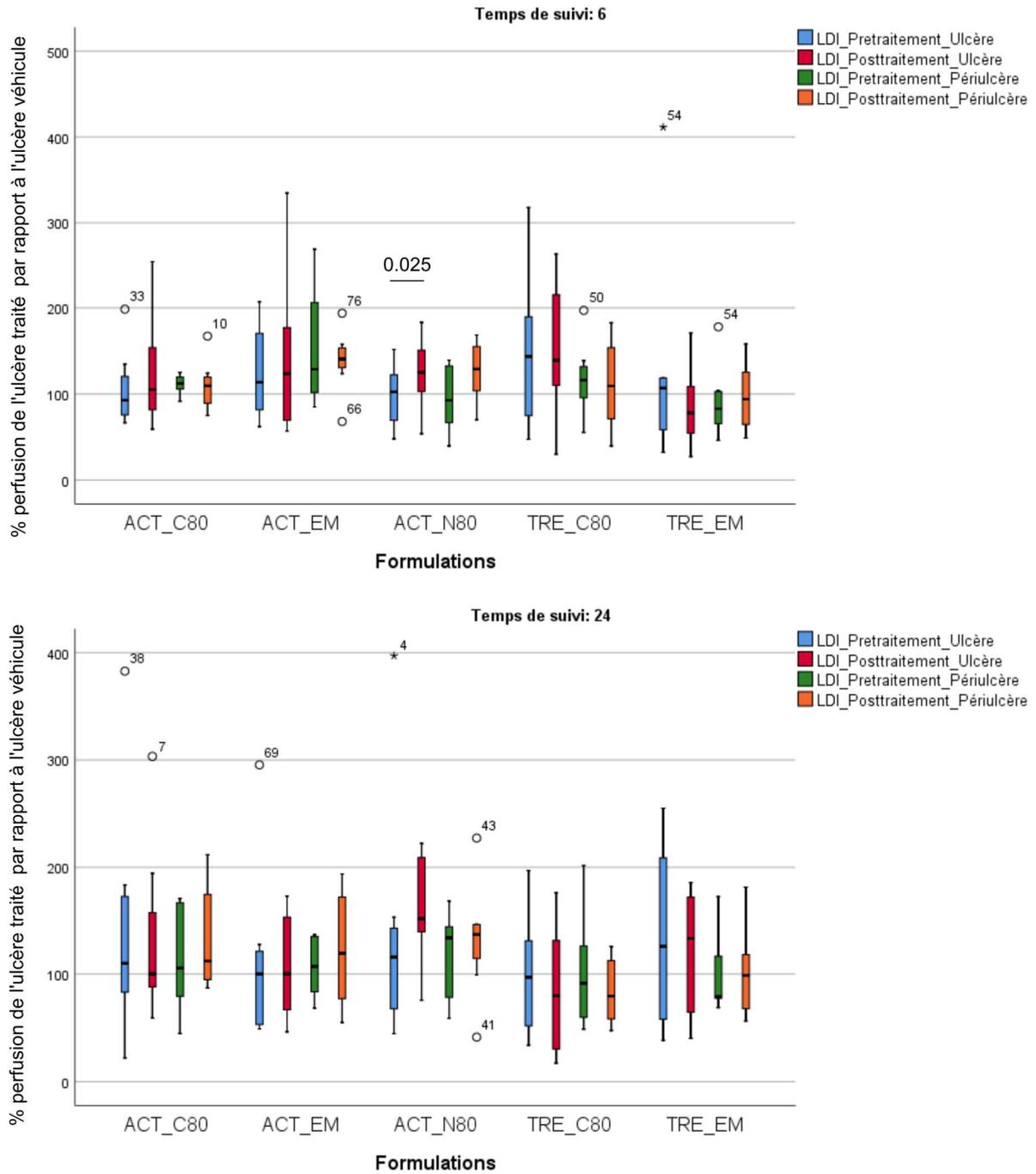


Figure III-5 : Résultats de pharmacodynamie obtenus sous LDI (n=8 par conditions)

Temps d'application	6 h		24 h	
	Ulcère	Periulcère	Ulcère	Periulcère
ACT_C80	0,263	0,674	1	0,484
ACT_EM	0,889	0,779	0,779	0,263
ACT_N80	<b>0,025</b>	0,093	0,401	0,484
TRE_C80	0,779	0,484	0,401	0,208
TRE_EM	0,484	0,484	0,779	0,889

Tableau III.2 : p.values obtenus par sous-groupes après un test non paramétrique de Wilcoxon (n=8)

### *b) Perfusion cutanée mesurée par Tissue Viability Imaging (TiVI)*

L'analyse des données a aussi été réalisée en pourcentage de l'ulcère véhicule sur chaque animal afin de limiter les variabilités liées à l'individu. Comme montré dans la Figure III-3, le logiciel utilisé permet seulement d'évaluer la perfusion dans des zones délimitées par des carrés limitant ainsi la pertinence de la mesure. Contrairement à la mesure par LDI, la variabilité de la mesure est inférieure avec des coefficients de variation de 11% et 10% dans la zone de l'ulcère et dans la peau adjacente respectivement.

Les résultats de concentrations sont présentés dans la Figure III-6 et les résultats statistiques résumés dans le Tableau III.3.

On observe ainsi une augmentation significative de la concentration en globules rouges pour les groupes TRE\_C80 et TRE\_EM à 24 et 6 h respectivement. Cette augmentation s'explique parfaitement par l'observation des saignements au niveau des plaies. Ainsi nous observons bien une différence majeure entre le treprostnil et l'ACT-333679. Contrairement aux mesures en LDI, nous n'observons pas d'augmentation pour le groupe de traitement ACT\_N80 en termes de concentration en globules rouges.

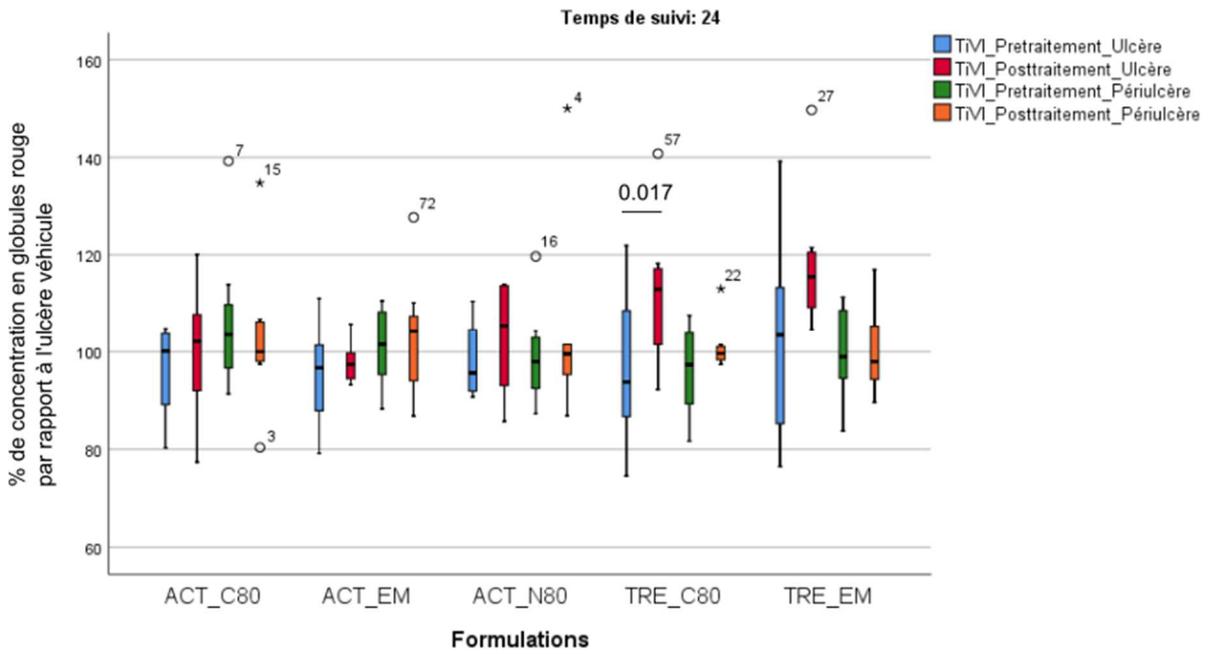
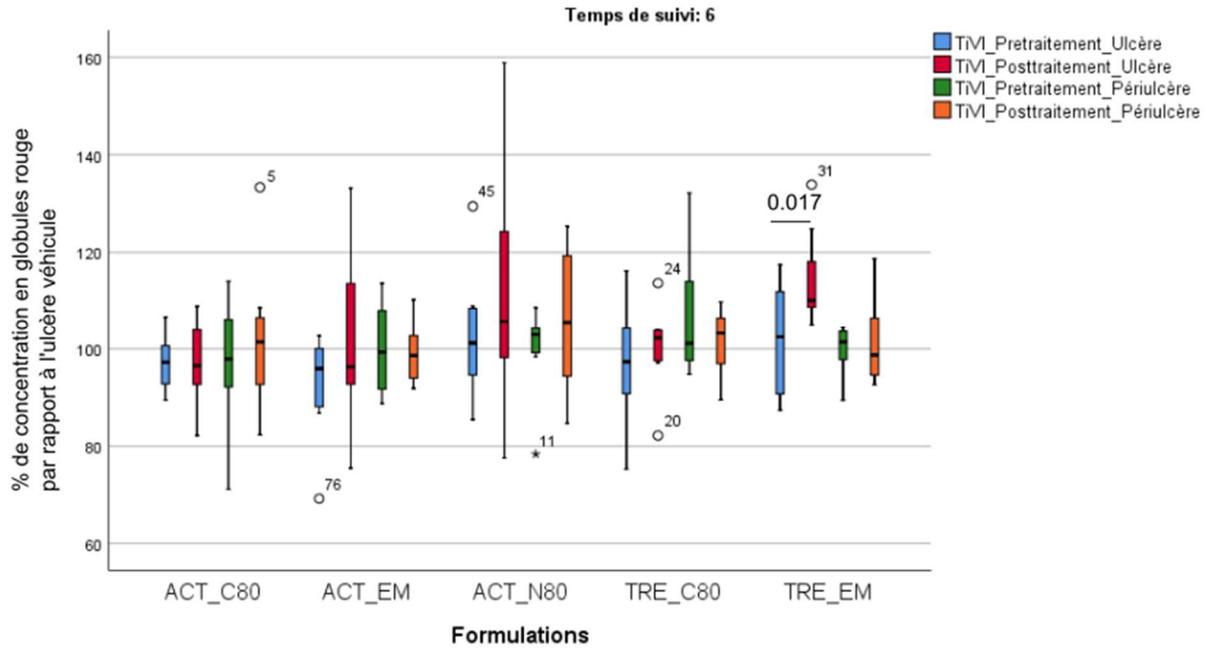


Figure III-6 : Résultats TiVi en fonction du temps d'administration et du traitement.

Temps d'application	6 h		24 h	
	Ulcère	Periulcère	Ulcère	Periulcère
ACT_C80	0.889	0.889	0.327	0.735
ACT_EM	0.093	0.889	0.575	0.779
ACT_N80	0.484	0.779	0.327	0.889
TRE_C80	0.674	0,401	<b>0.017</b>	0.263
TRE_EM	<b>0.017</b>	0,575	0.123	0.889

Tableau III.3 : Résultat de l'analyse statistique pour les données de TiVI, n=8. Wilcoxon Rank Test

#### 4. Pharmacocinétique du Treprostinil et de l'ACT-333679 lors de l'application sur ulcère

##### a) Treprostinil

Les figures suivantes présentent les résultats de pharmacocinétique du Tréprostinil lors de l'application pendant 6 ou 24 h de 750µg/g de Treprostinil encapsulé dans des nanoparticules lipidiques cationiques ou dans les émulsions contrôle.

Au niveau systémique, on observe une plus forte exposition au Tréprostinil lorsque celui-ci est administré par l'intermédiaire des nanoparticules cationiques comme montré dans la Figure III-8. Nous avons pu quantifier du Tréprostinil à 24h chez 2/4 animaux dans ce groupe faisant ainsi l'état d'un relargage prolongé pour cette forme galénique. Pour les deux formulations, on observe un pic plasmatique précoce à 30 minutes pour une majorité des animaux. Ensuite on observe une décroissance exponentielle (linéaire sur le graphique, car représentation en semi-log). La décroissance semble plus prononcée pour les émulsions, en effet à 6 h 4/8 animaux présentent des concentrations encore quantifiables contre 6/8 animaux pour les nanoparticules cationiques. L'exposition systémique représentée par l'AUC est supérieure pour le groupe TRE\_C80, mais cette différence est non significative (Test de Mann Whitney U, p.value 0.083).

Inversement, au niveau tissulaire (Figure III-9), on observe une forte variabilité en particulier pour les émulsions. On retrouve une plus forte concentration en Treprostinil au niveau de la peau pour les formulations émulsions par rapport aux formulations C80.

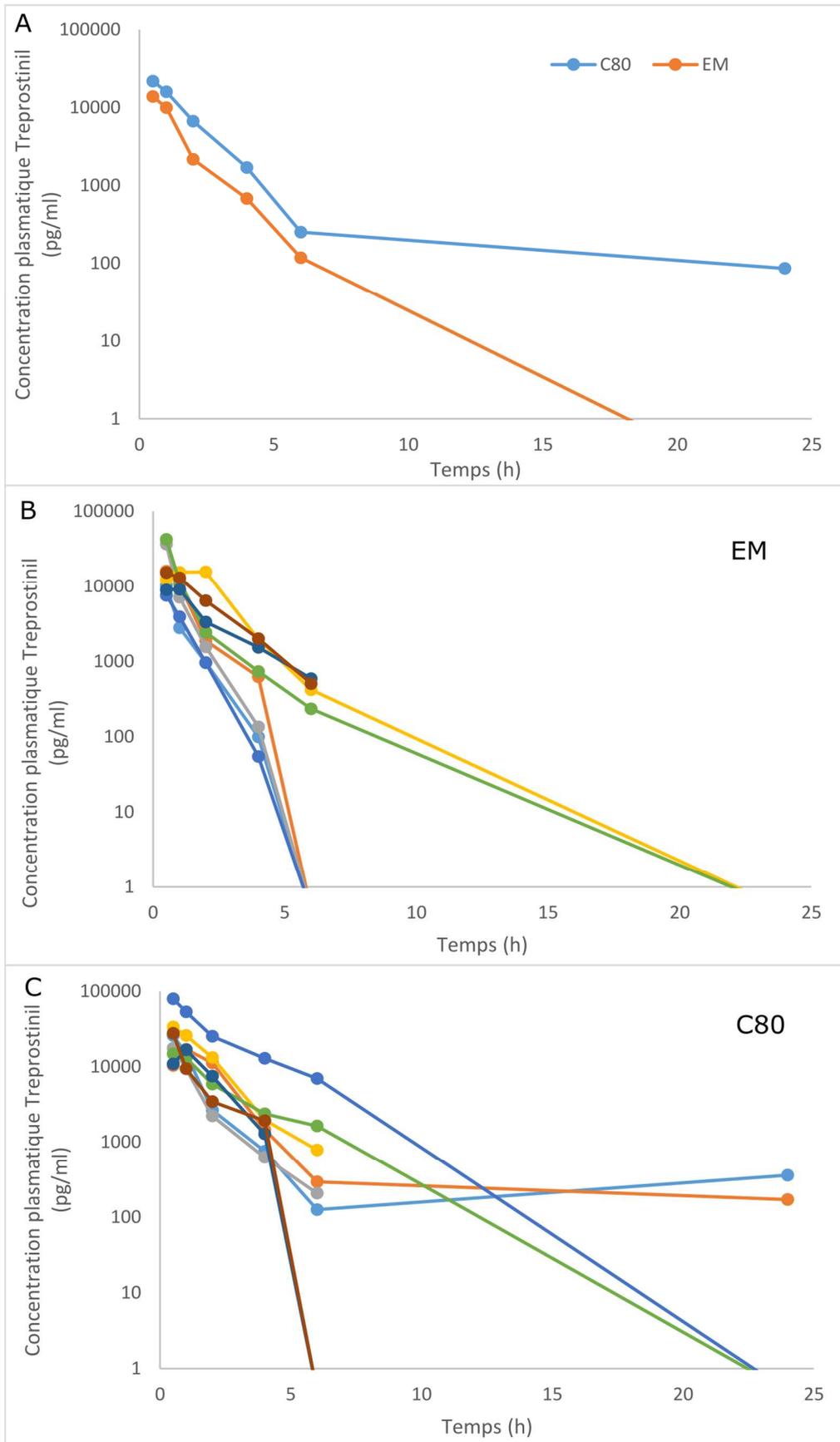


Figure III-7 : Concentration plasmatique en Treprostinil. Valeur médiane (A) et données individuelles par souris (B et C)

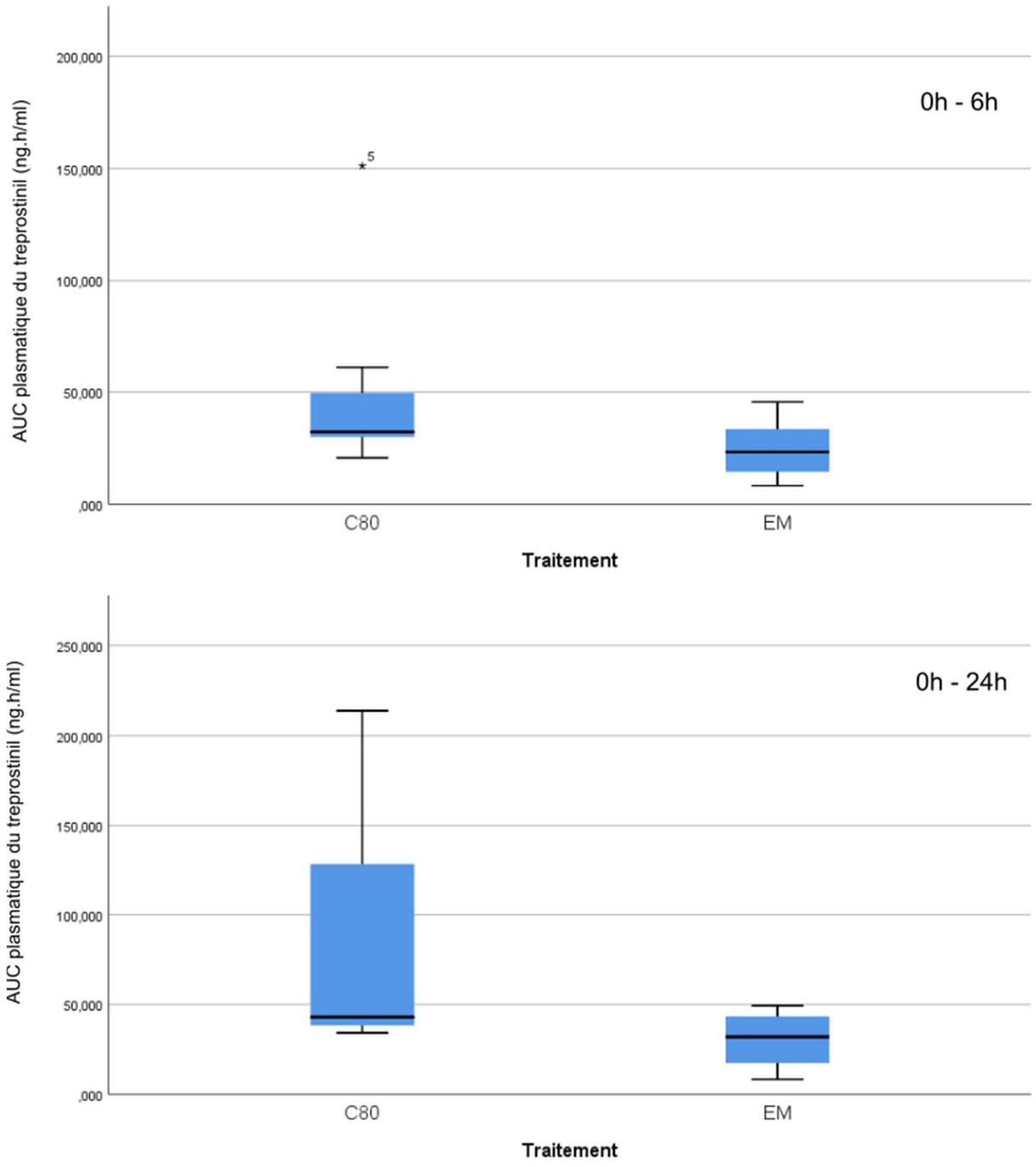


Figure III-8 : Exposition plasmatique au Treprostinil lors de l'administration. n=8 pour l'intervalle 0h-6h et n=4 pour l'intervalle 0h-24h.

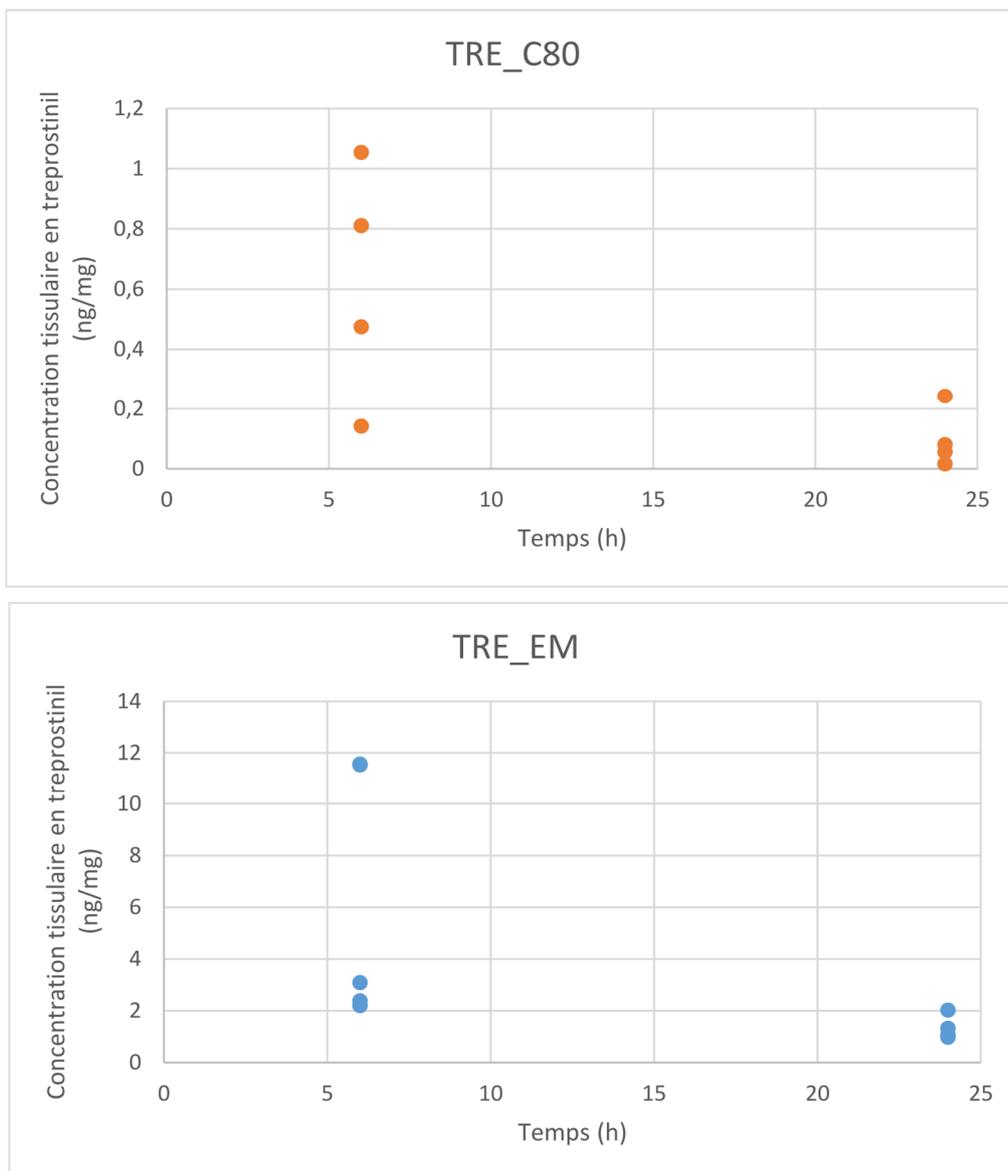


Figure III-9 : Concentration tissulaire en Treprostiniil en fonction de la formulation administrée

### b) ACT-333679

La méthode d'analyse étant encore en développement (méthode MS/MS avec limite de quantification de l'ordre du pg/ml), nous n'avons pas de résultat pour la pharmacocinétique de l'ACT-333679 au niveau systémique et de l'ulcère.

## 5. Discussion et conclusion de l'étude de pharmacocinétique et pharmacodynamie

### a) Effet pharmacocinétique

Sur ce modèle de plaie, nous avons pu montrer que l'utilisation de nanoparticules lipidique ou d'émulsion permet un relargage systémique retardé de la molécule. L'administration de Tréprostiniil par les nanoparticules cationiques semble associée à un plus important passage

systémique. Cet effet peut être médié par la capacité de pénétration tissulaire plus importante des nanoparticules par le fait de leur plus faible taille. En ce qui concerne les concentrations dermiques, les données sont à mettre en perspective, car dans cette étude aucun nettoyage du stratum corneum n'a été réalisé au niveau de la peau des berges de la plaie par tape stripping. Ce risque de biais rend l'interprétation difficile. Ces résultats sont à confirmer avec les résultats de pharmacocinétique des groupes ACT-333679.

#### *b) Effet pharmacodynamique*

L'apparition du saignement dans l'heure suivant l'administration de Tréprostinil est un effet qui n'était pas attendu, mais logique sur un plan pharmacodynamique. Le Tréprostinil est un antiagrégant plaquettaire inhibant l'agrégation par son action sur les récepteurs IP, EP2 et DP1 présent au niveau des plaquettes. Il est néanmoins étonnant que nous n'ayons pas observé cet effet antiagrégant plaquettaire pour l'ACT-333679. En effet, la prostacycline a été découverte par son effet antiagrégant plaquettaire par l'action sur le récepteur IP, récepteur ciblé par l'ACT-333679. Cette absence d'effet de l'ACT-333679 peut être médiée par un passage systémique limité ou l'activation sélective du récepteur IP n'est pas suffisante à l'inhibition plaquettaire par rapport aux signaux prothrombotiques présents au début de la cicatrisation.

L'effet pharmacodynamique observé en LDI pour le groupe ACT-N80 semble étonnant. En effet, sa concentration appliquée est la plus faible des 3 formulations ACT. Cet effet observé est néanmoins faible et est impacté par l'absence de contrôle des erreurs de type I par correction pour des tests statistiques multiples. Au niveau statistique également, cette étude était fortement en sous-effectif par rapport à la variabilité de la mesure observée avant traitement. Un calcul d'effectif en prenant en compte la variabilité de l'étude montre une étude raisonnablement puissante (risque alpha 0.05 et risque bêta 0.8) demanderait un effectif de 27 animaux afin de montrer une augmentation de la perfusion de 20% (Gpower 3.1.9.4, t tests comparaison d'échantillons appariés).

L'utilisation du TiVI permet d'avoir une idée rapide de la perfusion cutanée, mais il est évident que cet appareil est limité par rapport au LDI. Il permet finalement surtout de quantifier le saignement.

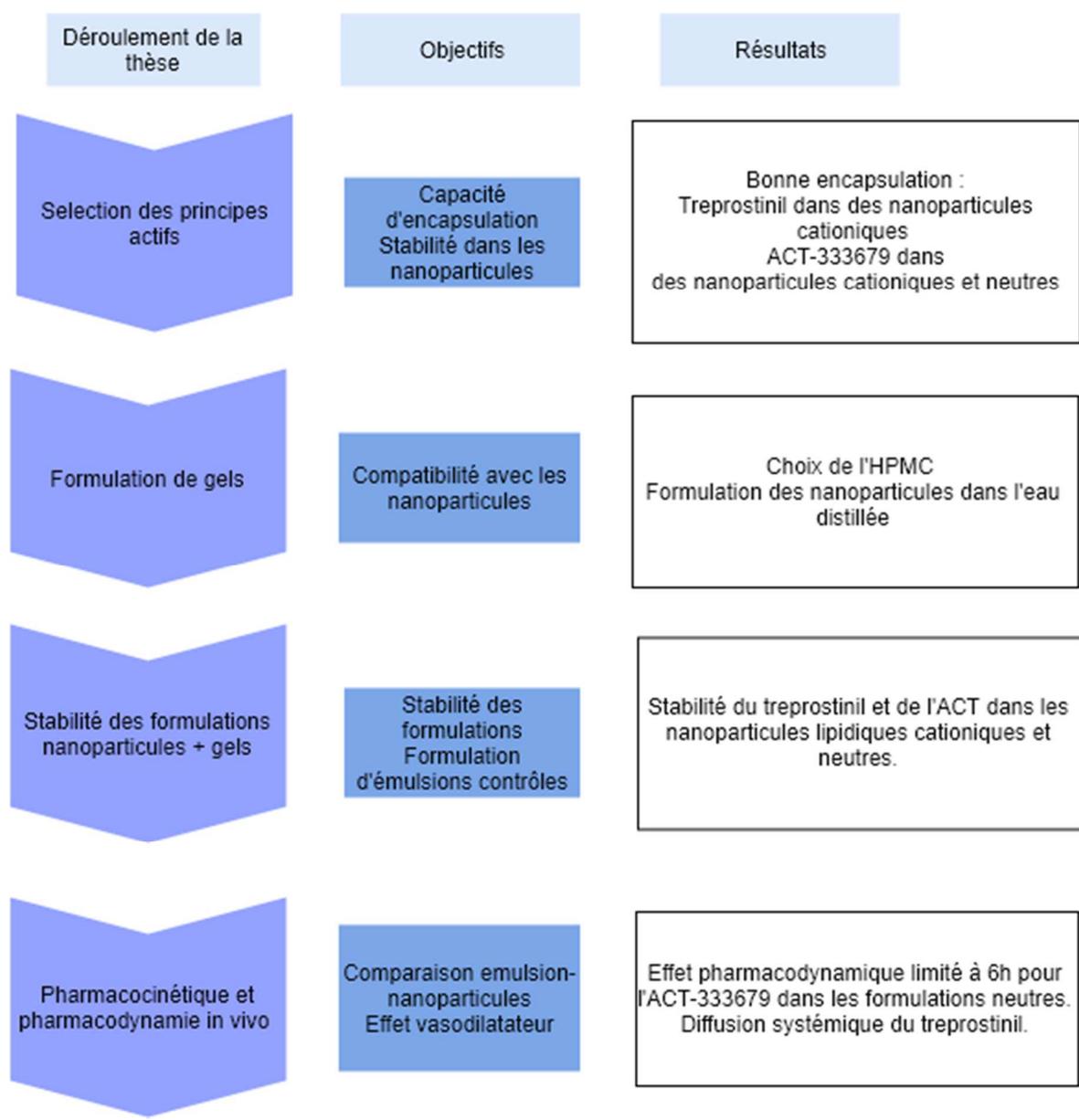


Figure III-10 : Objectifs et Résultats de thèse après la première phase animale

## B. Étude 2 : Cicatrisation sur modèle d'ulcération diabétique sur la souris db/db

### 1. Introduction et Protocole expérimental

Les données de l'étude d'une application unique sur plaie par excision ont montré un passage systémique du Treprostinil, mais nous n'avons pas observé de différences majeures en pharmacodynamie. Par conséquent, ces données ne permettaient pas de faire un choix scientifique de formulation pour l'étude de cicatrisation et nous avons décidé de poursuivre l'étude, sur la cicatrisation sur un modèle de souris diabétique avec les mêmes formulations, c.-à-d. Tréprostinil nanoencapsulé dans des nanoparticules lipidiques cationiques de 80 nm (C80) ; l'ACT 333679 dans des nanoparticules lipidiques neutres et cationiques de 80 nm (N80 et C80), et émulsions correspondantes C80 et N80.

Ce protocole expérimental a été accepté par le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation sous le numéro 12029-2017100309291846. Le protocole expérimental est représenté dans la Figure III-11.

Nous avons utilisé la souris db/db (KO pour le récepteur de la leptine) comme modèle de plaie diabétique.<sup>8</sup> Nous avons utilisé des souris mâles âgées de 12 semaines achetées chez Janvier (Janvier Labs, France). Elles ont été logées en cages de 6 avec un changement de litière deux fois par semaine (lundi, jeudi) à cause de la polyurie importante de ces animaux.

À J-2, les animaux ont été mis à jeun le matin pendant 6 h afin de mesurer la glycémie à l'aide d'un glucomètre (OneTouchVario) en récupérant une goutte de sang sur la queue de l'animal. Le jour suivant (J-1 avant ulcère), les animaux ont été anesthésiés sous isoflurane (4 % induction et 2 % maintien) et le dos a été épilé à l'aide d'un rasoir électrique et de crème dépilatoire. À J0, 30 minutes avant la création de l'ulcère, nous réalisons une injection sous-cutanée de buprénorphine (0.1 mg/kg) pour l'analgésie préopératoire. Après anesthésie par isoflurane (4 % induction et 2 % maintien), deux ulcères sont ensuite réalisés par excision à l'aide d'un punch à biopsie de 6mm et de ciseaux pour obtenir une taille d'ulcère d'environ 60 mm<sup>2</sup>.

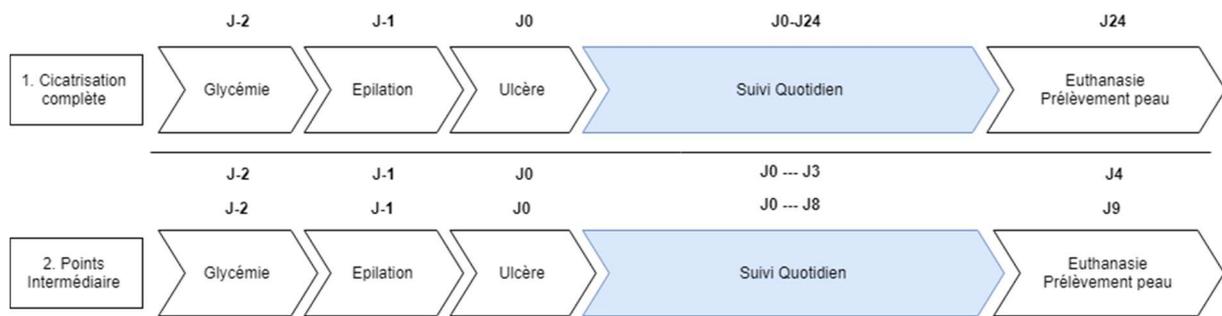


Figure III-11 : Protocoles expérimentaux de cicatrisation sur les souris db/db.

Les ulcères sont photographiés à l'aide d'un appareil photo (Panasonic DMC-GF3) monté sur une loupe binoculaire. Un référentiel de taille est placé sur chaque ulcère afin de pouvoir mesurer la taille de l'ulcère par planimétrie. Le traitement consiste en l'application de 50 mg de gel dans l'ulcère. La plaie est ensuite protégée par l'application d'un pansement transparent (Tegaderm). L'animal est ensuite réveillé et retourne dans sa cage avec ses congénères. Le suivi photographique et l'application du traitement est réalisé tous les jours comme montré dans la Figure III-12. Une fois le protocole terminé (J24), nous réalisons une biopsie des ulcères cicatrisés. Ensuite l'animal est euthanasié par dislocation cervicale. L'allocation des traitements a été réalisée de manière randomisée. Comme pour l'étude n°1, les souris ont reçu un des traitements et l'ulcère non traité le véhicule ou aucun traitement (sham).

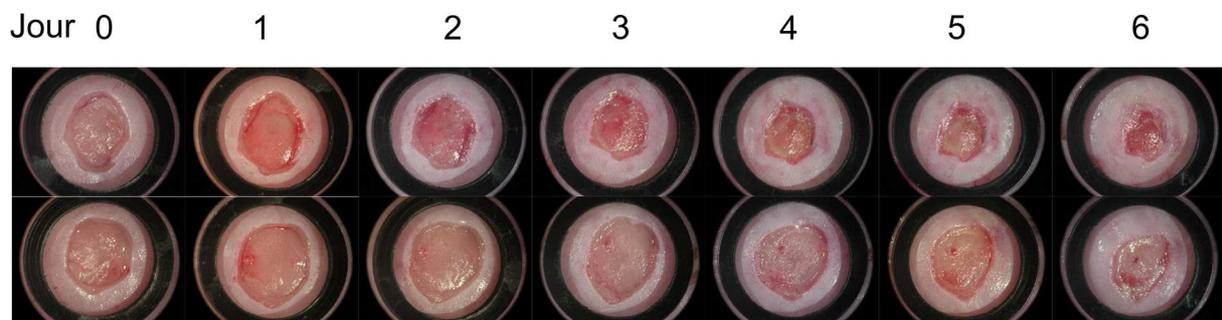


Figure III-12 : Exemple de suivi photographique des ulcères

## 2. Méthodes

### a) Modèle animal

Le modèle génétique db/db est l'un des modèles le plus utilisé en préclinique pour la cicatrisation d'ulcère diabétique.<sup>8</sup> L'absence du récepteur de la leptine provoque une altération de la satiété et du métabolisme. Les souris db/db présentent une hyperinsulinémie à deux semaines qui évolue vers une obésité et une hyperglycémie à partir de 4 semaines de vie. Elles

présentent un retard de cicatrisation de plaies excisionnelles et ischémiques.<sup>8,9</sup> Le retard de cicatrisation est associé à une dysfonction de la contraction et de la réépithélisation.<sup>10</sup>

Les souris db/db présentent un phénomène de contraction limité par rapport aux autres modèles murins ce qui permet de limiter l'utilisation d'un dispositif de contraction.<sup>10,11</sup> La taille des souris permet également facilement la réalisation de plusieurs ulcères par animaux : dans cette étude 2 mais certaines études appliquent plus de 2 ulcères par animaux.<sup>8</sup>

### *b) Mesure de la taille de l'ulcère par planimétrie*

La mesure de la taille de l'ulcère est réalisée sous ImageJ. À l'aide de l'étalon présent sur chaque image, nous venons mesurer le périmètre externe de la plaie.<sup>12</sup> La mesure est réalisée en aveugle avec randomisation des photos. La taille de l'ulcère est ensuite exprimée en tant que pourcentage de la taille initiale de l'ulcère comme indiqué dans l'équation ci-dessous.

$$\text{Fermeture de l'ulcère } J_i(\%) = \frac{(\text{Taille Ulcère } J_0 - \text{Taille Ulcère } J_i) * 100}{\text{Taille Ulcère } J_0}$$

*Équation III-3 : Calcul du pourcentage de fermeture de l'ulcère au jour i*

Il existe plusieurs méthodes de mesures de la surface de la plaie, mais la méthode photographique a fait ses preuves par sa simplicité et sa robustesse par rapport aux autres méthodes. Cette méthode ne permet pas par contre la mesure du volume de la plaie ce qui peut être un paramètre intéressant pour la mesure du tissu de granulation. D'autres méthodes sont capables de mesurer le volume de la plaie en addition aux autres paramètres comme le système Silhouette (Aranz).

### *c) Histologie*

Une partie des échantillons de peaux sont fixés dans une solution de formaldéhyde 4% à température ambiante pendant 24 h. Les échantillons sont ensuite immédiatement déshydratés ou stockés dans du PBS 1X à 4 °C avant la phase de déshydratation en fonction de la disponibilité de la plateforme (jours fériés/weekends). La déshydratation a été réalisée par un automate de déshydratation sur la plateforme d'histologie (Unité-Medico-Technique Universitaire de Cytologie-Histologie). La déshydratation consiste en des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70 % / 80 % / 95 % / 100%<sup>x3</sup> avec 1h par bain) puis de xylène (2 bains de 1 h) et ensuite une imprégnation du tissu dans la paraffine (2 bains de 1 h). Après déshydratation, les échantillons sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine afin de

pouvoir réaliser des coupes histologiques. L'inclusion est réalisée afin d'obtenir une coupe transversale de la peau. Les blocs sont ensuite découpés sur un microtome avec une épaisseur cible de 5µm. Les coupes sont ensuite stockées à 4 °C après séchage afin de préserver l'expression des marqueurs tissulaires.<sup>13</sup>

#### *d) Coloration hématoxyline éosine*

La coloration hématoxyline éosine est la coloration la plus couramment utilisée pour l'analyse de tissus fixés en paraffine. Après déshydratation, les lames sont trempées pendant 5 minutes dans de l'hématoxyline de Mayer (Sigma). Les lames sont nettoyées à l'eau du robinet et sont trempées pendant 10 secondes dans l'éosine aqueuse 1% afin de les contre-colorer. Après rinçage dans l'eau du robinet, les lames sont déshydratées et montées en lames-lamelles.

#### *e) Analyse statistique*

Les données sont exprimées en tant que moyenne  $\pm$  écart type. Pour la première série d'animaux, le nombre d'animaux a été calculé en fonction de la taille d'effet observée lors d'études précédentes sur l'iontophorèse de Treprostinil sur ce même modèle.

À cause d'aléas expérimentaux (voir 3.b), les analyses statistiques pour l'ACT-333679 et le Tréprostinil ont été séparées. Les données pour le Tréprostinil ont été analysées à l'aide d'un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi de test non paramétrique de Mann Whitney avec une correction de Bonferonni (n=2). Les données de la série ACT-333679 ont été analysées à l'aide d'un modèle linéaire général avec comme facteur fixe le traitement appliqué et en variable aléatoire l'animal. Nous avons ensuite réalisé les comparaisons suivantes avec une correction de bonferonni (n=6) :

- ACT\_C80 – C80
- ACT\_EM – EM
- ACT\_N80 – N80.
- Sham – C80
- Sham – N80
- Sham - EM

### 3. Résultats de cicatrisation sur 24 jours

#### a) ACT-333679

L'attribution des traitements est décrite dans le Tableau III.4. Le Tableau III.5 résume les concentrations des formulations utilisées.

Groupe Traitement (nombre d'animaux)	Ulcère 1 (nombre d'ulcères)	Ulcère 2 (nombre d'ulcères)
ACT_C80 (12)	ACT_C80 (12)	C80 (9) + Sham (3)
ACT_N80 (12)	ACT_N80 (12)	N80 (9) + Sham (3)
ACT_EM (12)	ACT_EM (12)	EM (9) + Sham (3)

Tableau III.4 : Répartitions des animaux pour la phase de traitement par l'ACT-333679 sur 24j

Formulation	Concentration ( $\mu\text{g/g}$ )
ACT_C80	$736 \pm 17$
ACT_N80	$222 \pm 7$
ACT_EM	$327 \pm 13$

Tableau III.5 : Concentration moyenne des formulations utilisées pour l'ACT-333679 ( $n=6$ )

Comme montré dans le Tableau III.6, les souris présentent un phénotype diabétique avec une glycémie moyenne à 441mg/dl et une obésité par rapport à des souris contrôles du même âge (poids d'environ 25 grammes pour des souris db/+ à 12 semaines).

Caractéristiques	
Poids (g)	$44 \pm 3$
Glycémie à jeun (mg/dl)	$441 \pm 119$
Taille initiale d'ulcère ( $\text{mm}^2$ )	$59.0 \pm 7$

Tableau III.6 : Caractéristiques initiales des animaux traités par l'ACT-333679. Les données représentent la moyenne  $\pm$  l'écart-type.  $n=36$  pour les caractéristiques des animaux et  $n=72$  pour la taille initiale d'ulcère

On ne retrouve pas de différence significative sur la taille initiale d'ulcère sur les animaux utilisés (Anova,  $p.\text{value}=0.339$ ). Les résultats de cicatrisation sont représentés dans les figures pour les groupes ACT\_C80, ACT\_EM, et ACT\_N80 respectivement.

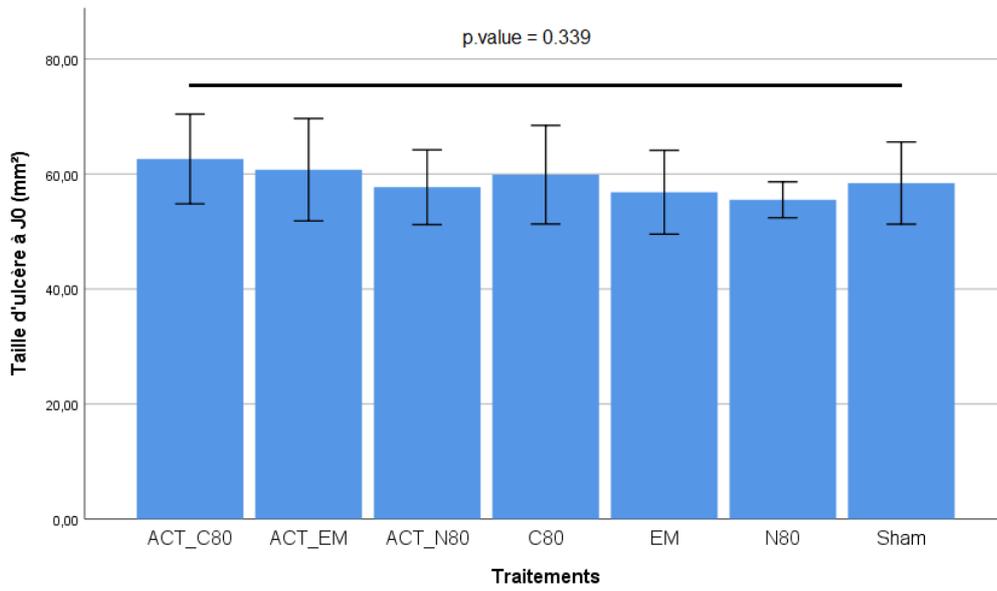


Figure III-13 : Taille initiale ulcère ACT

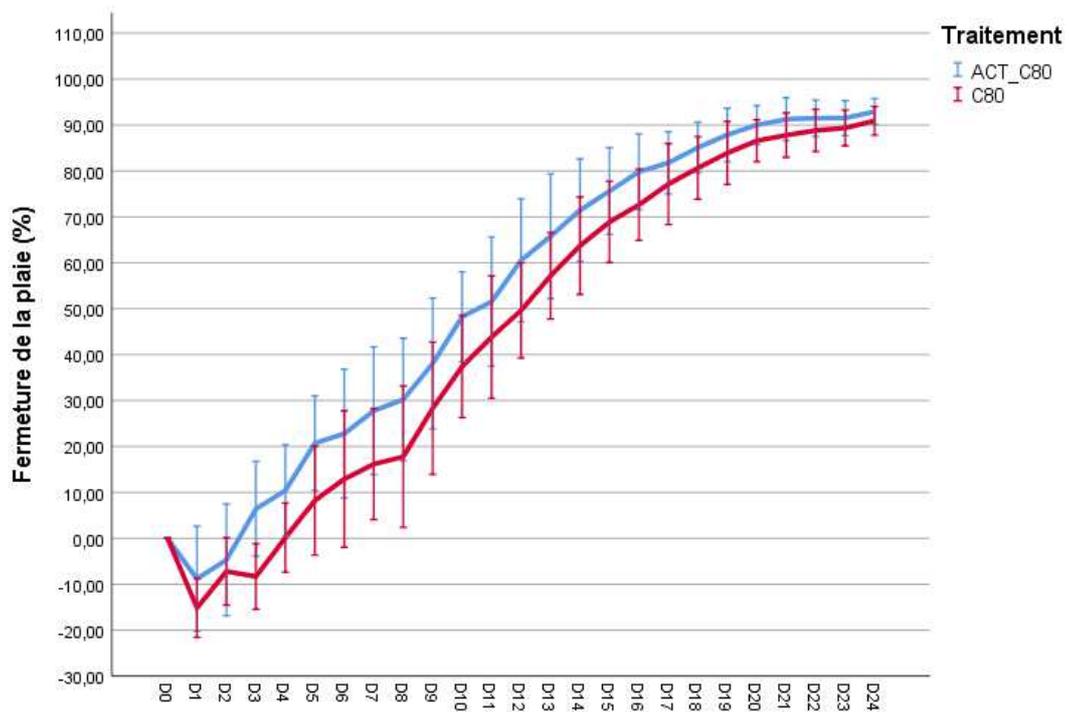


Figure III-14 : Fermeture de la plaie pour le groupe ACT\_C80

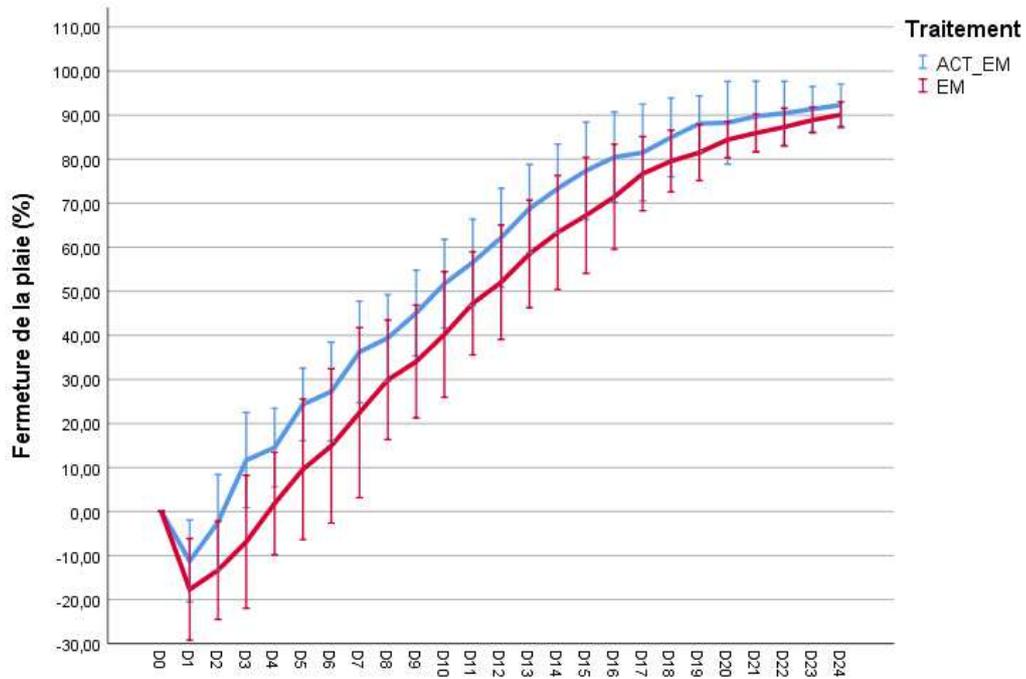


Figure III-15 : Fermeture de la plaie pour le groupe ACT\_EM

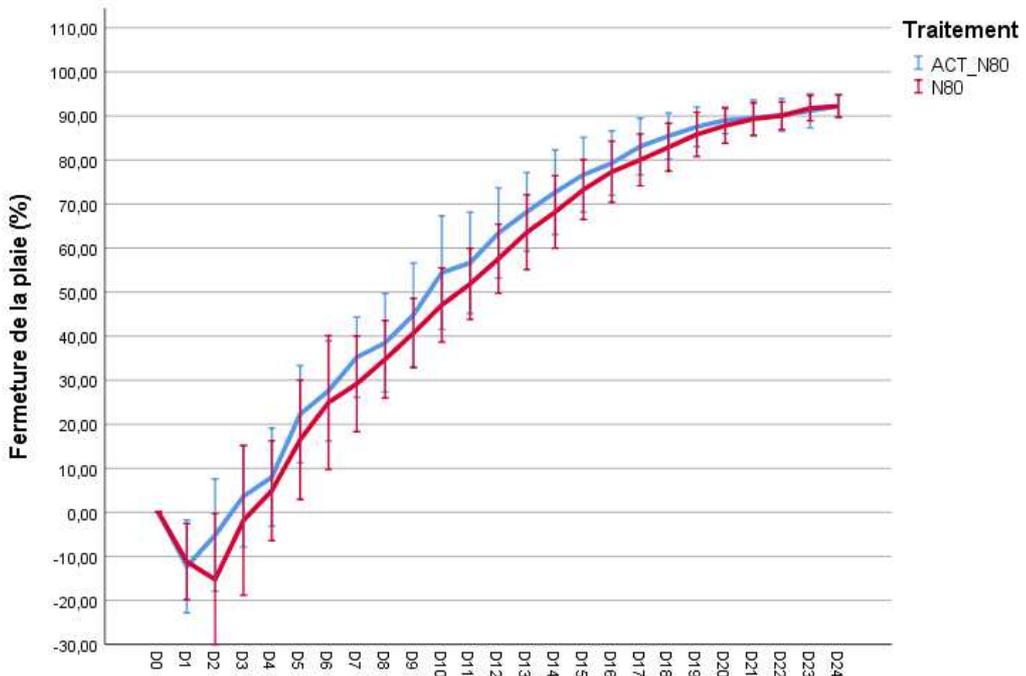


Figure III-16 : Fermeture de la plaie pour le groupe ACT\_N80

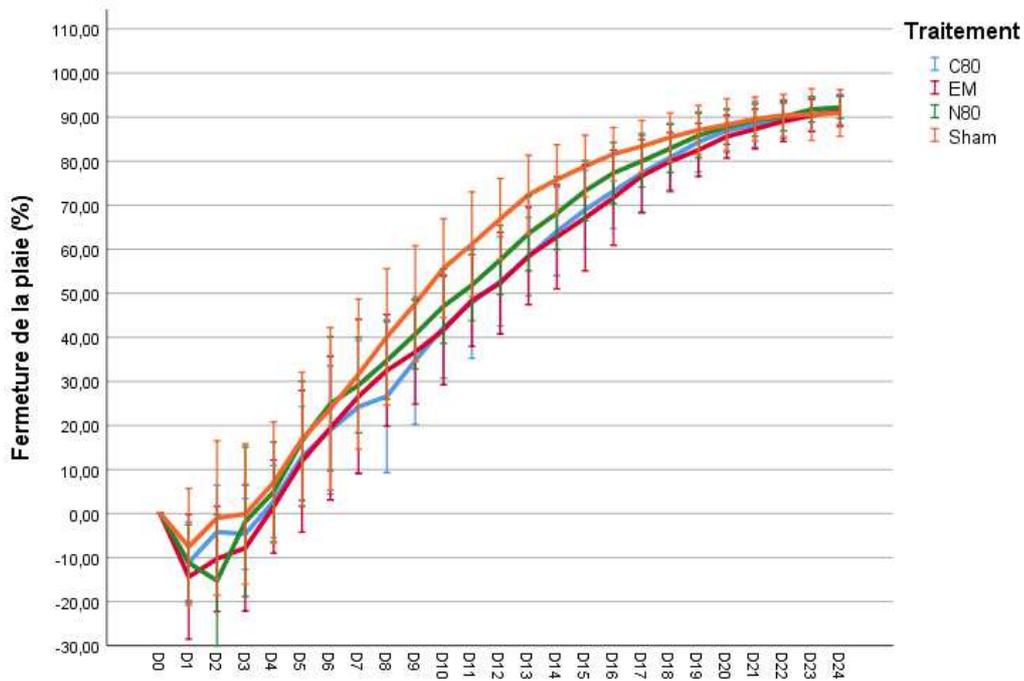


Figure III-17 : Fermeture de la plaie pour les véhicules et le groupe Sham

On observe aucune différence statistiquement significative entre les courbes SHAM et les contrôles C80, N80 et EM. Par contre, l'ACT80 et ACT-EM induisent une accélération de la cicatrisation, ce qui n'est pas retrouvé pour l'ACT N80. L'effet bénéfique de l'ACT80 et ACT-EM semble similaire.

Les résultats des comparaisons prévues sont représentés dans le Tableau III.7. On retrouve un effet significatif des traitements ACT\_C80 et ACT\_EM par rapport à leurs véhicules respectifs. On ne retrouve aucun effet significatif pour la comparaison entre ACT\_N80 et N80. Les véhicules n'ont pas de différences significatives par rapport au groupe Sham.

Comparaison	p.value ajustée
ACT_C80-C80	0.042
ACT_EM-EM	0.048
ACT_N80-N80	0.606
Sham-C80	0.666
Sham-EM	1
Sham-N80	1

Tableau III.7 : Comparaisons planifiées post ANOVA, ajustement statistique par Bonferroni.

### *b) Tréprostinil*

Pour le Tréprostinil, nous sommes partis sur le même plan expérimental comme décrit dans le Tableau III.8. Comme dans les études précédentes, l'attribution des traitements a été randomisée (Tableau III.8).

Groupe Traitement (nombre d'animaux)	Ulcère 1 (nombre d'ulcères)	Ulcère 2 (nombre d'ulcères)
TRE_C80 (12)	TRE_C80 (12)	C80 (8) + Sham (4)
TRE_EM (12)	TRE_EM(12)	C80 (8) + Sham (4)

Tableau III.8 : Répartitions des animaux pour la phase de traitement par le Treprostinil sur 24j

Le Tableau III.9 résume les caractéristiques de formulations utilisées pour cette étude. On observe une diminution de la concentration par rapport à la concentration cible (750µg/g). Nous avons néanmoins utilisé ces formulations pour les phases animales.

Formulations	Concentration
TRE_C80	613 ± 13
TRE_EM	560 ± 8

Tableau III.9 : Caractéristiques des formulations encapsulant le Treprostinil pour les phases animales

Le Tableau III.10 résume les caractéristiques des animaux utilisés dans cette étude. Les animaux étaient bien diabétiques avec une obésité importante (45 g) et une glycémie à jeun élevée. Les ulcères n'étaient pas de tailles différentes en fonction des groupes de traitements comme montré dans la Figure III-18 et on ne retrouve pas de différence statistiquement significative après une Anova à un facteur (p.value 0.823 F=0.379 df4).

Caractéristiques	
Poids (J0)	45 ± 3 g
Glycémie à jeun (J-2)	525 ± 99 mg/dl
Taille initiale d'ulcère (mm <sup>2</sup> )	57.9 ± 6 mm <sup>2</sup>

Tableau III.10 : Caractéristiques initiales des animaux traités par le Treprostinil. Les données représentent la moyenne ± l'écart-type. n=24 pour les caractéristiques des animaux et n=48 pour la taille initiale d'ulcère.

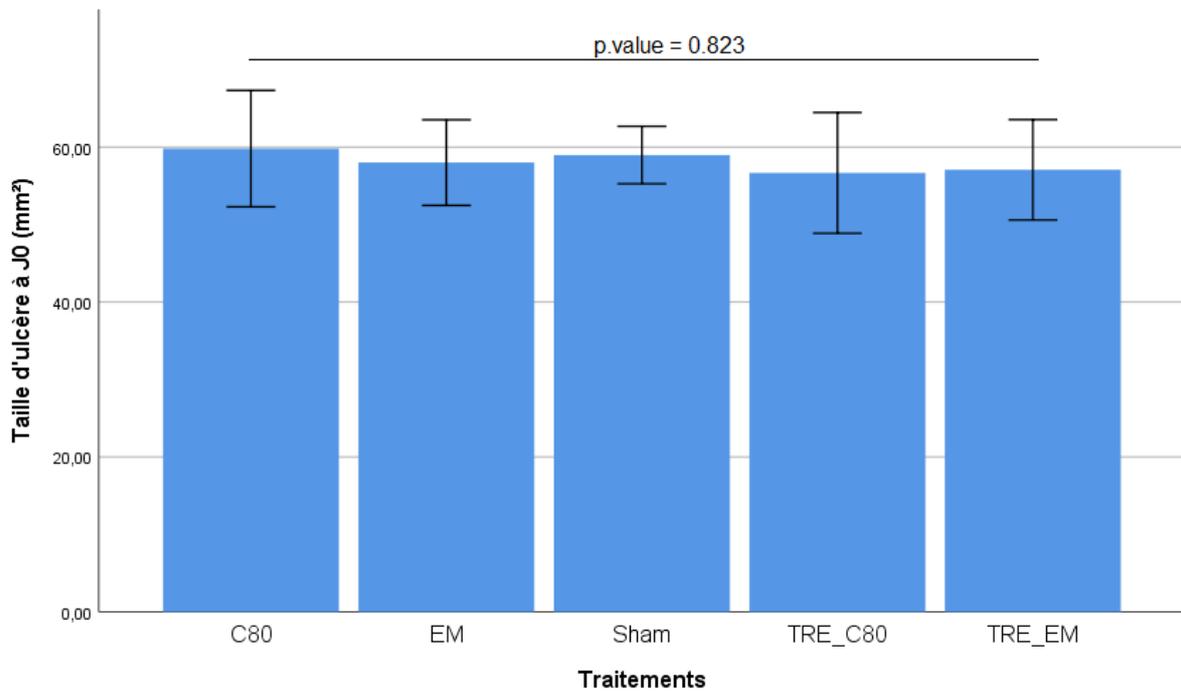


Figure III-18 : Taille d'ulcère initiale en fonction des groupes de traitements pour le Treprostinil. Anova 1 facteur

Lors de cette phase de traitement, nous avons également rencontré l'effet indésirable du Tréprostinil comme dans l'étude 1, illustré dans la Figure III-19.



Figure III-19 : Exemple de saignement important au niveau de l'ulcère traité par le Treprostinil (à gauche sur la photo)

Malheureusement, le saignement était plus important que lors de la première phase et les souris étant hébergées en groupes de 6, plusieurs morts ont été constatées par plusieurs mécanismes : blessures ou mort sans explication dans la cage. En effet, la présence de sang provoque une réaction de stress important qui induit une agression importante même sur ce modèle de souris. Ainsi le nombre final d'animaux et d'ulcères analysables a été réduit comme montré dans le Tableau III.11.

Traitements	Nombre d'ulcères à J24	Taille initiale de l'ulcère (mm <sup>2</sup> )
TRE_C80	10	54.9 ± 6
C80	5	57.8 ± 3
TRE_EM	8	56.9 ± 6
EM	4	56.4 ± 5
Sham	5	59.8 ± 5

Tableau III.11 : Caractéristiques finales des animaux traités par le Treprostinil

On ne retrouve pas de différences significatives sur la taille de l'ulcère à J0.

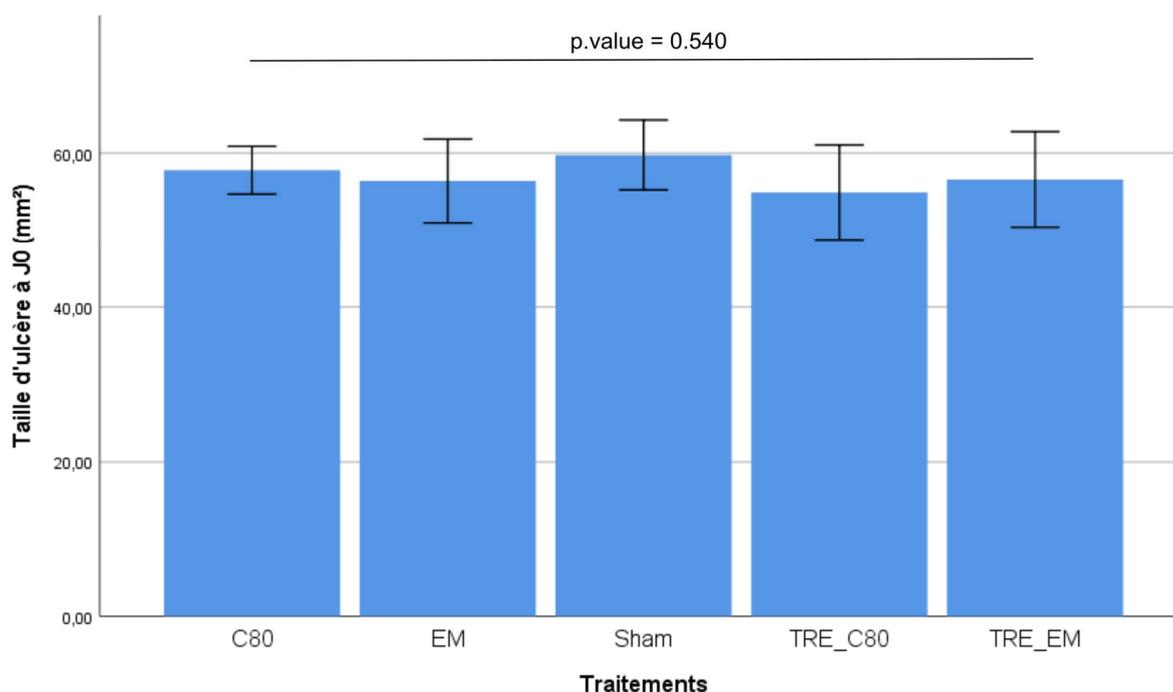


Figure III-20 Tailles d'ulcères à J0 en fonction des groupes de traitements pour le Treprostinil. Test statistique non paramétrique de Kruskal Wallis.

Les Figure III-21 et Figure III-22 résument les courbes de cicatrisation sur 24 jours exprimée en % de la taille initiale de chaque ulcère pour les groupes TRE-C80 et TRE\_EM respectivement. On observe pour les groupes traités une amélioration de la cicatrisation par rapport à leurs contrôles véhicules respectifs, cette différence étant plus importante en début de traitement.

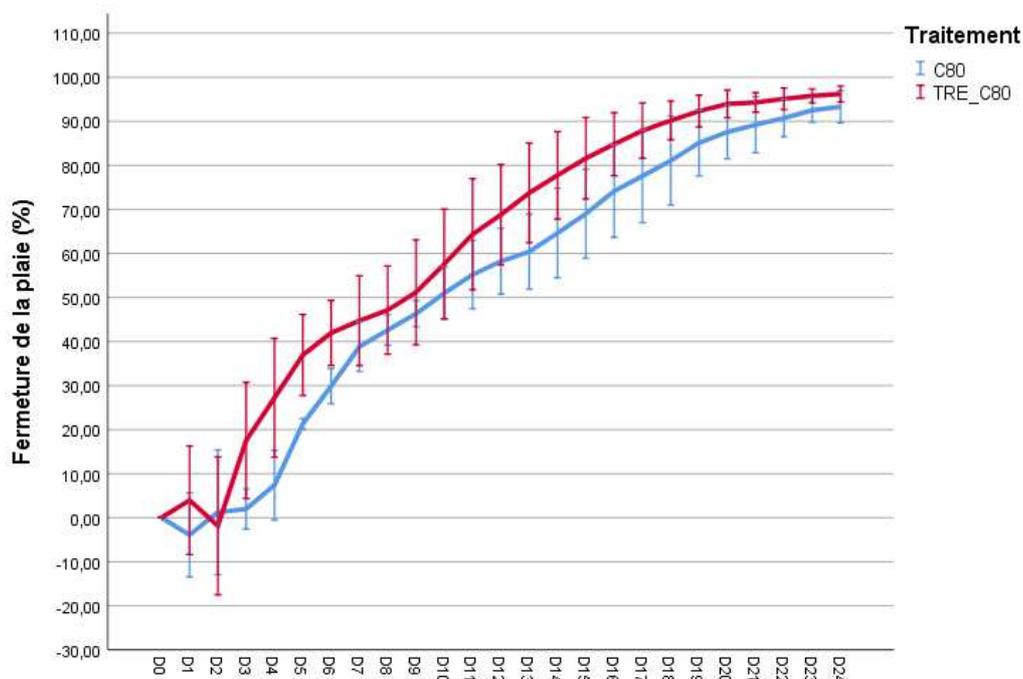


Figure III-21 : Fermeture de la plaie pour le groupe Treprostinil C80

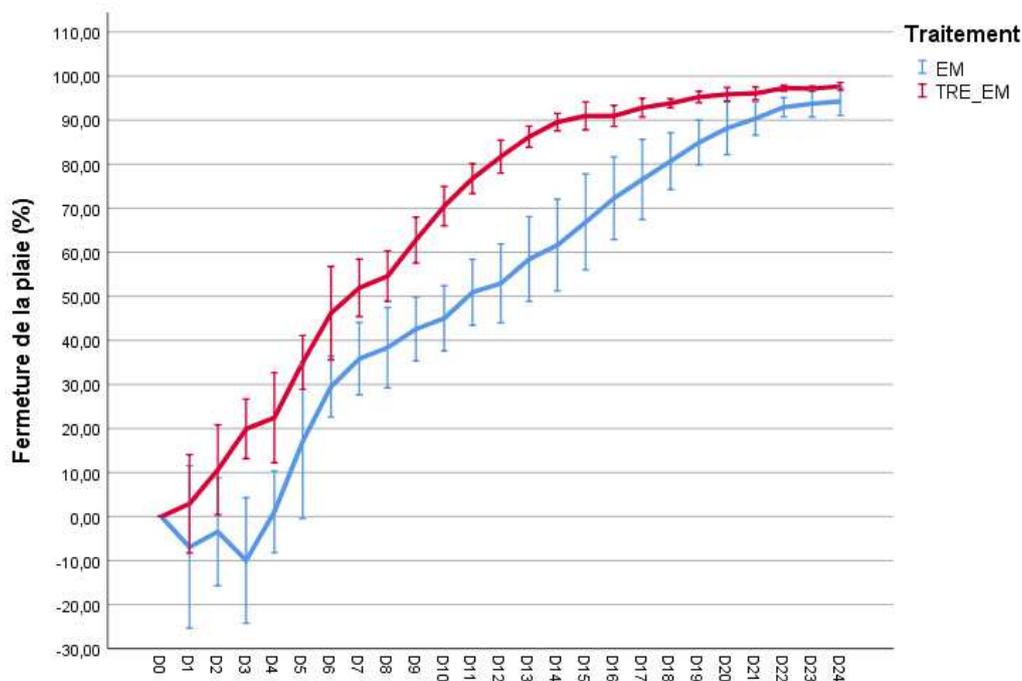


Figure III-22 : Fermeture de la plaie pour le groupe Treprostinil Emulsion

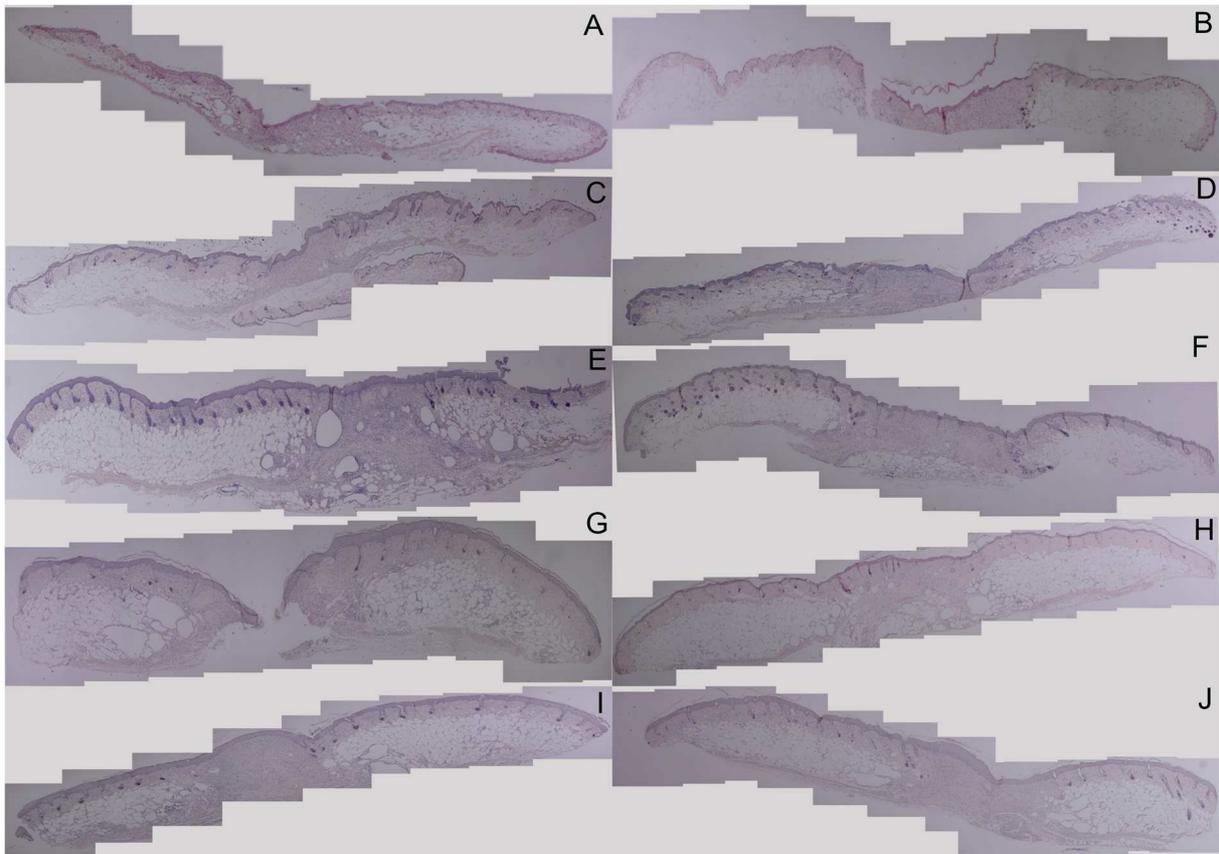
Comparaison	p.value	p.value ajustée
Kruskal Wallis		
NA	<b>0.001</b>	NA
Comparaison 2 à 2 : Mann Whitney		
TRE_EM-EM	0.004	0.008
TRE_C80-C80	0.028	0.058

Tableau III.12: Analyse statistique Treprostinil Kruskal Wallis. Les p.values pour les tests de Mann Whitney sont ajustées par une correction de Bonferroni (n=2)

Les résultats de l'analyse statistique sont résumés dans le Tableau III.12. À cause du nombre limité d'animaux dans chaque groupe et de la forte différence en taille d'échantillons, nous avons décidé d'utiliser un test non paramétrique de Kruskal Wallis suivi d'un test de Mann Whitney pour la comparaison des groupes TRE\_C80-C80 et TRE\_EM-EM avec ajustement des p.values par Bonferroni. Le test de Kruskal Wallis est significatif par contre seule la comparaison TRE\_EM et EM est significative alors que la comparaison TRE\_C80 et C80 est à la limite de la significativité.

### *c) État de la peau à 24 j*

Nous avons évalué l'état des plaies sur les coupes histologiques prélevé à 24 jours. Une coloration HE a été réalisée afin d'évaluer la qualité de la plaie par évaluation de la qualité de la réépithélisation. Cette évaluation a été réalisée sur 6 coupes de peau par condition de traitement et en sélectionnant les ulcères controlatéraux sur chaque animal comme contrôle. Les échantillons de peau ont été sélectionnés de manière aléatoire et évaluée en aveugle. La Figure III-23 représente un échantillon des coupes de peaux observées. On observe pour toutes les coupes une réépithélialisation complète sauf pour la coupe G (TRE\_C80).



*Figure III-23 : Échantillons de peau à J24; coloration hématoxyline éosine; grossissement x10 Champs multiples avec collage sous Microsoft image composite éditeur. Répartition des traitements A) ACT\_N80; C) ACT\_C80; E) ACT\_EM; G) TRE\_C80; I) TRE\_EM. Les autres images représentent les ulcères véhicules pour le même animal B) Sham; D) C80; F) EM; H) Sham; J) Sham*

#### 4. Résultats histologiques de cicatrisation intermédiaire à 4 et 9 jours

Les courbes de cicatrisations sur 24 jours montrent l'importance de la phase principale de la cicatrisation pour observer l'effet des traitements. Nous avons donc réalisé une deuxième série de cicatrisation avec euthanasie aux jours 4 ou 9 afin de prélever des échantillons de peau pour analyse histologique et biologique. Lors de cette phase, il était nécessaire de sélectionner une

formulation afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Dans cette étude, nous avons choisi les formulations C80 comme formulation de référence pour l'ACT-333679 et le Treprostinil.

Les animaux ont été traités de la même manière sauf les animaux traités par Treprostinil qui ont été isolés par paires afin de limiter l'impact du saignement provoqué par le Treprostinil lors du premier jour (J0 - J1). Pour les animaux présentant un saignement important, une injection intrapéritonéale de 150 µl de NaCl 0,9 % a été réalisée afin de compenser la perte de sang.

La répartition des animaux est affichée dans le Tableau III.13. Ainsi nous avons utilisé au total 46 animaux mâles de 12 semaines. Leurs caractéristiques sont représentées dans le Tableau III.14.

Groupe Traitement (nombre d'animaux)	Ulcère 1 (nombre d'ulcères)	Ulcère 2 (nombre d'ulcères)
ACT_C80 (8)	ACT_C80 (8)	C80 (4) + Sham (4)
TRE_C80 (8)	TRE_C80 (8)	C80 (4) + Sham (4)
Contrôle (4)	C80 (4)	Sham(4)

Tableau III.13 : Répartitions des animaux pour la phase de cicatrisation sur temps intermédiaires (4 et 9)

Caractéristiques	
Poids (g)	42 ± 7
Glycémie à jeun (mg/dl)	467 ± 124
Taille initiale d'ulcère (mm <sup>2</sup> )	49 ± 6

Tableau III.14 : caractéristiques des animaux

La taille des ulcères est inférieure à l'étude précédente (49 mm<sup>2</sup> contre 59 mm<sup>2</sup>), mais cette taille n'est pas différente entre les groupes de traitements dans cette série d'animaux (Figure III-24, ANOVA, p.value = 0.128). Comme dans les groupes précédents, on ne retrouve aucun saignement sur le groupe ACT par rapport au groupe TRE. L'isolement des animaux et l'administration de NaCl a permis l'élimination de la mortalité lors de l'administration du groupe Tréprostinil.

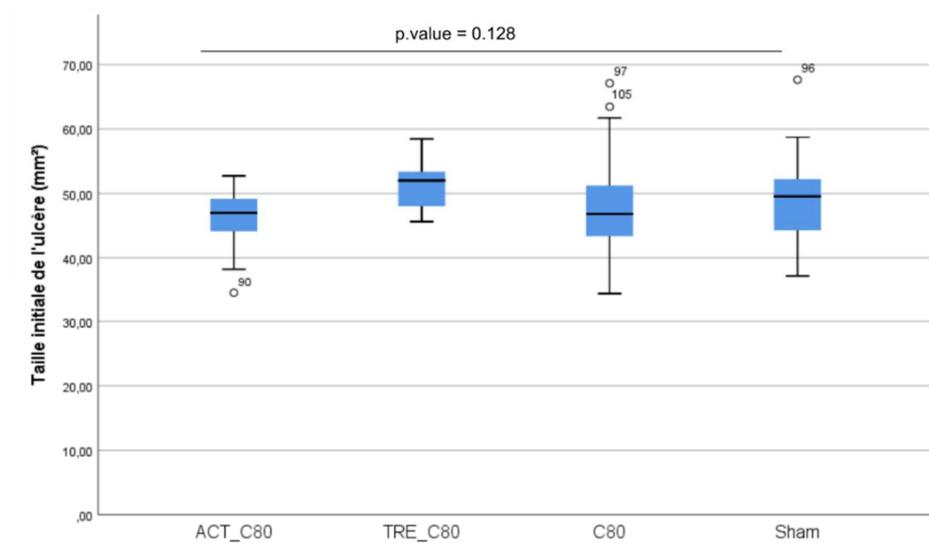


Figure III-24 : Taille initiale des ulcères pour les analyses intermédiaires. Test statistique : Anova sur taille initiale de l'ulcère en fonction du traitement

## 5. Analyse histologique de la peau

### a) Tissu de granulation

Une analyse photographique des plaies lors des prélèvements à J4 et J9 en histologie a été réalisée sur tous les animaux de l'analyse intermédiaire. Le tissu de granulation a été analysé en pourcentage de la taille de l'ulcère mesuré également en histologie (distance entre les berges épithélialisées de l'ulcère).

Les résultats sont présentés dans la Figure III-25 et le Tableau III.15. On trouve un effet de l'administration d'ACT au niveau de la taille du tissu de granulation à J4 que l'on ne retrouve pas à J9. Une analyse histologique en hématoxyline-éosine-safran nous aurait permis d'observer plus précisément le tissu de granulation et la réépithélialisation. En effet, le safran permet la coloration plus détaillée de la matrice extracellulaire.

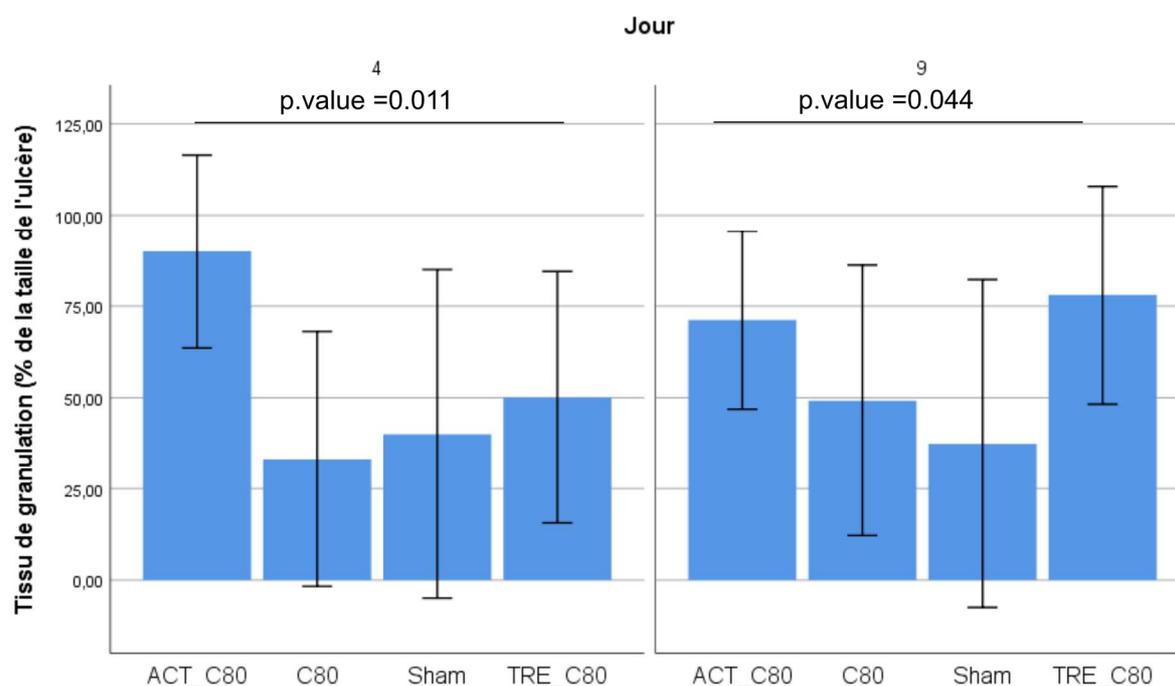


Figure III-25 : Tissu de granulation en fonction du jour de prélèvement et du traitement. P.values obtenues par un test de Kruskal Wallis.

Kruskal Wallis			
p.value J4		p.value J9	
<b>0.011</b>		<b>0.044</b>	
Comparaison 2 à 2 (Mann Whitney U)			
Comparaison		J4	J9
ACT_C80	C80	<b>0.002</b>	1
	Sham	<b>0.003</b>	0.478
TRE_C80	C80	1	0.384
	Sham	1	<b>0.054</b>
C80	Sham	1	1
TRE_C80	ACT_C80	0.490	1

Tableau III.15 : Comparaison statistique du tissu de granulation en histologie. Test non paramétrique de Kruskal Wallis suivi d'une comparaison 2 à 2 par un test de Mann Whitney U avec ajustement des p.values par Bonferonni.

### b) Immunohistochimie

Nous avons également réalisé des tests préliminaires d'immunohistologie afin de quantifier l'angiogenèse et la prolifération cellulaire. Nous avons essayé de quantifier l'angiogenèse par un marquage anti-C31 et la prolifération cellulaire par un immunomarquage du marqueur de

prolifération Ki67+. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à réaliser un immunomarquage sur tissu sain pour le CD31 et sur tissu en cours de cicatrisation pour le Ki67+. Nous avons réalisé des tests supplémentaires afin d'améliorer le démasquage des antigènes ainsi que le test de nouveaux anticorps. Nous pourrions également quantifier des telles que le VEGF dans les biopsies de peau par Elisa ou Western Blot.

## C. Conclusion des études animales

L'application d'une formulation de Tréprostnil ou d'ACT 333679 sur un modèle murin de plaie par excision n'augmente pas de façon nette le flux sanguin après 6 ou 24 h d'application, alors même que l'on détecte bien la diffusion systémique rapide des molécules. La quantification dermique est exposée à une source de biais de contamination qui devra être vérifiée dans des expériences ultérieures. L'exposition au Tréprostnil expose au risque d'hémorragie sur plaie nette et répétée.

Lors des études de cicatrisation sur modèle excisionnel, les formulations de nanoparticules lipidiques cationiques d'ACT 333679 et de Tréprostnil appliqués pendant 24 jours accélèrent la cicatrisation, tout comme leurs contrôles en émulsion. Par contre, les formulations neutres n'ont pas d'effet. Cet effet s'explique pour l'ACT-333679 par l'apparition précoce d'un tissu de granulation. Les analyses planifiées en immunohistochimie et en Elisa/Western Blot nous permettront de mieux caractériser l'effet des deux traitements dans les temps précoces.

Nous discuterons en détail du mécanisme et des perspectives dans la discussion générale.

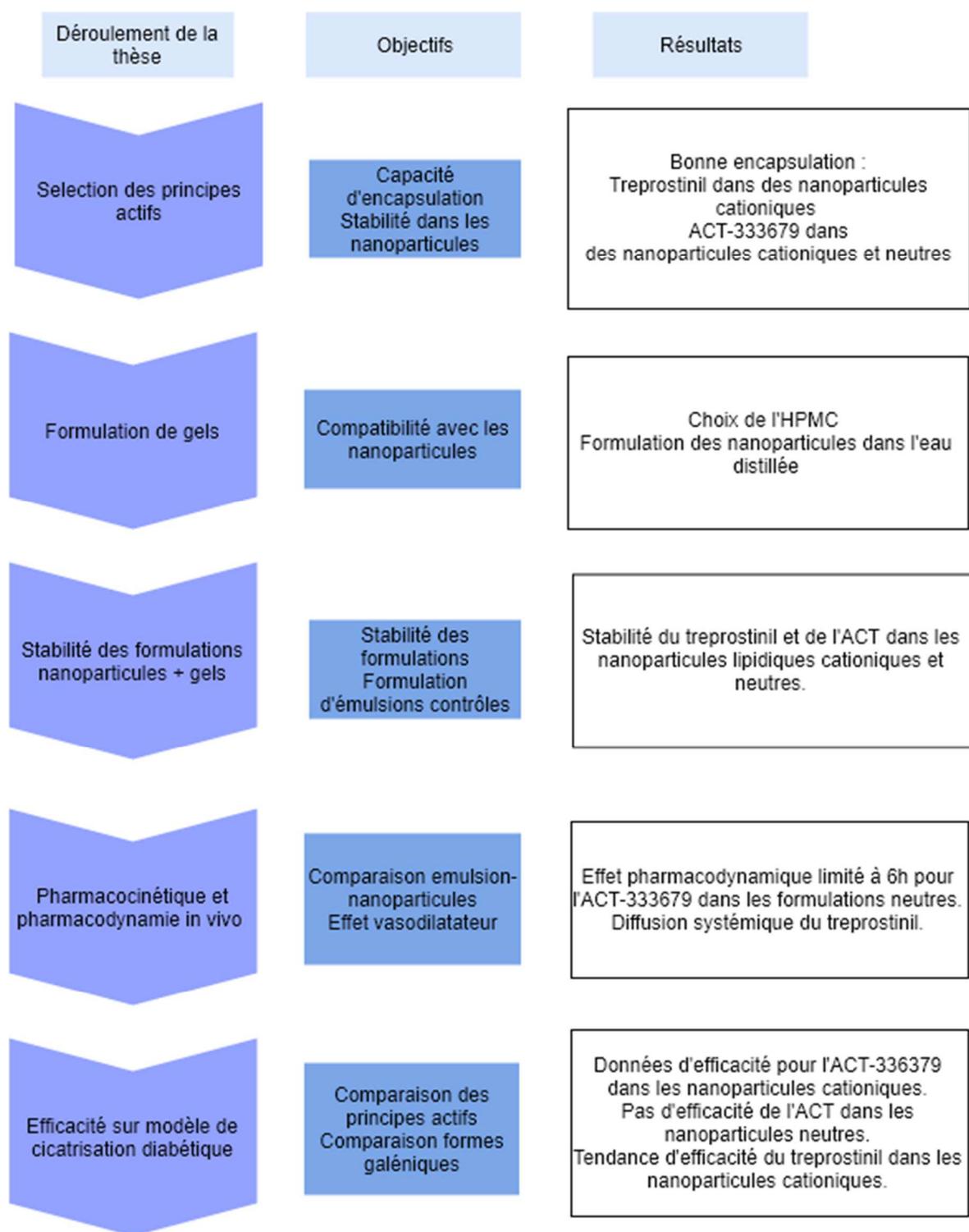


Figure III-26 : Objectifs et résultats de la thèse après la seconde phase animale.

## D. Références

1. Watanabe, A. *et al.* Using improved serial blood sampling method of mice to study pharmacokinetics and drug-drug interaction. *J. Pharm. Sci.* **104**, 955–961 (2015).
2. O’Doherty, J., McNamara, P., Clancy, N. T., Enfield, J. G. & Leahy, M. J. Comparison of instruments for investigation of microcirculatory blood flow and red blood cell concentration. *J. Biomed. Opt.* **14**, 034025 (2009).
3. Zhai, H., Chan, H. P., Farahmand, S., Nilsson, G. E. & Maibach, H. I. Tissue viability imaging: mapping skin erythema. *Skin Res. Technol.* **15**, 14–19 (2009).
4. Henricson, J., Nilsson, A., Tesselaar, E., Nilsson, G. & Sjöberg, F. Tissue viability imaging: Microvascular response to vasoactive drugs induced by iontophoresis. *Microvasc. Res.* **78**, 199–205 (2009).
5. Roustit, M. *et al.* Cutaneous Iontophoresis of Treprostinil in Systemic Sclerosis: A Proof-of-Concept Study. *Clin. Pharmacol. Ther.* **95**, 439–445 (2014).
6. Cracowski, J.-L., Minson, C. T., Salvat-Melis, M. & Halliwill, J. R. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol. Sci.* **27**, 503–508 (2006).
7. Grey, J. E., Enoch, S. & Harding, K. G. Wound assessment. *Bmj* **332**, 285–288 (2006).
8. Sullivan, S. R. *et al.* Validation of a Model for the Study of Multiple Wounds in the Diabetic Mouse (db/db): *Plast. Reconstr. Surg.* **113**, 953–960 (2004).
9. Reid, R. R., Sull, A. C., Mogford, J. E., Roy, N. & Mustoe, T. A. A novel murine model of cyclical cutaneous ischemia-reperfusion injury. *J. Surg. Res.* **116**, 172–180 (2004).
10. Wang, X. T., McKeever, C. C., Vonu, P., Patterson, C. & Liu, P. Y. Dynamic Histological Events and Molecular Changes in Excisional Wound Healing of Diabetic DB/DB Mice. *J. Surg. Res.* **238**, 186–197 (2019).
11. Davidson, J. M., Yu, F. & Opalenik, S. R. Splinting Strategies to Overcome Confounding Wound Contraction in Experimental Animal Models. *Adv. Wound Care* **2**, 142–148 (2013).
12. Mohafez, H., Ahmad, S. A., Ahmad Roohi, S. & Hadizadeh, M. Wound Healing Assessment Using Digital Photography: A Review. *J. Biomed. Eng. Med. Imaging* **4**, (2016).
13. Grillo, F. *et al.* Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochem. Cell Biol.* **144**, 93–99 (2015).

## IV. Discussion générale

A.	Agonistes de la prostacycline et effet sur la cicatrisation .....	214
1.	Voie de la prostacycline et cicatrisation .....	214
B.	Limites et perspectives du travail de thèse .....	217
1.	Choix des principes actifs, des nanoparticules et des gels.....	217
2.	Modèle de pharmacodynamie .....	218
3.	Effet procicatrisant de l'ACT-333679 et du Treprostinil. ....	219
4.	Perspectives.....	222
C.	Bibliographie .....	224

## A. Agonistes de la prostacycline et effet sur la cicatrisation

Durant ce travail de thèse, nous avons réalisé un screening de 6 principes actifs vasodilatateurs dans différents types de nanoparticules lipidiques. Durant cette phase de screening, nous avons pu obtenir trois formulations stables encapsulant deux principes actifs de la voie de la prostacycline : le Tréprostinil dans des nanoparticules cationiques et l'ACT-333679 dans des nanoparticules cationiques et neutres. Nous avons ensuite réalisé un gel à base d'HPMC pour la délivrance au niveau de l'ulcère. Ces gels chargés en nanoparticules sont stables à 6 mois en termes d'encapsulation du Tréprostinil et de l'ACT-333679.

**Nous avons montré dans ce travail de thèse que l'administration topique d'agoniste du récepteur IP, l'ACT-333679 et le Tréprostinil nanoencapsulés dans des particules cationiques permettent d'améliorer la cicatrisation sur un modèle murin d'ulcère diabétique.** Ces résultats sont concordants avec notre expérience sur la cicatrisation d'ulcères diabétique par l'iontophorèse de tréprostinil.<sup>1</sup> Le Tréprostinil est un analogue de la prostacycline avec une action principale sur les récepteurs IP, EP2, et DP1.<sup>2</sup> Au contraire, l'ACT-333679 est un agoniste non-prostanoides du récepteur IP qui est fortement spécifique du récepteur IP.<sup>3</sup> Dans ce travail de thèse, malgré le manque de données biologiques sur le mécanisme de cicatrisation, nous montrons donc que l'activation du récepteur IP est associée à une amélioration de la cicatrisation.

### 1. Voie de la prostacycline et cicatrisation

Les prostanoides sont des molécules ubiquitaires des différents organes. Leur effet va être médié par la concentration locale, une expression différenciée des différents récepteurs et le type et phénotype cellulaire stimulé. Les prostanoides dont la prostacycline sont impliqués dans les processus de cicatrisation par leur implication au niveau de la phase inflammatoire, proliférative, et de remodelage.

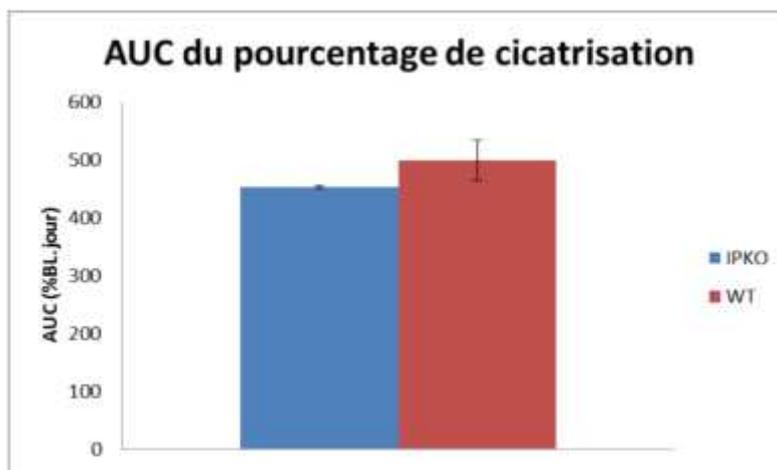


Figure IV-1 : Cicatrisation de souris IP KO (données préliminaires)

L'effet de la prostacycline et du récepteur IP au niveau de la cicatrisation est conforté par des résultats préliminaires dans notre laboratoire sur un modèle murin délété pour le récepteur IP. Sur ce modèle, on retrouve une altération de la cicatrisation sur un modèle murin comme montré dans la Figure IV-1.

Le mécanisme de l'action procicatrisante de la stimulation des récepteurs IP est probablement multiple. L'effet le plus caractérisé et le plus consistant est l'action sur l'angiogénèse. Par l'intermédiaire de la stimulation des récepteurs IP principalement (80%) et EP4 minoritairement (20%), les cellules endothéliales migrent et permettent la formation de vaisseaux sanguins in vitro.<sup>4</sup> L'inhibition de la synthèse endogène de prostanoïdes par l'administration d'inhibiteurs de COX inhibe les processus d'angiogénèse par une diminution de la synthèse kératocytaire de VEGF<sub>165</sub>.<sup>5</sup>

Les analogues de la PGI<sub>2</sub> inhibent également les effets profibrotiques du TGFβ par l'activation de la protéine kinase A.<sup>6</sup> Cette activation est médiée par l'augmentation de la concentration cellulaire médiée par l'activation des récepteurs IP, EP2 et EP4. Ainsi, l'inhibition tissulaire de la synthèse de prostanoïdes par l'apport d'inhibiteurs de COX est associée à une cicatrisation dérégulée avec une apparition de cicatrices chéloïde.<sup>7</sup> Ceci témoigne de l'importance de la voie des prostanoïdes au niveau du remodelage tissulaire.

Par ailleurs, l'activation des récepteurs EP2 est associée à une stimulation de la prolifération des kératinocytes.<sup>8</sup> Ainsi l'augmentation de la concentration endogène de PGE<sub>2</sub> par inhibition de sa dégradation provoque une amélioration de la réépithélialisation.<sup>9</sup>

Par contre, la PGI<sub>2</sub> et le récepteur IP sont classiquement impliqués dans la réponse nociceptive. Durant cette phase de traitement, nous n'avons observé aucun effet comportemental après l'administration de l'ACT-333679 ou du Treprostinil sur les souris saines et sur les souris diabétiques pouvant suggérer une augmentation de la nociception.

## B. Limites et perspectives du travail de thèse

### 1. Choix des principes actifs, des nanoparticules et des gels

Dans ce travail de thèse, nous avons choisi de limiter notre étude à 6 principes actifs. Une limitation du nombre de principes actifs était nécessaire dans un souci financier et de réalisation dans le cadre d'un travail de thèse compte tenu des multiples étapes. Nous avons décidé de ne pas sélectionner l'iloprost malgré son utilisation clinique historique au niveau de la cicatrisation. En effet, les analogues de la prostacycline sont des molécules onéreuses (2316€ pour 10mg d'iloprost), et nous avons noté la mauvaise tolérance cutanée connue de l'iloprost.<sup>10</sup> Nous nous sommes également limités à certaines classes pharmacologiques liées à la vasodilatation. Il existe également de nombreuses pistes de traitement pharmacologique des plaies chroniques comme la délivrance de facteurs de croissance, que nous n'avons pas choisies du fait de leur potentiel d'iatrogène carcinologique.<sup>11</sup> Dans ce travail de thèse, nous nous sommes focalisés également sur l'effet propre d'un principe actif sans évaluer une co-administration. Ainsi en clinique, ainsi en clinique, il semble que la co-administration d'agonistes de la prostacycline avec des antagonistes de l'endothéline permette une amélioration de la cicatrisation chez le patient sclérodermique.<sup>12-14</sup> Cette co-encapsulation est également possible et facilitée par l'utilisation de nanoparticules lipidiques mais complexifie énormément le protocole expérimental et son coût.

L'utilisation de principes actifs chargés négativement a impliqué la sélection des formulations cationiques du fait de la complexation ionique lors de la formulation.<sup>15</sup> Cette sélection des nanoparticules cationiques a imposé de nombreuses contraintes techniques, par exemple a limité la formulation de l'encapsulation du Cinaciguat et le choix de gels non ioniques comme l'HPMC utilisé dans le cadre de cette thèse. Une piste intéressante de recherche aurait pu être l'utilisation de prodrogues contenant une queue lipidique amphiphile. La queue lipidique augmente l'encapsulation et après métabolisation le principe actif est disponible sous forme non modifiée pour agir au niveau de sa cible. Ce principe a été mis en place lors du développement d'une nanoémulsion de Tréprostinil pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire par inhalation. L'utilisation d'une prodrogue avec une queue C<sub>18</sub> permet d'augmenter la durée d'action du Tréprostinil au niveau pulmonaire et de se passer des formulations cationiques.<sup>16-18</sup> L'utilisation de prodrogues pour une voie locale pose cependant un problème du fait de la nécessité de la présence d'enzymes de métabolisation au niveau de la peau.

Au niveau des types de nanoparticules, nous avons choisi les nanoparticules lipidiques développées par le CEA. Ceci nous a permis de ne pas avoir à réaliser une phase de formulation spécifique des nanoparticules. Une modification de la composition des nanoparticules aurait peut-être permis une amélioration de l'encapsulation, mais aurait nécessité une phase de formulation longue afin de déterminer leur stabilité.

## 2. Modèle de pharmacodynamie

La théorie principale lors de cette phase était que l'effet vasodilatateur (« target model ») serait prédictif de l'effet procicatrisant (« disease model »). Or nous avons observé un effet seulement pour l'ACT 333679 dans les nanoparticules neutres alors que dans notre modèle de cicatrisation, nous n'avons retrouvé aucun effet lié à l'administration répétée de cette même formulation. Ceci indique que l'étape de mise en évidence de l'effet pharmacodynamique attendu tel que nous l'avons réalisé (vasodilatation à 6 et 24 h) n'est pas un biomarqueur d'efficacité thérapeutique (cicatrisation) et remet en cause la hiérarchie de screening pour les études à venir. Le modèle de plaie est malgré cela plus intéressant que l'administration sur peau saine qui limite le passage cutané et systémique et ne reflète pas la condition pathologique.

Plusieurs améliorations du protocole sont à appliquer afin d'augmenter la pertinence de notre procédure de screening de molécules :

- Débuter le protocole d'administration le lendemain de la réalisation de l'ulcère : après la réalisation de la lésion, on retrouve une altération de la microcirculation cutanée liée au vasospasme puis surtout à la vasodilatation de la phase inflammatoire. Une analyse de la variabilité du flux en fonction du jour de cicatrisation permettrait de sélectionner le jour ayant la variabilité la plus faible.
- Modification du suivi de la vasodilatation : Au niveau de la mesure de la microcirculation, il aurait également été plus pertinent de réaliser des mesures consécutives du flux sanguin lors de l'administration. En effet le choix d'une mesure du flux sanguin cutanée 6 heures et 24h après administration a été arbitraire et imposée par les contraintes techniques, et il est probable que nous soyons bien au-delà du pic de vasodilatation. Une évaluation répétée du flux impose un besoin d'anesthésie répétée de l'animal et un protocole de suivi par conséquent plus lourd.
- Mesure de la perfusion par imagerie speckle : Dans ce modèle, l'utilisation du LDI est suffisante, car nous n'avons pas besoin d'une résolution temporelle importante, mais les

nouveaux outils de mesure de la vasodilatation comme le speckle permettent une résolution spatiale plus importante en plus de la meilleure résolution temporelle.

- Utilisation de groupe satellite pour la pharmacocinétique : l'utilisation des mêmes animaux aurait permis de corréler pharmacocinétique et pharmacodynamie, mais il est plus pertinent dans ce modèle de réserver des animaux pour le suivi pharmacocinétique. La méthode utilisée dans cette étude permet de limiter le nombre d'animaux, mais elle limite par contre les données tissulaires par rapport à la méthode classique consistant en une euthanasie à des points donnés avec récolte du sang terminal. Il aurait été intéressant de prélever de la peau non exposée afin de quantifier la diffusion du compartiment sanguin vers la peau.
- Type de plaie : la plaie excisionnelle utilisée dans ce modèle est éloignée des plaies chroniques diabétiques retrouvées en clinique. Un modèle de plaie ischémique serait plus adapté en théorie, mais à condition de présenter une faible variabilité, ce qui n'est pas le cas dans mon expérience.

### 3. Effet procicatrisant de l'ACT-333679 et du Treprostinil.

#### *a) Modèle de cicatrisation*

Le modèle utilisé dans cette étude est la souris db/db, qui présente une hyperglycémie et dyslipidémie chronique liée à une inactivation du gène du récepteur de la leptine. Ce modèle est le plus utilisé actuellement pour les études précliniques sur la cicatrisation d'ulcères diabétiques. De même, la modalité excisionnelle est la plus couramment utilisée en recherche préclinique par sa facilité de réalisation et par sa faible variabilité. L'utilisation du modèle excisionnel diabétique murin présente cependant des limitations.

Premièrement, on observe que même sans traitement, les plaies réalisées cicatrisent assez rapidement avec une phase plateau initial de quelques jours. De plus, l'étiologie de la plaie est différente de celle du pied diabétique. En effet, les plaies apparaissent de manière lente par rapport au modèle excisionnel.<sup>19</sup> Leur chronicité est également importante avec la présence d'une persistance sans traitement. Dans le modèle murin, la cicatrisation est également médiée par le phénomène de contraction qui est cependant très limité chez la souris db/db.<sup>20</sup> L'utilisation de dispositif anti contraction n'est par conséquent pas nécessaire et pas adapté sur ce modèle par risque d'aggravation des ulcères (fusion entre les plaies créées par les sutures et l'ulcère).

Les améliorations possibles du modèle passent par l'utilisation de plaies ischémiques. Elles consistent en l'application de deux aimants au niveau d'un pli de peau sur le dos de l'animal. La répétition des phases d'ischémie et de reperfusion permet la création d'ulcères ischémiques.<sup>21</sup> Contrairement au modèle excisionnel, on retrouve dans ce modèle une phase initiale de croissance de l'ulcère puis une phase de plateau et enfin une cicatrisation comme montrée dans la Figure IV-2 qui résume notre expérience au laboratoire. Une modification des protocoles d'ischémie-reperfusion permettrait d'allonger la phase de plateau. Ainsi certains protocoles montrent une phase totale de cicatrisation de 35 jours avec un protocole d'ischémie-reperfusion de 6h réalisée 3 fois.<sup>22</sup>

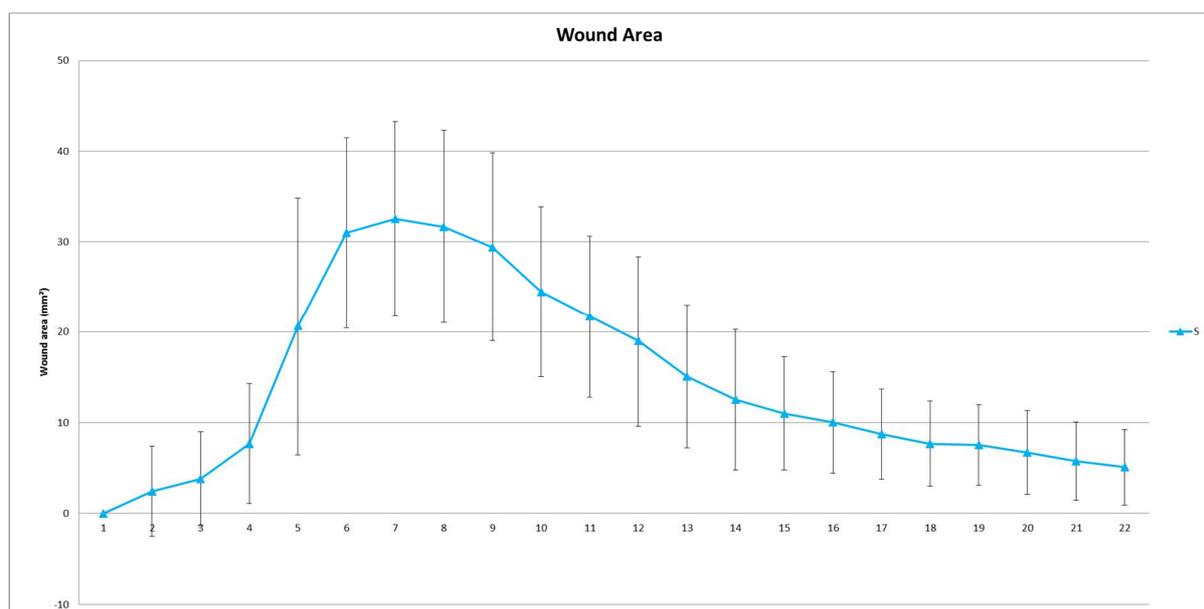


Figure IV-2 : Courbe de cicatrisation d'ulcères ischémiques (taille de l'ulcère en mm<sup>2</sup>) réalisés chez la souris db/db après un protocole d'ischémie reperfusion (2h d'ischémie + 15 min de reperfusion réalisé 3 fois).<sup>1</sup>

Ces modèles présentent cependant une variabilité nettement plus importante que le modèle excisionnel et rend plus difficile l'évaluation du traitement. De plus, sa réalisation est plus longue par rapport à la simplicité du modèle excisionnel et l'absence de standardisation actuelle dans la littérature.

En plus des souris db/db, d'autres modèles de cicatrisation murins existent dont la souris NONcNZO10 qui présente des altérations plus des processus de cicatrisation sur des plaies incisionnelles, excisionnelle, et ischémiques.<sup>23</sup>

Le critère de jugement principal est également à adapter. En effet, nous observons des résultats en histologie qui sont plus précis que ceux obtenus lors d'une analyse photographique classique.

En effet, l'analyse morphométrique ne tient pas compte de la granulation évidente lors de l'analyse histologique. La combinaison des deux est donc nécessaire à la bonne mesure des paramètres de cicatrisation.

### *b) Effet pharmacologique*

Le Treprostinil est un analogue de la prostacycline avec une action principale sur les récepteurs IP, EP2, et DP1.<sup>2</sup> Au contraire, l'ACT-333679 est un agoniste non-prostanoides du récepteur IP qui est fortement spécifique du récepteur IP.<sup>3</sup>

Ces caractérisations de l'affinité ont été réalisées sur l'homme principalement. Mais il existe des différences structurelles de la structure des différents récepteurs en fonction des différentes espèces. Ainsi pour le récepteur IP, on retrouve une différence marquée entre le récepteur humain et les récepteurs chez les rats et les souris comme montré dans le Tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Similarité du récepteur IP (réalisée sur <https://gpcrdb.org>.<sup>24</sup>)

Espèces	% Identité *	% S **	S ***
Rat / Homme	71	75	1576
Souris / Homme	71	76	1576
Souris / Rat	93	95	2068

\* pourcentage d'identité entre les séquences/ \*\* Pourcentage de similarité de séquence / \*\*\* Score de similarité

On retrouve dans la littérature une seule mention de l'affinité de l'ACT333679 et du selexipag pour le récepteur IP chez la souris. Elle se trouve dans le rapport d'évaluation publique du selexipag.<sup>25</sup> On retrouve une forte modification de leur puissance comme montré dans le Tableau IV.2. Ainsi l'ACT-333679 est 56 fois moins puissant chez la souris que chez l'homme. Cette différence peut impliquer une différence d'affinité ou de transduction du signal médiée par la structure différente des récepteurs IP. Elle doit être prise en compte, car elle peut impliquer une nette différence d'effet pharmacologique chez l'homme, avec un effet plus important.

	EC50	
	Selexipag	ACT 333679
Souris	25 $\mu$ M	730 nM
Homme	0.338 $\mu$ M	9.86 nM

Tableau IV.2 : Mesures de puissance (EC50) sur la production intracellulaire d'AMPc pour le selexipag et l'ACT-333679. Les valeurs chez l'homme sont estimées à partir des pourcentages donnés dans le document.

Il est donc nécessaire de mieux caractériser les modèles murins en terme pharmacologique : affinité, puissance et efficacité pour les différents principes actifs testés. Cet effet a été montré pour le récepteur IP et l'ACT-333679, mais il peut aussi être impliqué dans la réponse au Tréprostinil (récepteurs IP, EP2 et DP1). Ainsi dans la littérature, on ne retrouve aucune donnée d'affinité, de puissance et d'efficacité pour le Tréprostinil dans les modèles murins. Ces tests réalisés sur la production de cAMP ne sont également pas forcément adaptés, car lors d'administrations répétées, on retrouve également une désensibilisation des récepteurs liée à une administration répétée. Dans le cadre de l'ACT-333679, on retrouve notamment une désensibilisation plus faible liée à un agoniste biaisé.<sup>26</sup>

#### 4. Perspectives

Au niveau de cette thèse, des expériences supplémentaires seront à réaliser pour caractériser l'effet

- Essais de cicatrisation sur un modèle ischémique. Le modèle ischémique est le modèle le plus pertinent par rapport à la physiopathologie des ulcères chez le patient diabétique. Ce deuxième modèle permettra de confirmer l'effet des deux agonistes tout en améliorant potentiellement l'effet des nanoparticules lipidiques par rapport aux groupes émulsions. Une caractérisation plus importante de l'effet des véhicules est également à prévoir.
- Caractérisation de l'effet histologique de l'administration d'agoniste de la prostacycline : dans cette thèse, nous n'avons pas pu caractériser l'effet des deux agonistes utilisés. Des caractérisations précises sur les processus d'angiogenèse, de prolifération et d'inflammation sont indispensables afin et de comparer l'effet des deux

agonistes. Ces caractérisations passeront par de l'immunohistochimie ou des quantifications biologiques de marqueur de cicatrisation (ELISA/WesternBlot).

## C. Bibliographie

1. Savina, Y. Iontophorèse d'un analogue de la prostacycline pour améliorer la cicatrisation des ulcères liés à une dysfonction microvasculaire cutanée. (2019).
2. Whittle, B. J., Silverstein, A. M., Mottola, D. M. & Clapp, L. H. Binding and activity of the prostacyclin receptor (IP) agonists, treprostinil and iloprost, at human prostanoid receptors: Treprostinil is a potent DP1 and EP2 agonist. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 68–75 (2012).
3. Kuwano, K., Hashino, A., Noda, K., Kosugi, K. & Kuwabara, K. A Long-Acting and Highly Selective Prostacyclin Receptor Agonist Prodrug, 2- -N-(methylsulfonyl)acetamide (NS-304), Ameliorates Rat Pulmonary Hypertension with Unique Relaxant Responses of Its Active Form, acetic Acid (MRE-269), on Rat Pulmonary Artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 691–699 (2008).
4. Hoang, K. G., Allison, S., Murray, M. & Petrovic, N. Prostanoids regulate angiogenesis acting primarily on IP and EP4 receptors. *Microvasc. Res.* **101**, 127–134 (2015).
5. Goren, I. *et al.* Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 activity in keratinocytes inhibits PGE<sub>2</sub> formation and impairs vascular endothelial growth factor release and neovascularisation in skin wounds: Cyclooxygenase-dependent VEGF expression in keratinocytes. *Int. Wound J.* **14**, 53–63 (2017).
6. Stratton, R. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF $\beta$ 2 by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *FASEB J.* (2002). doi:10.1096/fj.02-0204fje
7. Su, W.-H. *et al.* Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs for Wounds: Pain Relief or Excessive Scar Formation? *Mediators Inflamm.* (2010). doi:10.1155/2010/413238
8. Konger, R. L., Malaviya, R. & Pentland, A. P. Growth regulation of primary human keratinocytes by prostaglandin E receptor EP2 and EP3 subtypes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1401**, 221–234 (1998).
9. Seo, S. Y., Han, S.-I., Bae, C. S., Cho, H. & Lim, S. C. Effect of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitor on wound healing. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **97**, 35–41 (2015).
10. Blaise, S., Roustit, M., Hellmann, M., Millet, C. & Cracowski, J.-L. Cathodal Iontophoresis of Treprostinil Induces a Sustained Increase in Cutaneous Blood Flux in Healthy Volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* **53**, 58–66 (2013).
11. Gainza, G. *et al.* The topical administration of rhEGF-loaded nanostructured lipid carriers (rhEGF-NLC) improves healing in a porcine full-thickness excisional wound model. *J. Controlled Release* **197**, 41–47 (2015).
12. Trombetta, A. C. *et al.* Effects of Longterm Treatment with Bosentan and Iloprost on Nailfold Absolute Capillary Number, Fingertip Blood Perfusion, and Clinical Status in Systemic Sclerosis. *J. Rheumatol.* **43**, 2033–2041 (2016).

13. Zampogna, G., Paolino, S., Serio, B., Cimmino, M. & Sulli, A. Longterm Treatment with Endothelin Receptor Antagonist Bosentan and Iloprost Improves Fingertip. *J. Rheumatol.* **41**, 881–886 (2014).
14. Bellando-Randone, S. *et al.* Combination therapy with Bosentan and Sildenafil improves Raynaud's phenomenon and fosters the recovery of microvascular involvement in systemic sclerosis. *Clin. Rheumatol.* **35**, 127–132 (2016).
15. Ferreira, L. *et al.* Formation of ion pairing as an alternative to improve encapsulation and anticancer activity of all-trans retinoic acid loaded in solid lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* 6011 (2012). doi:10.2147/IJN.S38953
16. Han, D. *et al.* Safety and pharmacokinetics study of a single ascending dose of C16TR for inhalation (INS1009). *Eur. Respir. J.* **48**, PA2403 (2016).
17. Corboz, M. R. *et al.* Therapeutic administration of inhaled INS1009, a treprostinil prodrug formulation, inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **49**, 95–103 (2018).
18. D Omiatek. Incorporation Into Lipid Nanoparticles Extends the Duration of Activity of Treprostinil in an Acute Hypoxia Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. (2014).
19. Grey, J. E., Enoch, S. & Harding, K. G. Wound assessment. *Bmj* **332**, 285–288 (2006).
20. Wang, X. T., McKeever, C. C., Vonu, P., Patterson, C. & Liu, P. Y. Dynamic Histological Events and Molecular Changes in Excisional Wound Healing of Diabetic DB/DB Mice. *J. Surg. Res.* **238**, 186–197 (2019).
21. Stadler, I., Zhang, R.-Y., Oskoui, P., Whittaker, M. B. S. & Lanzafame, R. J. Development of a Simple, Noninvasive, Clinically Relevant Model of Pressure Ulcers in the Mouse. *J. Invest. Surg.* **17**, 221–227 (2004).
22. Duscher, D. *et al.* Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 94–99 (2015).
23. Fang, R. C. *et al.* Limitations of the db/db mouse in translational wound healing research: Is the NONcNZO10 polygenic mouse model superior? *Wound Repair Regen.* **18**, 605–613 (2010).
24. Munk, C. *et al.* GPCRdb: the G protein-coupled receptor database – an introduction. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 2195–2207 (2016).
25. European Medicines Agency. Public assesment Report for selexipag. (2016).
26. Gatfield, J. *et al.* Selexipag Active Metabolite ACT-333679 Displays Strong Anticontractile and Antiremodeling Effects but Low  $\beta$ -Arrestin Recruitment and Desensitization Potential. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **362**, 186–199 (2017).