



HAL
open science

Conception de nanoformulations innovantes à base de polyoxazoline pour la délivrance cutanée d'antioxydants

Laurianne Simon

► To cite this version:

Laurianne Simon. Conception de nanoformulations innovantes à base de polyoxazoline pour la délivrance cutanée d'antioxydants. Matériaux. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONT045 . tel-03162377

HAL Id: tel-03162377

<https://theses.hal.science/tel-03162377v1>

Submitted on 8 Mar 2021

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 L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-chimie des Matériaux

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, UMR 5253

Conception de nanoformulations innovantes à base de polyoxazoline pour la délivrance cutanée d'antioxydants

Présentée par Laurianne SIMON

Le 12 octobre 2020

Sous la direction de Sylvie BEGU,
Vincent LAPINTE et Nathalie MARCOTTE

Rapporteurs

Sébastien LECOMMANDOUX, PU, Université de Bordeaux

Philippe PICCERELLE, PU, Aix Marseille Université

Devant le jury composé de

Sébastien LECOMMANDOUX, PU, Université de Bordeaux

Philippe PICCERELLE, PU, Aix Marseille Université

Muriel GOLZIO, DR2, IPBS

Jean-Paul RAFFAULT, Responsable affaires réglementaires matières premières, Pierre-Fabre
Dermo Cosmétique

Jean-Marie DEVOISSELLE, PU, ICGM

Céline PICARD, PU, Université le Havre Normandie

Sylvie BEGU, MCU, ICGM

Vincent LAPINTE, MCU, ICGM

Nathalie MARCOTTE, MCU, ICGM

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Président de jury

Invitée

Directrice

Co-encadrant

Invitée



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

A ma famille, avec reconnaissance et affection,

Remerciements

Une thèse est bien sûr le résultat d'un travail de recherche scientifique personnel nourri d'interrogations, d'expériences avec parfois des hauts, parfois des bas mais elle rime aussi avec rencontres et partages. Je pense avoir appris sur le plan scientifique comme sur le plan humain grâce aux échanges, aux collaborations, à la disponibilité et à l'enthousiasme de vous tous qui avez été à mes côtés au cours de ces trois années dans les moments difficiles comme dans les meilleurs. L'engagement de chacun m'a permis d'élaborer ce travail et de me construire comme chercheur. C'est pourquoi, j'ai mille mercis à adresser.

Je remercie très sincèrement les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer et de discuter mon travail de thèse. Tout d'abord mes rapporteurs Pr. Sébastien Lecommandoux et Pr. Philippe Piccerelle, merci pour l'attention, l'intérêt portés à mes recherches et le partage de vos expertises respectives. La reconnaissance que vous avez donné à mon travail est extrêmement motivante et m'encourage à poursuivre. Mes examinateurs Dr. Muriel Golzio, Mr. Jean-Paul Raffault, Pr. Jean-Marie Devoisselle et Pr. Céline Picard, merci pour tous vos retours positifs et la pluridisciplinarité de vos regards.

Je tiens à remercier mes trois encadrants de thèse, sans qui rien n'aurait été possible. Vous avez toujours été très disponibles, pédagogues, à l'écoute, d'excellents conseils et profondément humains. Dr. Sylvie Bégu, merci pour ta confiance, ton encadrement et ton soutien indéfectible. Tu m'as ouvert la porte du monde des antioxydants comme celle de ton bureau lors des moments délicats du quotidien. Je ne pouvais espérer meilleure entente que la nôtre. Merci Dr. Vincent Lapinte, d'avoir pris le temps de répondre à chacune de mes questions et de mes idées de synthèse. Par ta conception de la science, ta pédagogie et nos discussions, tu as su accompagner la progression de mes recherches. Merci Dr. Nathalie Marcotte, de m'avoir prodigué ta rigueur et ta précision scientifique qui continueront à me guider au-delà de cette thèse.

Merci d'avoir cru en moi. Je suis fière d'avoir mené à bien ces travaux de recherche avec vous et j'espère sincèrement que nous allons maintenir nos rituels festifs et gastronomiques ☺! Je sais que mon énergie débordante n'a pas toujours été facile mais j'ai porté mes « bébés POx » le plus loin possible grâce à votre soutien.

Un grand merci Pr. Jean-Marie Devoisselle, pour votre implication et votre aide au cours du projet et Dr. Eric Clot, pour votre accueil au sein de l'équipe MACS. Merci également à tous les membres de l'équipe MACS de la faculté de pharmacie, Joël, Anne, Sophie, Christophe, Philippe, Corine, Alexis ainsi que les doctorants Sarah, Jérémy, Maxime, Giang, Maëlle, Koceila car travailler avec vos côtés a été un réel plaisir. Nos moments de convivialité me manquent déjà. Un énorme merci Marie, pour ma formation à la culture cellulaire et pour avoir toujours répondu à mes questions avec le sourire ☺. Merci à mes collègues de la Galéra, Isabelle, Thomas, Corine, Emmanuel, Jade, Marie-Noëlle, Mourad, Bilel, Anthony, Rémi... pour les bons moments partagés et ce malgré ma présence intermittente.

Ma gratitude au Dr. Dan Lerner, pour son implication et son partage de graaaande expérience.

Une pensée particulière aux stagiaires impliquées dans mon projet, Justine, Soraya, Noa et Karel. Travailler avec vous a été enrichissant et tellement sympa ! Je sais que nous resterons en contact ☺. Une pensée aussi à ma petite protégée Maëva, merci pour nos fous rires, notre belle amitié et notre super trio avec Juju!

Tous mes remerciements Pr. Jean-Jacques Robin et Pr. Sophie Monge, pour votre accueil au sein de l'équipe IAM. Merci également aux membres de l'équipe assurant toujours une bonne ambiance, Maxime, Olivia, Jennifer, Aurélie, Joël, Sébastien, Sylvain et les doctorants Nina, Tobias, Lucie, Laura, Nikolas, Paul, Louna, Xianyu, Emeline, Benoit, Lucas. Un merci tout particulier à Thomas et Tarek qui m'ont soutenue, aidée et m'ont toujours assuré une petite place sur leur paillasse.

Au cours de ces trois années, la chance m'a été donnée d'intégrer temporairement les laboratoires des collaborateurs de ce projet me permettant d'effectuer un vrai travail inter-disciplinaire. Je tiens donc tout d'abord à remercier Dr. Marie-Pierre Rols, pour son accueil au sein de l'IPBS à Toulouse et la super équipe Muriel, Elisabeth, Géraldine, Laetitia, Vincent, Laurent, Charlotte, Caroline, Jelena, Bastien, Elena, Mathilde, Juliette et Diana. Je me suis sentie tout de suite intégrée dans votre team et j'ai énormément appris à vos côtés (pas gagné pour une chimiste dans un monde de biologiste ^^) alors un grand merci à vous tous !

De même je remercie Pr. Adam Daich et Pr. Michel Grisel, de m'avoir accueillie au sein de l'équipe URCOM de l'université du Havre et plus particulièrement Pr. Céline Picard, à l'initiative de notre collaboration. Grâce à toi, j'ai découvert la physico-chimie de surface et.. la Normandie ☺. Merci Livia, Daria, Alexandre, Marie et Charbel, de m'avoir associée à la vie du labo et à vos sorties !

Je souhaite également remercier Dr. Abdel Aouacheria et Dr. Loïc Lionnard, de l'ISEM à Montpellier pour nos échanges et notre collaboration fructueuse. Merci Loïc, pour ton implication et ta confiance lors de ma formation rapide mais intense sur tes cellules ^^ . Mes très chaleureux remerciements à Mme Chantal Ripoll, pour avoir accepté de m'enseigner l'histologie malgré la fermeture imminente de la plateforme.

J'exprime mes remerciements à l'école doctorale Sciences Chimiques Balard, au Cancéropole Grand Sud-Ouest et à la fondation Banque Populaire du Sud dont les prix m'ont permis de participer à des congrès internationaux.

Un immense merci Dr. Delphine Muriaux, pour ton aide précieuse et plus largement aux membres de l'association Femmes et Sciences de Montpellier, pour nos débats et nos actions auprès des plus jeunes.

I would like to thank my dear friends from the USA for your support and help when needed, to my former team from Bend Research, my mentor Michael Grass and my friends Kat, Alyssa and Warren

and to my very good friends (since more than 10 years now!) Caroline and Veronica! I will come back to see all of you like always once the situation gets better!!

Enfin et non des moindres, tous mes remerciements à mes amies Chloé, Astrid, Kath, Blandine, Coralie, Pénélope (la prépa nous a uni), Camille (mon épicurienne), Noémie, Anthony, Aude, Gaël, Bruno (les copains thésards), Robin, Marlène, François, Fatma (la team CERMAV) et Hélène, Mylène, Mathilde, Bénédicte (le girls team de l'IBMM) pour leur présence au quotidien et leurs encouragements.

Une dédicace unique à Jason pour son amour et son engagement à mes côtés, malgré la distance et le décalage horaire de ces derniers mois. Enfin le plus émouvant de mes écrits car comment remercier assez ma famille ! Alors sachez que vous êtes ma force, ma détermination, ma motivation, mon courage et que sans vous rien n'aurait été possible ♥.

Sommaire

Abréviations	15
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Bibliographie.....	21
I. La peau : une barrière protectrice contre les agressions extérieures.....	21
I.1 Structure et propriétés de la peau	21
I.2 La fonction barrière du <i>stratum corneum</i> contre les agressions extérieures	25
II. Les solutions possibles pour protéger la peau	27
II.1 Les systèmes réactifs aux radicaux libres.....	27
II.2 Les antioxydants : cas particulier des flavonoïdes	30
II.3 Zoom sur la quercétine.....	31
III. Le challenge de la délivrance par la voie topique	32
III.1 Les mécanismes de pénétration.....	32
III.2 Optimisation de la pénétration : les nanoformulations.....	33
III.3 Les formulations pour la délivrance topique de quercétine	38
IV. Les polyoxazolines	39
IV.1 La surconsommation de PEG, une problématique actuelle	39
IV.2 Les polyoxazolines comme alternative aux PEG	40
IV.3 Les lipopolyoxazolines.....	43
IV.3.1 Introduction.....	46
IV.3.2 POx and lipid precursors features	48
IV.3.3 Overview of LipoPOx	50
IV.3.4 Nanoformulations of LipoPOx	54
IV.3.5 Conclusion	63
V. Evaluation de la pénétration au travers de la peau	64
V.1 Mimer la barrière du <i>stratum corneum</i> par une bicouche lipidique.....	65
V.2 Les modèles de peau <i>in vitro</i>	65
V.3 Les modèles de peau <i>ex vivo</i> : les explants	67
V.4 Les méthodes d'évaluation <i>in vivo</i>	68
Références.....	71
Chapitre 2 : Synthèses et propriétés des polyoxazolines amphiphiles	79
I. Bibliographie.....	80

I.1	Généralités sur la polymérisation des oxazolines	80
I.2	Propriétés des POx amphiphiles.....	83
I.3	Le cas des tensioactifs ramifiés	85
II.	Synthèse d'amorceurs lipidiques	86
II.1	Amorceur lipidique linéaire : C _{18:2} OMs.....	88
II.2	Amorceur lipidique ramifié : C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ OTs.....	89
III.	Synthèse par polymérisation CROP de POx amphiphiles	90
IV.	Comportement des POx en solution aqueuse.....	93
V.	Etude de viabilité cellulaire des POx	95
VI.	Capacité antioxydante des POx amphiphiles	99
VI.1	Piégeage des radicaux libres par C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ POX _n selon le test chimique DPPH.....	99
VI.2	Piégeage des radicaux libres par C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ POX _n selon le test cellulaire.....	99
	Références.....	102
Chapitre 3 : Elaboration de nanoformulations à base de POx chargées en quercétine		103
I.	Les nanoémulsions	104
II.	Les liposomes	106
III.	Les micelles mixtes	107
III.1	Introduction.....	108
III.2	Materials.....	110
III.3	Methods	111
III.3.1	Amphiphilic polyoxazolines synthesis (POx).....	111
III.3.2	Chemical characterization of POx	111
III.3.3	Critical aggregation concentration determination.....	111
III.3.4	Preparation of quercetin loaded mixed micelles (Q-MM)	111
III.3.5	Photon correlation spectroscopy and electrophoretic mobility measurement.....	112
III.3.6	Stability of Q-MM	112
III.3.7	Transmission electron microscopy	112
III.3.8	Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	112
III.3.9	HPLC analysis	112
III.3.10	Encapsulation efficacy (EE) and drug loading capacity (DL)	113
III.3.11	In vitro radical scavenging ability by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH°).....	113
III.3.12	Cell culture.....	113
III.3.13	Cell viability.....	113
III.3.14	Antioxidant effect of quercetin on NIH3T3 cells	114

III.3.15	Statistical analysis.....	114
III.4	Results	115
III.4.1	Synthesis of amphiphilic POx.....	115
III.4.2	POx toxicity on NIH3T3 cells in comparison with PEG reference	115
III.4.3	Particle size and surface charge of mixed micelles	116
III.4.4	Morphology of mixed micelles	116
III.4.5	DSC analysis of Q-MM	117
III.4.6	Formulation stability studies of B-MM and Q-MM	118
III.4.7	Drug loading (DL) and encapsulation efficacy (EE) of Q-MM	119
III.4.8	Mixed micelles cellular viability on NIH3T3.....	119
III.4.9	Antioxidant effect.....	120
III.5	Discussion	122
III.6	Conclusion	124
III.7	Supplementary information	125
IV.	Les nanocapsules lipidiques	126
IV.1	Introduction.....	127
IV.2	Materials and methods	130
IV.2.1	LNC POx formulation	130
IV.2.2	Dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility measurement	131
IV.2.3	Stability of LNC	131
IV.2.4	Transmission electron microscopy (TEM)	131
IV.2.5	Atomic force microscopy (AFM).....	131
IV.2.6	Encapsulation efficacy (EE) and drug loading capacity (DL)	131
IV.2.7	HPLC analysis	132
IV.2.8	In vitro antioxidant activity	132
IV.2.9	Cell culture.....	132
IV.2.10	Cell viability.....	132
IV.2.11	Antioxidant effect of quercetin on TBHP treated NIH3T3 cells.....	133
IV.2.12	Antioxidant effect of quercetin on UVB irradiated NHEK cells	133
IV.2.13	Statistical analysis.....	133
IV.3	Results and discussion	133
IV.3.1	LNC formulation and characterization	133
IV.3.2	Quercetin loaded LNC and scavenging capacity.....	137
IV.3.3	Quercetin loaded antioxidant activity	138

IV.4	Conclusion	140
IV.5	Supplementary information	141
	Références.....	146
Chapitre 4 : Interactions de surface entre la peau et les POx formulés		149
I.	Bibliographie sur la détermination des interactions physico-chimiques de surface	150
II.	Etude du comportement aux interfaces air/liquide et liquide/surface des POx	154
II.1	Etude à l'interface air/liquide.....	154
II.2	Etude à l'interface liquide/surface du modèle de peau non biologique.....	155
II.3	Détermination des interactions physico-chimiques mises en jeu.....	158
III.	Etude de la physico-chimie de surface des formulations à base de POx sur un modèle non biologique.....	160
III.1	Introduction.....	161
III.2	Materials and Methods	162
III.2.1	Amphiphilic polyoxazolines (POx) synthesis: C ₁₆ POx _n and C _{18:2} POx _n	163
III.2.2	Preparation of mixed micelles (MM).....	163
III.2.3	Preparation of lipid nanocapsules (LNC)	163
III.2.4	Nonbiological skin surface model.....	164
III.2.5	Advancing contact angle measurement.....	164
III.2.6	Free surface energy determination.....	164
III.2.7	Statistical analysis.....	164
III.3	Results and discussion.....	164
III.3.1	Presentation of the mixed micelles and lipid nanocapsules	164
III.3.2	Interactions of mixed micelles and lipid nanocapsules with the NBSM model	166
III.3.3	Impact of each component of the nanoformulations	168
III.4	Conclusion	170
III.5	Supplementary information	171
	Références.....	174
Chapitre 5 : Evaluation de la pénétration des POx seuls et formulés		175
I.	Evaluation de la pénétration de modèle simple à étude in vivo	177
I.1	Introduction.....	178
I.2	Materials and Methods	179
I.2.1	Amphiphilic POx synthesis: C ₁₆ POx ₁₅ and C _{18:2} POx ₁₅	179
I.2.2	Formulation of quercetin loaded lipid nanocapsules (Q-LNC)	180
I.2.3	Giant unilamellar vesicles experiments.....	180

I.2.4	Cell culture.....	181
I.2.5	Cell viability	181
I.2.6	Cell interaction experiments	182
I.2.7	Animal experiments	182
I.2.8	Histology study on mice ears.....	183
I.3	Results and discussion.....	183
I.3.1	Study of the interaction with phospholipid membrane on GUV model	183
I.3.2	Study of the interaction with human cells	185
I.3.3	<i>In vivo</i> evaluation of the POx interaction with the ear skin of mice	187
I.4	Conclusion	192
I.5	Supplementary information	193
I.6	Résultats complémentaires.....	194
II.	Etude préliminaire de pénétration sur explants de peau humaine	197
	Références.....	202
	Matériels et Méthodes.....	204
I.	Synthèses des polyoxazolines	204
I.1	Linéaire saturé $C_{16}POx_n$	204
I.2	Linéaire insaturé $C_{18:2}POx_n$	204
I.3	Ramifié saturé $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$	205
I.4	Greffage sonde fluorescente	207
II.	Caractérisations des POx.....	207
II.1	Détermination de la concentration d'agrégation critique	207
II.2	Mesure de GPC et viscosité	208
III.	Nanoformulations et caractérisations.....	208
III.1	Nanoformulations	208
III.1.1	Nanoémulsions.....	208
III.1.2	Micelles mixtes	208
III.1.3	Nanocapsules lipidiques	208
III.2	Caractérisations physico-chimiques des nanoformulations	208
IV.	Culture cellulaire	208
IV.1	Repiquage.....	208
IV.2	Tests de viabilité cellulaire	209
IV.3	Tests antioxydant cellulaires	209
IV.4	Analyse statistique	209

V.	Etude des interactions de surface	209
VI.	Etude de pénétration	209
VI.1	GUV.....	209
VI.2	Cellules humaines.....	209
VI.3	Oreilles de souris	210
VI.4	Peau humaine.....	210
VI.4.1	Caractéristiques des explants de peau humaine.....	210
VI.4.2	Dépôt des solutions POx et nanoformulations POx	210
VI.4.3	Fixation et congélation des explants	211
VI.4.4	Découpe, marquage des noyaux, montage sur lames et observation	211
	Conclusion	212
	Références.....	215

Abréviations

AIBN :	azobisisobutyronitrile
AG :	alcool gras
AGr :	alcool gras ramifié
CAC :	concentration d'agrégation critique
CoTA :	co-tensioactif
CPE :	<i>chemical penetration enhancer</i>
CROP :	<i>cationing ring-opening polymerization</i>
DOX :	doxorubicine
DPH :	diphénylhexatriène
DPPC :	phosphatidylcholine
DP _n :	degré de polymérisation moyen en nombre
ERH :	épiderme reconstruit humain
FNH :	facteur naturel d'hydratation
FT :	<i>full thickness</i>
GUV :	<i>giant unilamellar vesicles</i>
H ₂ O ₂ :	eau oxygénée
IARC :	<i>international agency for research on cancer</i>
I _p :	indice de polymolécularité
IR :	infrarouge
IV :	intraveineuse
k _a :	constante d'amorçage
k _p :	constante de propagation
LCST :	<i>lower critical solution temperature</i>
LipoPOx :	lipopolyoxazolines
LNC :	nanocapsules lipidiques
LUV :	<i>large unilamellar vesicles</i>
Met :	méthionine
MIP :	isopropyl myristate
MLV :	<i>multilamellar vesicles</i>
MM :	micelles mixtes

M _n :	masse molaire moyenne en nombre
MOx :	2-méthyl-2-oxazoline
MsO :	mésylate
NBSM :	<i>nonbiological skin model</i>
NE :	nanoémulsions
NLC :	<i>nanostructured lipid carriers</i>
PA :	principe actif
PAMPA :	<i>parallel artificial membrane permeability assay</i>
PDI :	<i>polydispersity index</i>
PEG :	poly(éthylène glycol)
PEtOx :	poly(2-éthyl-2-oxazoline)
PIE :	perte insensible en eau
PMeOx :	poly(2-méthyl-2-oxazoline)
PMMA :	poly(méthacrylate de méthyle)
POx :	polyoxazolines
PPE :	<i>polymeric penetration enhancer</i>
PPS :	poly(sulfure de propylène)
PVPA :	<i>phospholipid vesicle-based permeation assay</i>
RNS :	espèces réactives azotées
ROS :	espèces réactives oxygénées
SC :	<i>stratum corneum</i>
SCLL :	<i>stratum corneum lipids liposomes</i>
SLN :	<i>solid lipid nanoparticles</i>
SOD :	superoxyde dismutase
SPE :	<i>skin penetration enhancer</i>
SUV :	<i>small unilamellar vesicles</i>
TA :	tensioactif
TEC :	<i>thiol-ene click</i>
TEWL :	<i>transepidermal water loss</i>
TS :	<i>tape stripping</i>
TsO :	tosylate
UV :	ultraviolet

Introduction générale

La peau, enveloppe vivante de plus de 2 m², est notre plus grand organe. Elle nous protège contre les multiples agressions extérieures de notre environnement quotidien : polluants, tabac, rayonnements UV... Cette fonction barrière protectrice est assurée par le *stratum corneum*, matériau multicouche lipidique complexe et unique. Mais ces agressions génèrent une surproduction des radicaux libres qui entraînent notamment la dégradation des protéines, de l'ADN et la peroxydation des lipides. A terme, ces altérations conduisent au vieillissement prématuré de la peau et à l'apparition de cancers cutanés comme le mélanome, phénomène en constante augmentation. L'enjeu de ce projet est donc de **délivrer des antioxydants dans les couches de l'épiderme viable** pour neutraliser l'excès de radicaux libres et **prévenir la dégradation de la peau** en optimisant le passage d'un obstacle difficile à franchir pour atteindre l'épiderme viable : *le stratum corneum*.

Pour répondre à cette problématique, deux équipes de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier (ICGM) : Matériaux Avancés pour la Catalyse et la Santé (MACS) et Ingénierie et Architectures Macromoléculaires (IAM) ont décidé d'unir leurs expertises pour **concevoir des nanoformulations** adaptées permettant de **(i) solubiliser et protéger l'antioxydant encapsulé, (ii) traverser le SC et (iii) assurer la délivrance de l'antioxydant dans l'épiderme**. Des polymères amphiphiles ont été spécifiquement élaborés pour stabiliser les nanoformulations et potentiellement augmenter la pénétration cutanée. Ainsi, les **polyoxazolines (POx)** ont été choisis pour leur synthèse présentant de nombreuses possibilités de fonctionnalisation, leur structure biomimétique et leurs propriétés proches de celles du poly(éthylène glycol) (PEG). Les POx sont également d'excellents candidats car ils offrent une alternative à la surconsommation du PEG dans les domaines pharmaceutique, cosmétique et même agroalimentaire. Cette surconsommation a engendré de nombreux problèmes de santé chez l'homme (bioaccumulation, hypersensibilité, anticorps PEG...) et il est nécessaire aujourd'hui de trouver de nouvelles alternatives et de diversifier les polymères hydrophiles. Ce travail de thèse a aussi pour objectif d'évaluer les POx comme alternative aux PEG, notamment pour une utilisation topique, cette application n'ayant jamais été envisagée auparavant.

Ces travaux de recherche apportent de nouvelles données sur les vastes possibilités qu'offrent ces polymères. Ces travaux ont déjà conduit à une revue et deux articles publiés, deux sont en préparation et un est encore à venir. Ces articles seront incorporés dans ce manuscrit et serviront de base pour une discussion des résultats.

Ainsi, ce manuscrit se divise en cinq chapitres :

Le **chapitre 1** présente le **contexte bibliographique** dans lequel ces travaux de thèse s'inscrivent. Dans un premier temps, la structure, la composition et l'organisation de la peau sont décrites avec une attention particulière portée sur la barrière du *stratum corneum*. Une description des différentes agressions extérieures et leurs impacts sur la peau ainsi que les solutions proposées telles que les antioxydants sont ensuite développés. Nous porterons également un intérêt particulier au défi de la délivrance topique et des nanoformulations. Dans un deuxième temps, nous présenterons la problématique des PEG liée à leur surconsommation et l'alternative proposée avec les POx. La revue « *Recent advances and prospects in nanodrug delivery systems using lipopolyoxazolines* » apportera plus de précisions sur les synthèses et les propriétés des POx amphiphiles possédant une chaîne alkyle

lipidique. Enfin, dans un troisième temps, nous aborderons l'évaluation de la pénétration de molécules sur différents modèles mimant la peau humaine et les techniques d'analyse associées.

Le **chapitre 2** décrit la **synthèse des polyoxazolines amphiphiles** développées dans cette étude. Leurs architectures macromoléculaires sont variées : linéaire saturé, linéaire insaturé et ramifié saturé avec pour chacune deux degrés de polymérisation. L'influence de ces structures sur leurs propriétés physico-chimiques est évaluée notamment à l'interface air/eau. De plus, la collaboration avec le Dr M. Morille (ICGM, MACS) a permis d'évaluer la viabilité cellulaire et l'activité anti-radicalaire des POx.

Le **chapitre 3** s'appuie sur les deux articles publiés « *Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery* » et « *Polyoxazolines based lipid nanocapsules for topical delivery of antioxidants* » pour exposer les deux principales **nanoformulations à base de POx chargées en antioxydant** développées dans cette étude. Les caractéristiques physico-chimiques, la stabilité, le taux de chargement et l'activité antioxydante de la quercétine encapsulée dans les micelles mixtes et les nanocapsules lipidiques seront également discutés. L'efficacité des nanocapsules lipidiques a pu être évaluée sur cellules humaines suite à une exposition aux UV grâce à une collaboration avec le Dr L. Lionnard (Institut des sciences de l'évolution à Montpellier, ISEM).

Dans le **chapitre 4**, les **interactions physico-chimiques de surface** entre les POx seuls ou formulés et un modèle non biologique mimant les propriétés de la peau sont démontrées grâce à une collaboration avec le Dr. C. Picard (Université du Havre, URCOM). Une première étude évalue le comportement des différents POx aux interfaces air/liquide et liquide/solide pour comprendre les interactions mises en jeu. Une deuxième étude, rédigée sous forme d'article intitulé « *Study of the physicochemical interactions of nanoformulations based on polyoxazolines with a skin surface model* » présente les interactions physico-chimiques de surface des deux nanoformulations POx avec le modèle de peau.

Enfin, le **chapitre 5** expose les **études de pénétration des POx et des nanoformulations POx** sur les différents modèles de peau. L'évaluation de la capacité d'insertion des POx dans des membranes lipidiques de GUV et de cellules humaines ainsi que la pénétration *in vivo* sur oreille de souris des POx et nanocapsules lipidiques ont été effectuées en collaboration avec le Dr M. Golzio (équipe Dr M.P. Rols, Institut de pharmacologie et biologie structurale, IPBS). Les résultats sont présentés sous forme d'article « *Evaluation of the polyoxazolines interaction with epidermis : from a simple GUV model to in vivo study* ». Une deuxième partie est consacrée à l'examen de la pénétration sur explants de peau humaine grâce à une étude histologique réalisée en collaboration avec C. Ripoll (Institut des neurosciences de Montpellier, INM).

Pour évaluer le potentiel des POx et des nanoformulations POx pour la délivrance cutanée d'antioxydants et comprendre les interactions mises en jeu, de nombreux domaines de recherche ont été impliqués et ceci au travers de collaborations (Figure 1). Ces travaux de thèse allient de multiples compétences entre la science des polymères, la formulation, la physico-chimie, la biologie cellulaire et l'histologie.

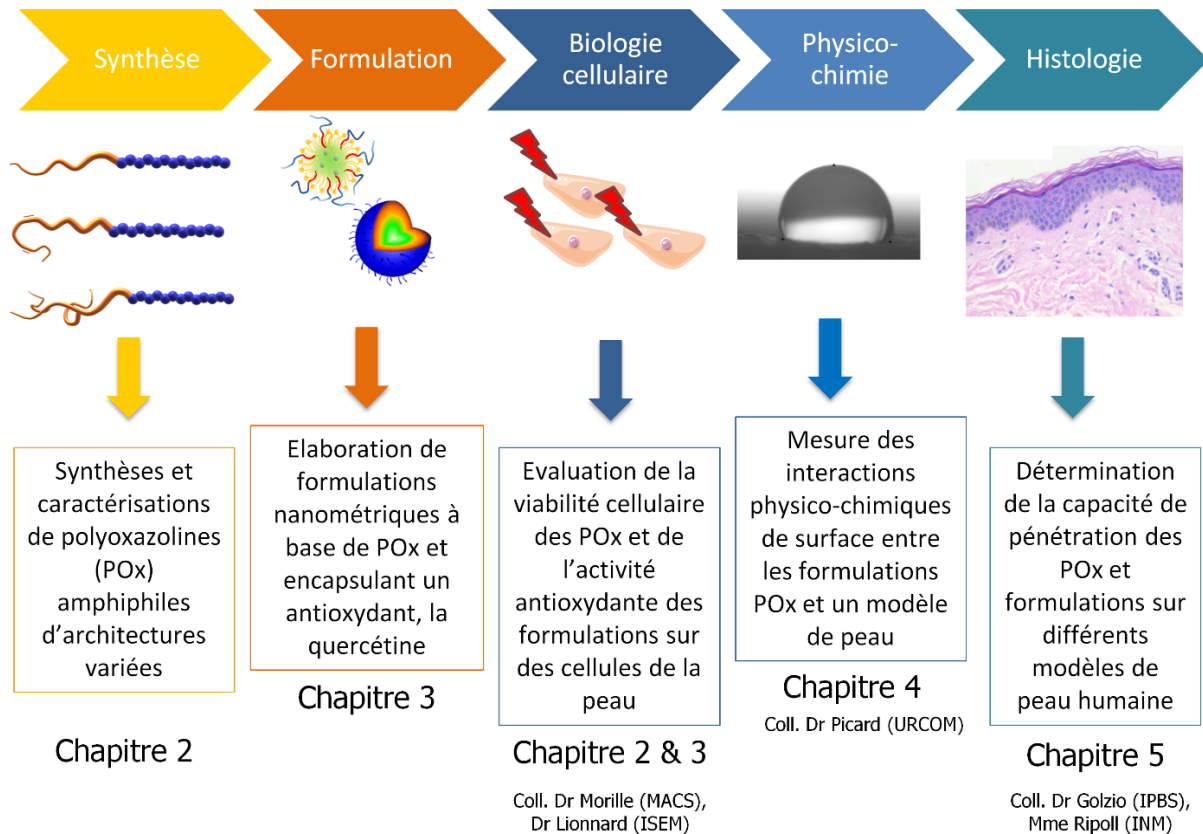


Figure 1 : Présentation générale de la thèse

Ces travaux de recherche ont également fait l'objet de communications lors de congrès nationaux et internationaux sous formes orale et poster.

Présentations orales :

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *PEG free formulations towards an effective quercetin antioxidant topical delivery*, SFNano annual meeting (Vème édition), décembre 2018, Montpellier.

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *PEG free topical formulations towards an effective antioxidant delivery system to prevent skin ageing*, Skin Challenges 2019, février 2019, Porto, Portugal.

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *PEG free formulations towards an effective antioxidant topical delivery to prevent skin damages*, 25th IFSCC Conference 2019, octobre 2019, Milan, Italie.

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *Innovative topical delivery platform based on polyoxazoline to prevent skin ageing*, International Symposium of SFC 2019, décembre 2019, Paris.

Présentations poster:

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *Innovative topical delivery platform based on polyoxazoline to prevent skin ageing*, International Symposium of SFC 2019, décembre 2019, Paris

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *Polyoxazolines for topical applications via phospholipid-based delivery system of antioxidant*, Pôle Chimie Balard conferences, Juin 2018.

Prix de la meilleure présentation scientifique

-L. Simon, V. Lapinte, N. Marcotte, J.M. Devoisselle, S. Bégu, *PEG free topical formulations towards an effective antioxidant treatment to prevent skin cancer*, Journées Cancéropole Grand Sud-Ouest, Novembre 2018.

Prix de la meilleure présentation scientifique

Chapitre 1 : Bibliographie

L'objectif de ce chapitre bibliographique est de présenter le contexte dans lequel ces travaux de thèse s'inscrivent. Une attention particulière sera portée à l'évaluation de l'efficacité de nouvelles formulations pour la délivrance topique permettant de répondre à la problématique de surconsommation de PEG.

Nous allons donc tout d'abord présenter **la peau** et comprendre en quoi sa structure et sa composition assurent avec succès un rôle de barrière protectrice vis-à-vis de l'environnement. En effet, les **multiples agressions extérieures** mettent en jeu l'intégrité de la peau et à terme ces altérations peuvent conduire à l'apparition de cancers cutanés. Nous étudierons, dans une deuxième partie, **les solutions envisageables** pour protéger la peau de ces attaques avec notamment l'administration d'**antioxydants**. Mais pour délivrer ces molécules efficacement dans la peau et atteindre les couches cibles, il faut franchir cette barrière et surmonter le **challenge de la délivrance topique**. Pour cela, nous verrons dans une troisième partie, les systèmes mis en œuvre pour permettre une action efficace au sein de la peau. Parmi ces systèmes, les **nanoformulations** ont démontré leur efficacité. Néanmoins, elles contiennent souvent dans leur composition des polymères de type poly(éthylène glycol) (PEG). Or, comme nous allons le montrer dans la quatrième partie, la surutilisation des PEG a conduit depuis quelques années à l'apparition de nombreux effets secondaires. Ainsi, il est primordial de développer des formulations topiques basées sur l'utilisation de nouveaux polymères tels que les **polyoxazolines** (POx). Cette étude a d'ailleurs fait l'objet d'une revue « *Recent advances and prospects in nanodrug delivery systems using lipopolyoxazolines* » publiée dans *International Journal of Pharmaceutics*. Enfin, dans une dernière partie, nous développerons les différents outils et méthodes **d'évaluation de la pénétration** de molécules dans la peau.

I. La peau : une barrière protectrice contre les agressions extérieures

Enveloppe vivante de plus de 2 m², la peau est notre plus grand organe [1]. Elle nous protège contre les multiples agressions extérieures de notre environnement quotidien : chaleur, pollution, rayonnements ultraviolets (UV). Cette fonction de barrière protectrice est notamment assurée par le *stratum corneum* (SC), matériau multicouches de nature lipidique complexe [2]. Afin de mieux comprendre son fonctionnement, nous allons nous intéresser à la structure de la peau et ensuite plus spécifiquement à celle du SC.

I.1 Structure et propriétés de la peau

La peau est constituée **de trois couches successives** : l'épiderme comprenant le *stratum corneum*, le derme et l'hypoderme (Figure 2). **L'hypoderme** est un tissu conjonctif vascularisé et adipeux servant d'isolant et de réserve énergétique.

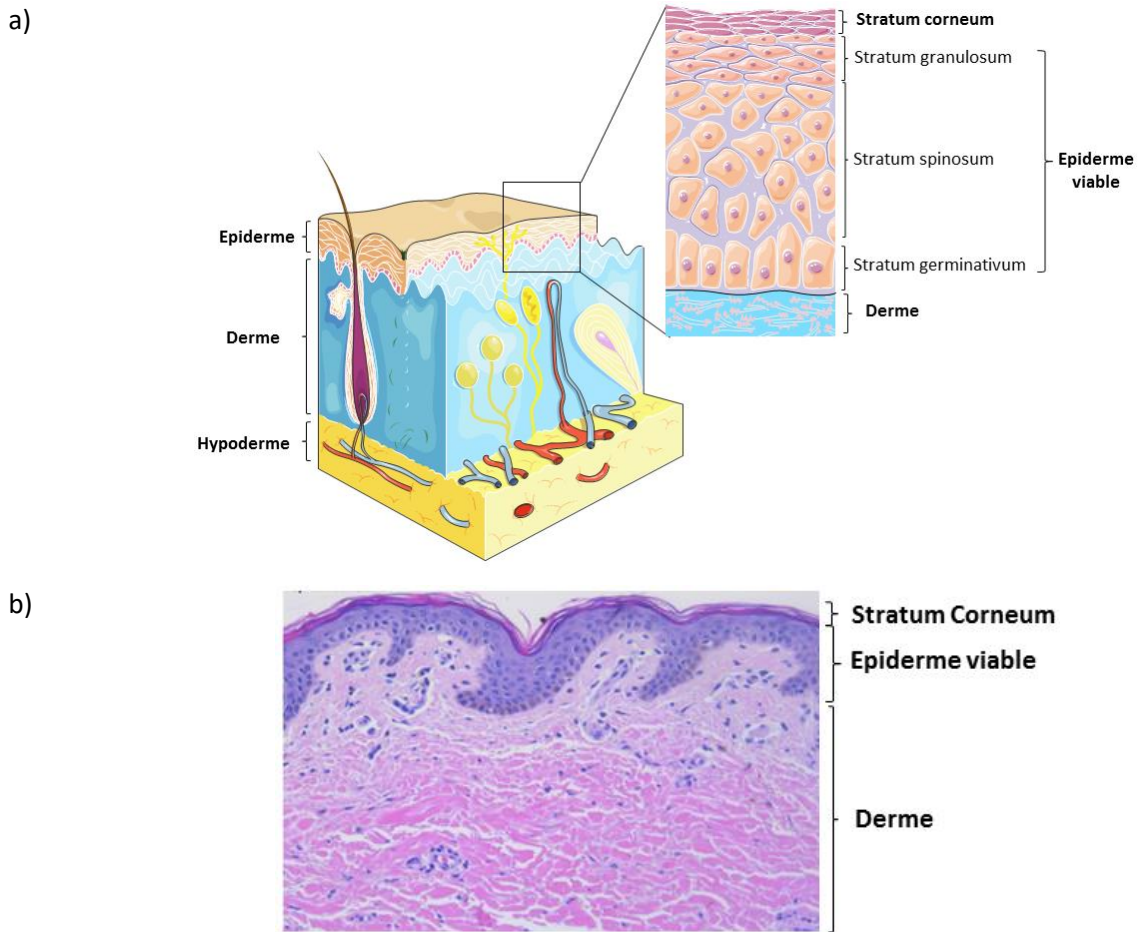


Figure 2 : a) Représentation schématique de la structure de la peau, de l'épiderme à l'hypoderme. b) Coupe de peau humaine, coloration hématoxyline et éosine

L'épiderme est constitué de l'épiderme viable d'une épaisseur de 50-100 μm et du SC de 10-20 μm . L'épiderme repose sur la lame basale d'une épaisseur de 200 nm qui sépare le derme de l'épiderme. Cette jonction dermo-épidermique garantit l'adhésion des deux couches, aide à l'organisation spatiale des kératinocytes, contrôle les échanges moléculaires et cellulaires entre le derme et l'épiderme et facilite la cicatrisation.

On ne peut pas aborder l'épiderme sans parler de l'un de ses constituants majoritaires : **l'eau**. En effet, en conditions physiologiques, 70% de l'eau présente dans la peau se situe dans l'épiderme viable. Cette hydratation est responsable de l'élasticité, des activités enzymatiques et de la signalisation cellulaire. L'homéostasie hydrique est garantie notamment par la matrice lipidique, les jonctions serrées du SC et les molécules composant le facteur naturel d'hydratation (FNH). Le FNH, localisé dans la couche cornée, est composé de molécules hygroscopiques telles que les acides aminés et de composants extracellulaires (urée, sucres...) [3]. Ces deux facteurs limitent la perte insensible en eau (PIE), également appelée *transepidermal water loss* (TEWL), correspondant à la vitesse de migration de l'eau de la peau vers l'environnement extérieur.

L'épiderme se divise en quatre couches successives qui permettent d'assurer chacune des étapes du processus de différenciation des cellules kératinocytes en cornéocytes chargées en kératine et qui constitueront le SC [2] :

- **La couche basale** ou dite germinative (*stratum germinativum*) est la couche la plus profonde où les cellules kératinocytes sont encore indifférenciées (cellules souches). Le processus de différenciation est amorcé lors de leur migration vers la couche supérieure et dure environ deux semaines [4]. Les cellules dendritiques et les mélanocytes (responsables de la synthèse de mélanine permettant la pigmentation) sont également présents [1],

- **La couche épineuse** (*stratum spinosum*) est le siège de la migration des kératinocytes où ils amorcent la kératinisation. Lors de ce phénomène, les kératinocytes synthétisent une protéine fibreuse : la kératine, constituant majoritaire des cellules cornéifiées du SC [4],

- **La couche granuleuse** (*stratum granulosum*) constitue la dernière couche de l'épiderme viable où les cellules en différenciation s'enrichissent encore en kératine et s'aplatissent. Les granules de kératohyaline présentes dans cette couche facilitent ce processus grâce à deux protéines : profilaggrine et involucrine. Ces protéines sont responsables de l'agrégation de la kératine et de la formation de l'enveloppe des cellules conduisant à la structure particulière du SC [4]. Les corps lamellaires [5], également présents, contiennent des lipides polaires tels que des phospholipides, du cholestérol ou des glucosylcéramides qui se superposent à la surface des cornéocytes pour former un ciment intercornéocytaire compact [6], [7],

-Enfin, en contact avec l'environnement extérieur, **le stratum corneum** est la dernière couche de l'épiderme. Il représente la partie la plus importante de notre étude. Le *stratum corneum* assure la barrière physique de la peau grâce à ses 15 à 25 couches de cellules cornéifiées (sans noyau ni organite) plates et enrichies en kératine, appelées cornéocytes. La structure du SC ressemble à « des briques et du ciment » où les cornéocytes sont les briques et les lipides intercellulaires le ciment comme illustré sur la Figure 3. La jonction entre les cornéocytes est optimisée par les cornéodesmosomes [8]. Lors de la desquamation, la dégradation enzymatique des cornéodesmosomes et du ciment intercellulaire conduit à la déstructuration du SC. Cette étape permet d'éliminer les cellules mortes par simple frottement et ainsi de laisser place au renouvellement cellulaire initié dans la couche basale.

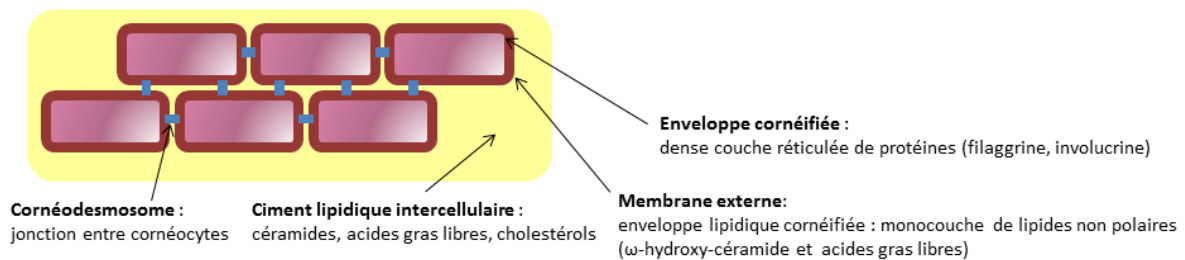


Figure 3 : Schématisation de la structure des cornéocytes et du ciment lipidique

La matrice lipidique est constituée à 90% de trois types de lipides : les céramides (représentant environ 50% de la matrice lipidique), le cholestérol (25%) et les acides gras libres (15%). Les 10% restants sont des phospholipides et du sulfate de cholestérol jouant un rôle de régulation de la desquamation [7]. Les céramides sont composés d'une chaîne d'acide gras (de longueur C14 à C30) liée à une base sphingoïde (de longueur C16 à C20) par une liaison amide [6]. On dénombre au total douze classes de céramides dans la matrice du SC. Les acides gras libres principalement saturés ont une chaîne carbonée de longueur C14 à C28 [9]. Il existe plus d'une trentaine d'acides gras libres différents, majoritairement les acides palmitique, stéarique, oléique et lignocérique.

Enfin, à la surface de la peau se trouve le **film hydrolipidique** constitué d'eau issue majoritairement de la sueur et de deux types de lipides : les lipides épidermiques produits par des corps lamellaires du ciment intercellulaire [10] et les lipides sébacés sécrétés par les glandes sébacées [11].

La matrice lipidique intercellulaire du SC adopte une **organisation unique** en couches lamellaires successives [2]. A l'intérieur de ces couches, les lipides ont une organisation latérale qui peut être, suivant les zones, très dense de type orthorhombique, peu dense de type hexagonal ou désordonnée en phase liquide (Figure 4). En effet, à la surface du SC, les lipides sont désorganisés alors que dans les couches profondes, ils ont une organisation orthorhombique dense et compacte formant ainsi une barrière efficace et limitant la perte en eau [12].

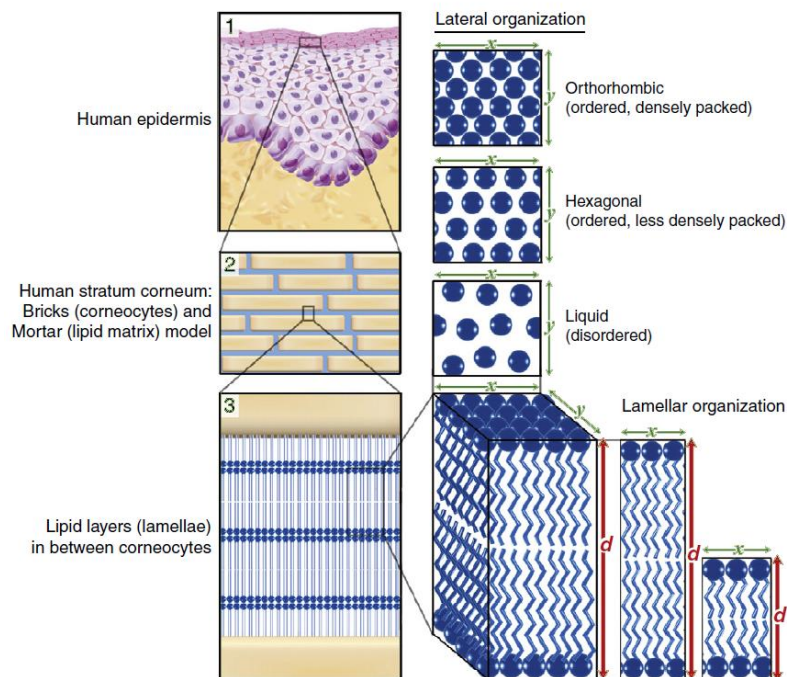


Figure 4 : Schéma de l'organisation de la matrice lipidique du SC, extrait de [2]. (1) Structure de l'épiderme, (2) organisation lamellaire des couches de lipides, (3) organisation latérale des lipides au sein des couches ; « d » représente la distance plus ou moins longue entre chaque répétition.

Cette organisation unique a notamment été mise en évidence par spectroscopie infrarouge (IR). En effet, il est possible de déterminer l'organisation latérale selon le nombre d'onde de vibration des groupements CH_2 des chaînes lipidiques et en particulier selon leur mode de vibration d'élongation symétrique $\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$. Plus le nombre d'ondes associé est élevé, plus les chaînes sont désorganisées [13]. Le suivi par IR de l'évolution du comportement du SC en fonction de la température a notamment permis d'identifier deux transitions de phase : solide-solide (passage du système orthorhombique à hexagonal) à 20-40 °C et gel-liquide (passage du système hexagonal à désordonné) à 80-90 °C [12]. Cette technique a également démontré en quoi l'organisation particulière des lipides du SC assure la fonction barrière de la peau contre les agressions extérieures.

Le derme sert principalement de réservoir de sang, de cellules immunitaires et de produits cellulaires (enzymes, métabolites et cytokines). Il se compose de deux parties de structure et de composition différentes : le derme réticulaire et le derme papillaire. Le derme réticulaire dense et épais se situe en profondeur. Il garantit la stabilité mécanique grâce à la matrice extracellulaire (protéines,

protéoglycanes...) et les fibres de collagène et d'élastine qui le composent. Le derme papillaire supérieur est en contact avec l'épiderme *via* la jonction dermo-épidermique et aborde une structure spongieuse. Il est riche en vaisseaux sanguins, lymphatiques et terminaisons nerveuses [14]. D'un point de vue cellulaire, les fibroblastes sont présents en majorité dans cette couche mais on trouve également des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques. Enfin, on observe aussi la présence d'annexes tels que les follicules pileux et glandes sébacées [1].

I.2 La fonction barrière du *stratum corneum* contre les agressions extérieures

Il est à noter que la description de la fonction barrière qui suit s'inscrit dans le cas d'une peau saine. En effet, les fonctions de la peau peuvent être altérées notamment par des maladies cutanées, le vieillissement ou la déshydratation [15]. Ces conditions ne font pas l'objet de notre étude.

En conditions normales, **le SC assure une fonction barrière à double sens** tout d'abord en **limitant les pertes en eau** issue de l'épiderme profond [6]. L'eau contenue dans l'épiderme assure son fonctionnement et plus particulièrement la fonction barrière du SC en maintenant ses propriétés mécaniques et son activité enzymatique. Sachant que le gradient en eau régule le transport de molécules au travers de la peau, une déshydratation impacterait la perméabilité de la peau [16]. Il est donc primordial de maintenir l'hydratation de l'épiderme en assurant la cohésion du SC et en luttant contre les attaques de l'environnement externe.

Le SC permet aussi de **protéger la peau des agressions extérieures** aussi bien d'ordre microbiologique que physique. En effet, la peau dispose de plusieurs systèmes de défense pour lutter contre **les micro-organismes extérieurs pathogènes** (tout en conservant son microbiote intact). Le film hydrolipidique assure une première barrière chimique en maintenant un pH acide à la surface de la peau entre 5 et 5,5. Ce pH permet également de réguler l'activité d'enzymes contribuant à éliminer les micro-organismes présents à la surface de la peau par desquamation [7]. La deuxième barrière est basée sur la réponse immunitaire de la peau grâce à deux sentinelles principales : les kératinocytes et les cellules de Langerhans. Les kératinocytes activent la première ligne de défense : les peptides antimicrobiens capables de détruire les bactéries, les champignons ou les virus en s'attaquant à l'intégrité de leur membrane lipidique [17]. Les cellules de Langerhans, cellules dendritiques de l'épiderme, déclenchent la réponse immunitaire en assurant la phagocytose et en fixant les antigènes sur les lymphocytes activant ainsi le système immunitaire [4].

Krutmann et al ont défini par le terme « *skin aging exposome* » l'ensemble des **agressions physiques extrinsèques** : UV, fumée de cigarette, température, alimentation, stress, manque de sommeil et pollution [18] qui ont un impact néfaste sur la peau conduisant à son vieillissement prématuré. En effet, tout notre organisme est continuellement exposé aux sources polluantes environnementales mais de par sa localisation, la peau est en première ligne face à ces agressions [19]. Parmi les plus fréquentes, l'exposition au soleil, et plus précisément **aux rayonnements ultra-violets (UV)** notamment les UV A ($\lambda = 320-400$ nm) et UV B ($\lambda = 280-320$ nm) est celle qui impacte le plus fortement la peau. Pour se défendre, les mélanocytes stimulés par les UV produisent des pigments de mélanine (eumélanine et phéomélanine). Ces pigments absorbent en partie les rayonnements et limitent leur pénétration [4] mais lorsque la peau est surexposée aux UV, cette barrière naturelle ne suffit plus. Si les UVB pénètrent uniquement dans les couches superficielles de l'épiderme, les UVA peuvent

atteindre les couches profondes du derme et représentent un réel danger. En effet, les rayonnements UV créent par réaction photochimique des radicaux libres, aussi appelés espèces réactives oxygénées (ROS) ou azotées (RNS) qui sont des molécules instables (présence d'un électron non apparié) tel que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) [20]. Les UV causent également des mutations dans l'ADN entraînant une réaction en chaîne sur la régulation des gènes de l'inflammation et du cycle cellulaire [21],[22] qui peut conduire à l'apparition de cancers cutanés. Le lien entre les UV et l'apparition de cancers de la peau tels que le mélanome est clairement établi [23], [24].

Pour lutter contre ces agressions et plus particulièrement contre l'excès de radicaux libres, la peau dispose d'un **système de défense grâce aux antioxydants** naturellement présents dans l'épiderme et le derme. Les antioxydants intrinsèques, capables de neutraliser les radicaux libres et de réparer l'ADN, peuvent être d'origine enzymatique (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase (SOD), la catalase) ou non-enzymatiques (vitamine E, vitamine C ou caroténoïdes) [24]. Il est important de noter que tous les radicaux ne sont pas néfastes car ils sont également produits naturellement par l'organisme (les mitochondries, les peroxysomes ou le réticulum endoplasmique) pour assurer par exemple le transport d'électrons, la communication cellulaire, détruire les organismes pathogènes ou induire l'apoptose des cellules [25]. Il faut donc maintenir un **équilibre biologique naturel** entre les radicaux libres et les antioxydants mais en cas de surproduction de radicaux libres qui saturent le système de défense d'antioxydants, l'équilibre est rompu, créant un stress oxydant ou stress oxydatif [26]. Les radicaux libres en excès interagissent avec les membranes lipidiques cellulaires initiant le processus de peroxydation en cascade des lipides et endommagent les protéines, acides nucléiques et organites conduisant à la sénescence des cellules qui arrêtent de se reproduire et meurent [27].

Comme représenté sur la Figure 5, de nombreux autres facteurs environnementaux génèrent aussi des radicaux libres qui accélèrent le vieillissement de la peau et peuvent induire des cancers cutanés. Parmi eux, on peut citer **l'ozone** (gaz oxydant obtenu par réaction chimique entre l'oxygène et les UV) qui dégrade le *stratum corneum* via la peroxydation des lipides [19] et **la fumée de cigarette** contenant plusieurs milliers de substances chimiques pro-oxydantes (oxydes nitriques). Enfin, les **particules polluantes** stimulent la production de radicaux libres dans les mitochondries et **les hydrocarbures** activent la prolifération des mélanocytes qui induisent une hyperpigmentation et une réaction inflammatoire [22].

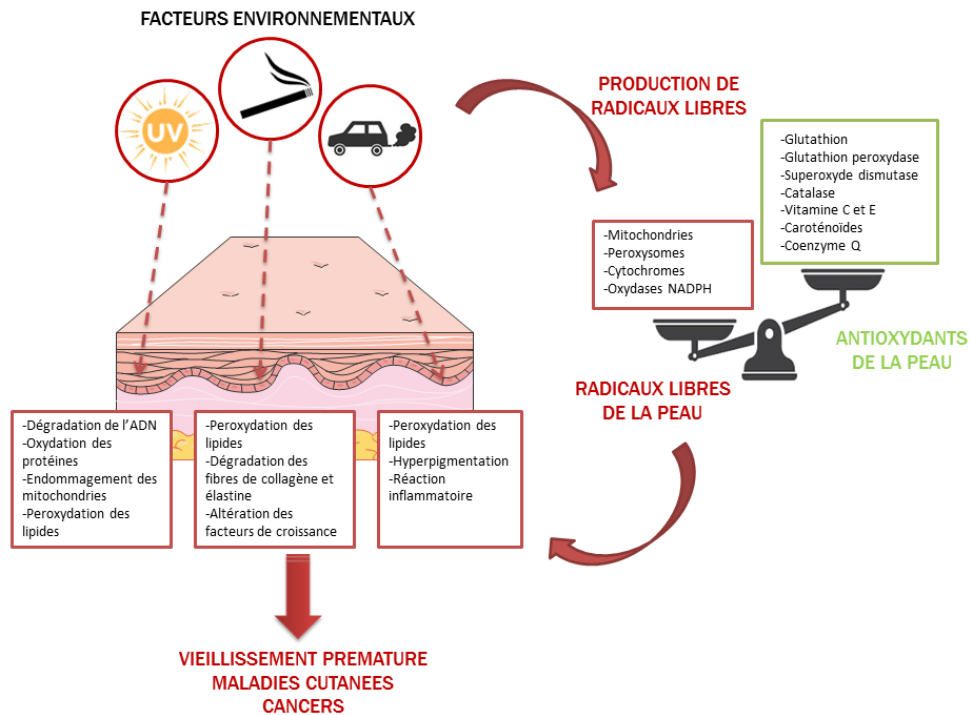


Figure 5 : Impact des facteurs environnementaux sur la peau

Au-delà du **risque élevé de cancers induit par ces facteurs environnementaux**, la peau subit aussi de nombreux changements structuraux. Le renouvellement des kératinocytes est diminué réduisant la fonction de barrière du SC qui ne peut plus maintenir l'eau dans les tissus ; la PIE est accélérée, la peau est déshydratée et présente un aspect desséché. Le nombre de fibroblastes dans le derme diminue, la synthèse de collagène et d'élastine est ralentie, entraînant à terme une perte en densité. Enfin, le système immunitaire est affaibli par une diminution des cellules de Langerhans [28]. Une corrélation entre la pollution de l'air et certaines maladies cutanées comme l'eczéma, l'urticaire ou la dermatite atopique a ainsi été établie [19].

Des solutions existent pour limiter l'impact de ces facteurs et l'apparition de cancers cutanés en protégeant l'épiderme, couche où le cancer se développe en premier [24]. L'objectif est donc de rétablir en priorité l'équilibre physiologique au niveau de l'épiderme entre les radicaux libres et les antioxydants tout en maintenant le niveau de radicaux libres nécessaires à la survie des cellules [29].

II. Les solutions possibles pour protéger la peau

Une des stratégies pour limiter l'excès de radicaux libres est de les mettre en contact *in situ* avec des molécules capables de les neutraliser. Pour cela, deux approches sont envisageables soit par l'intermédiaire de systèmes présentant **des fonctions réactives aux radicaux libres** soit en augmentant le taux d'**antioxydants** dans les tissus.

II.1 Les systèmes réactifs aux radicaux libres

- ✓ Les différentes fonctions réactives aux radicaux libres

De nombreuses fonctions chimiques présentes dans des systèmes dits « **ROS responsive** » réagissent au contact des radicaux libres oxygénés (ROS pour *reactive oxygen species*) (Figure 6). Une réaction d'oxydation a lieu soit sur les chaînes latérales des systèmes ROS responsables conduisant à une modification des propriétés physiques telle que la solubilité, soit sur leur chaîne principale entraînant la scission des liaisons [30], [31].

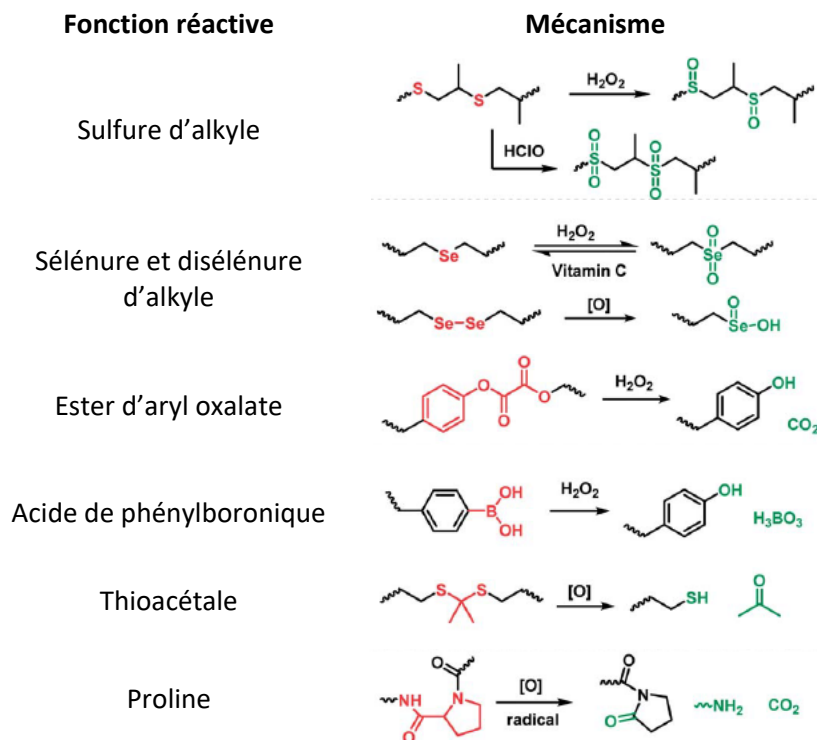


Figure 6 : Fonctions chimiques sensibles à l'oxydation et leurs produits oxydés extrait de [32]

Modification des chaînes latérales :

L'acide aminé méthionine (Met) en présence de radicaux libres se transforme en sulfoxyde puis en sulfone suite à l'oxydation de ses groupements sulfure ou thioéther. A l'issue de cette réaction, la polarité des groupements est modifiée entraînant **une augmentation de la solubilité** de la molécule dans l'eau. En effet, les thioéthers ont des moments dipolaires compris entre 1 et 1,5 Debye tandis que les sulfoxydes et les sulfones sont supérieurs à 4 Debye [33].

Le sélénium, constituant d'enzymes telle la glutathion peroxydase assurant le système de défense antioxydant de l'organisme [30], est également très réactif aux radicaux libres en s'oxydant en sélénioxyde puis sélénone. Les tellures ont la même réactivité que les séléniums et leur solubilité est également modifiée par l'oxydation, les rendant plus hydrophiles.

Modification par scission :

Parmi les fonctions où **l'oxydation entraîne la scission des liaisons chimiques** se trouve les boronates. En effet, la liaison bore/carbone des aryles boronates subit une oxydation rapide et quantitative en présence de H_2O_2 car la cinétique de réaction est dominée par la nucléophilie du bore ce qui entraîne une réaction plus rapide [34].

✓ Les polymères et formulations réactives aux radicaux libres

Dans le domaine de la santé, **diverses fonctions peuvent donc être insérées dans des polymères pour induire une réponse au contact des radicaux par oxydation**. Il a été défini six groupes de polymères sensibles à l'oxydation : les poly(sulfure de propylène) (PPS), les polymères à base de sélénium, les polymères contenant des groupements oxalate ou boronate, contenant des prolines et enfin des polymères de type poly(thiocétal) [32]. Nous allons plus particulièrement nous intéresser aux polymères contenant un atome de soufre tels que **les polysulfures et les poly(thiocétal)s** car nous avons introduit cet atome dans nos polymères de synthèse. Les résultats des études publiées sur différentes formulations (micelle, polymersome, nanoparticule, hydrogel) sont résumés dans le Tableau 1. La morphologie et la libération des actifs formulés sont modulées avec succès par la réactivité des groupements aux radicaux. Ainsi, il est possible d'avoir des formulations répondant aux stimuli des radicaux.

Tableau 1 : Récapitulatif des formulations existantes à base de polysulfure ou polythiocétal

Polymère réactif	Formulation	Composition	Résultats	Références
Polysulfure	Microsphère	PPS chargé en curcumine	Libération contrôlée en présence de H ₂ O ₂	[35]
	Micelle	PPS- <i>b</i> -PDMA	Libération contrôlée de molécules hydrophobes (DiO, Nile Red) en présence de H ₂ O ₂	[36]
	Micelle	PPS- <i>b</i> -PEG chargé en ciclosporine A	Influence de différents DP _n de PPS sur l'encapsulation dans le cœur hydrophobe	[37]
	Micelle	PPS- <i>b</i> -PEG conjugué avec SOD	Organisation avec un cœur réactif : polysulfure et SOD et couronne de PEG	[38]
	Micelle	PPS- <i>b</i> -PEG chargé en célastrol	Délivrance et maintien de l'activité inhibitrice dans le traitement de l'athérosclérose	[39]
	Polymersome	PEG- <i>b</i> -PPS- <i>b</i> -PEG	Changements morphologiques induits par l'oxydation	[40]
	Nanoparticule	Cœur réticulé de PPS et une couronne PEG	Ciblage des cellules dendritiques dans les ganglions	[41]
	Nanoparticule	PPS- <i>b</i> -PEG chargé en antioxydant mélatonine	Libération contrôlée en réponse aux radicaux libres liée à l'inflammation	[42]

	Nanoparticule	PPS conjugué à un antigène thiolé et des protéines adjuvantes <i>via</i> des ponts disulfures	Vaccination intra-nasale induisant l'immunité de la muqueuse	[43]
	Hydrogel thermosensible	PPS- <i>b</i> -PDMA- <i>b</i> -PNIPAAm chargé en NileRed	Libération contrôlée du NileRed <i>in vivo</i> (14 jours)	[44]
Polythiocétal	Polyplexe	Poly(aminothiocétal) chargé en ADN	Libération contrôlée de l'ADN par les cellules cibles	[45]
	Nanoparticule	Poly-(diméthyléthioacétal de 1,4-phénylacétone) chargé en siARN	Administration orale : libération ciblée dans l'intestin pour lutter contre l'inflammation	[46]
	Micelle	Méthoxy-PEG-thiocétal-poly(ϵ -caprolactone) chargée en DOX	Les liaisons π - π entre DOX et la formulation améliorent la stabilité, l'encapsulation et l'efficacité <i>in vitro</i> sur cellules cancéreuses	[47]
	Support d'ingénierie tissulaire	Poly(thiocétal uréthane)	Dégradation en fonction de la concentration en radicaux libres	[48]

Abréviations : PPS : poly(sulfure de propylène) ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; SOD : superoxyde dismutase ; PDMA : poly(*N,N*-diméthylacrylamide) ; NileRed : rouge de Nil ; DiO : Benzoxazolium ; PEG : poly(éthylène glycol) ; PNIPAAm : poly(*N*-isopropylacrylamide) ; polyplexe : système polymère contenant de l'ADN ou gène condensé ou complexé via des interactions électrostatiques ; DOX : doxorubicine

En résumé, dans le cas des polysulfures, la libération des molécules encapsulées dans les formulations est liée au changement de solubilité (hydrophobe à hydrophile) conduisant par exemple à des changements de conformation (passage de vésicules à micelles) [49]. Concernant les formulations à base de poly(thiocétal), les liaisons disulfure se clivent au contact des radicaux, dégradant le polymère et libérant les molécules actives encapsulées.

Certains polymères ou formulations, appelés « multi-stimulables », sont capables de répondre à un second stimulus tel que la température, le pH, la réduction [30], la lumière ou l'activité enzymatique [50].

II.2 Les antioxydants : cas particulier des flavonoïdes

Pour lutter contre le stress oxydant et rétablir l'équilibre entre les radicaux libres et les antioxydants naturels de l'organisme, il est possible de **délivrer des antioxydants** supplémentaires. Ils peuvent agir de plusieurs façons : en donnant un atome d'hydrogène, en inhibant l'oxygène singulet, en décomposant les peroxydes, en inhibant une enzyme oxydante ou en absorbant les radiations UV [26]. Il existe une dizaine de familles d'antioxydants dont les caroténoïdes (β -carotène, lycopène lutéine), les vitamines (A, C, E, D), les minéraux (sélénium, zinc) ou les polyphénols (flavonoïde, coumarine,

anthoxyane)...[51]. Dans le cadre de notre étude, nous allons nous intéresser aux polyphénols et plus particulièrement au cas des flavonoïdes et du sous-groupe des flavonols. En effet, les flavonoïdes sont des composés très lipophiles (présentant une très faible pénétration cutanée) avec une structure polycyclique aromatique (Figure 7). La nature des substituants définit des sous-groupes tels que les dérivés flavaniques avec les flavonols [52]. Les flavonols possèdent sur leur cycle central un phénol hydroxylé en C₃ relié à un enchainement de doubles liaisons et à une fonction carbonyle en C₄ lui conférant son pouvoir antioxydant. Parmi les flavonols, nous avons sélectionné pour notre étude la **quercétine** que nous allons présenter en détails.

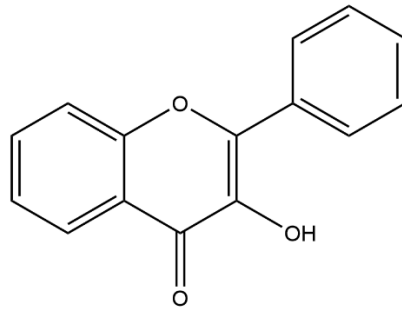


Figure 7 : Structure chimique du groupe des antioxydants flavonoïde et sous-groupe flavonol

II.3 Zoom sur la quercétine

La **quercétine** (Figure 8) se retrouve en abondance dans les légumes à feuille, les agrumes et les baies [26]. La présence de cinq groupements hydroxyle dans sa structure lui confère des propriétés antioxydantes élevées [53].

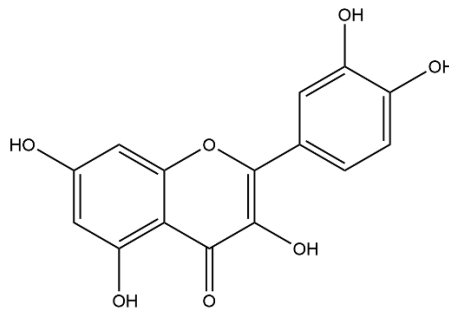


Figure 8 : Structure chimique de la quercétine

La quercétine est capable de neutraliser les radicaux libres et de chélater les ions des métaux de transition. Ainsi, elle assure avec succès une fonction d'inhibition de peroxydation des lipides et des lipoprotéines [54], [26]. La quercétine est aussi capable de réduire l'inflammation, de promouvoir la croissance des fibres de collagène et d'inhiber les médiateurs du stress oxydant [52]. Ainsi, de nombreuses recherches confèrent à la quercétine des activités : antioxydante, anti-inflammatoire, cicatrisante et anti-âge [53]. Cependant, il faut noter que les flavonoïdes peuvent aussi avoir une activité pro-oxydante en présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre conduisant à la production de radicaux libres. C'est le cas de la quercétine lorsque la molécule est en présence de Fe³⁺ et EDTA à pH 7,4 [55].

Bien que la quercétine présente des propriétés très intéressantes, **sa faible solubilité** dans l'eau, son instabilité chimique et **sa faible capacité de pénétration** limitent son efficacité pour la peau. Il est donc nécessaire de développer des formulations pour permettre sa délivrance dans les tissus cutanés pour qu'elle puisse interagir avec les radicaux libres à neutraliser [52].

III. Le challenge de la délivrance par la voie topique

Avant de commencer cette partie, il est nécessaire de rappeler la définition de certains mots clefs (annales de dermatologie [56]). L'absorption percutanée correspond au transfert d'une molécule depuis un milieu extérieur, à travers la peau et ce, jusqu'au système sanguin. Elle regroupe l'ensemble des étapes suivantes : (i) la pénétration : terme générique définissant l'entrée d'une molécule dans une structure particulière telle que le SC, (ii) la perméation : passage d'une couche à une autre différant de par sa structure ou fonction et (iii) la résorption : transport d'une molécule dans le système sanguin.

III.1 Les mécanismes de pénétration

L'administration de molécules par voie topique présente de nombreux avantages : facile à administrer, indolore, peu de métabolisme, réduction des effets secondaires [57] mais **passer le *stratum corneum* n'est pas chose facile**. Les conditions optimales sont obtenues avec les molécules lipophiles non ionisées ayant un poids moléculaire inférieur à 500 Da car elles peuvent traverser le SC par diffusion passive suivant la loi de Fick [58]. Dans le cas des molécules trop lipophiles ou hydrophiles où la pénétration est impossible, différentes stratégies d'amélioration peuvent être développées avec l'utilisation de promoteurs de pénétration ou de formulations topiques adaptées aux propriétés du principe actif.

Il existe plusieurs voies de pénétration cutanée (Figure 9) en fonction du degré de lipophilie et du poids moléculaire du principe actif : (i) **la voie transcellulaire** où le principe actif traverse les cornéocytes et la matrice lipidique, (ii) **la voie intercellulaire**, la plus utilisée, dans laquelle le principe actif contourne les kératinocytes et passe uniquement par la matrice lipidique et (iii) une dernière voie **par les annexes** c'est-à-dire les follicules pileux, les glandes sébacées et les glandes sudoripares. De manière générale, les molécules polaires hydrophiles diffusent majoritairement par la voie transcellulaire. La voie intercellulaire, plus tortueuse et par conséquent, est la plus longue mais la plus adaptée aux molécules lipophiles. Ces deux voies suivent un mode de **diffusion passive** (1^{ère} loi de Fick) où le flux de diffusion de la molécule au travers d'une membrane est proportionnel au gradient de concentration allant du plus concentré vers le moins concentré suivant l'équation : $J = -D \frac{\partial C}{\partial x}$ avec J le flux ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), D le coefficient de diffusion ($\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) et $\frac{\partial C}{\partial x}$ le gradient de concentration sur la distance x de la membrane. Quant à la voie des annexes, elle attire de plus en plus l'intérêt des chercheurs et des formulations adaptées ciblant ce passage ont été étudiées [57].

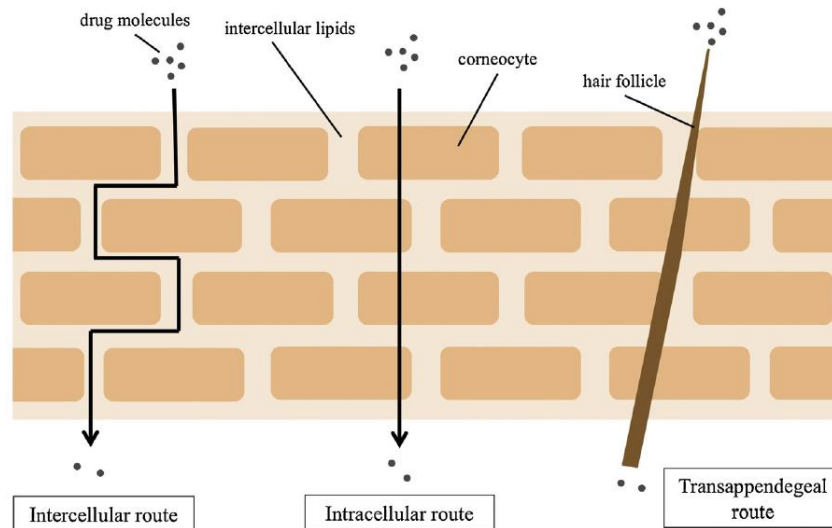


Figure 9 : Les différentes voies de pénétration au travers du SC, extrait de [59]

Toutes ces voies présentent de nombreuses limites et ne permettent pas la pénétration de tous les actifs en quantité suffisante et avec des cinétiques compatibles pour leur application pharmaceutique. Pour améliorer la diffusion passive des actifs au travers de la peau, il est possible d'utiliser des promoteurs de pénétration et/ou des formulations particulières.

III.2 Optimisation de la pénétration : les nanoformulations

La pénétration des PA peut être optimisée en utilisant des nanoformulations couplées à des techniques physiques ou chimiques.

L'utilisation de **techniques physiques** modifie physiquement la structuration de la peau. Certaines telles que l'iontophorèse ou l'électroporation utilisent un champ électrique et sont non-invasives. L'électroporation met en jeu un champ électrique d'intensité plus élevée que l'iontophorèse mais de faible durée pour permettre la formation de canaux facilitant le passage de molécules de haut poids moléculaire. La sonophorèse consiste à appliquer des ultrasons. D'autres méthodes sont plus invasives et altèrent l'intégrité du SC comme la microperforation utilisant des micro-aiguilles pour perforer le SC ou un laser pour retirer la couche cornée [60], [61].

Les promoteurs de pénétration chimiques appelés « *chemical penetration enhancer* » (CPE) ou « *skin penetration enhancers* » (SPE) sont capables d'interagir avec les constituants du SC pour réduire la fonction barrière et améliorer de façon temporaire et réversible la pénétration. Il est ainsi primordial que les CPE soient non-irritants et non-toxiques [62]. William et al. ont défini le concept du « *lipid-protein partitioning* » pour classer les CPE en fonction de leurs différents modes d'action : (i) perturbation de l'organisation des lipides du SC (ii) interaction avec les protéines intracellulaires du SC et (iii) amélioration du partage du principe actif dans le SC [63]. Ainsi, les CPE sont classés en 10 groupes principaux : eau, sulfoxyde, azone, pyrrolidone, acide gras, alcool, alcool gras, glycol, tensioactif et urée [64].

La majorité des CPE adopte le mécanisme d'action *via* la **perturbation de l'organisation des lipides** en interagissant avec les lipides intercellulaires de la couche cornée. Nous allons donc développer plus en

détails ce mécanisme. L'ensemble des actions des CPE sur les lipides intercellulaires est résumé sur la Figure 10 mais nous nous concentrerons sur les trois principaux modes d'action [65] :

- (1) **Interaction avec la tête polaire des lipides** *via* des liaisons hydrogène, les CPE perturbent l'hydratation et l'organisation de la bicouche lipidique. Ainsi, les lipides intercellulaires se fluidifient et le volume d'eau présent entre chaque couche lipidique augmente conduisant à leur séparation,
- (2) **Interaction avec le domaine aqueux des bicouches lipidiques,**
- (3) **Interaction avec les chaînes alkyle des lipides** : les CPE s'insèrent directement entre les chaînes hydrophobes lipidiques. Ainsi, ils perturbent leur organisation, les fluidifient et permettent d'augmenter de la diffusion des molécules au travers du SC.

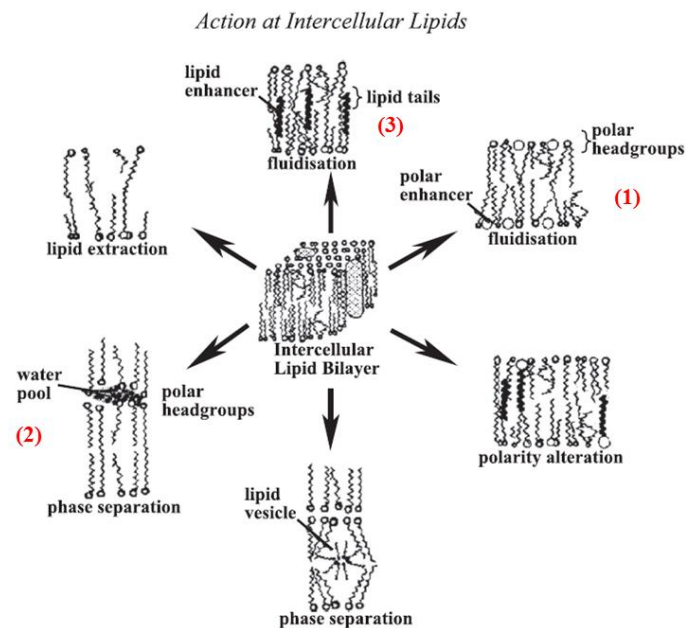


Figure 10 : Action des CPE sur les lipides intercellulaires, extrait de [64]

La méthode la plus couramment utilisée pour augmenter la capacité de pénétration au travers de la peau consiste à développer **des formulations** encapsulant des principes actifs afin de modifier leur solubilité et/ou perméabilité et ainsi améliorer leur pénétration. Dans cette optique, il est possible de jouer sur la composition (polymères, lipides, CPE) mais aussi sur la distribution de taille des formulations car de nombreuses études ont démontré l'intérêt croissant des formulations présentant une distribution **de taille nanométrique** (inférieure à 100 nm) comparativement aux formulations submicroniques (émulsions). C'est pourquoi nous nous sommes orientés dans le cadre de ces travaux de recherche vers les nanoformulations.

Il existe trois grandes familles de **nanoformulations** pour la voie topique : les nanoparticules, les nanoformulations à base de polymères et les nanoformulations à base de lipides comme résumées dans la Figure 11 qui permettent d'améliorer la pénétration des actifs grâce à leurs propriétés physico-chimiques (taille, polarité, composition) [66].

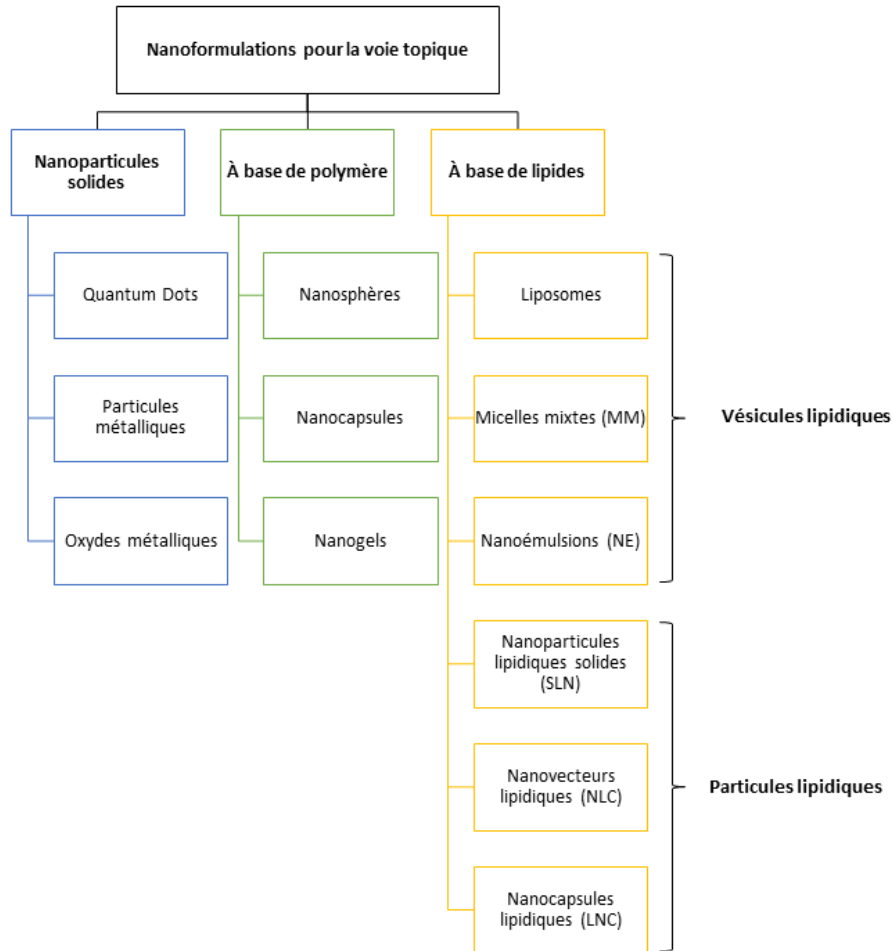


Figure 11 : Classification des nanoformulations pour la délivrance topique

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux **nanoformulations lipidiques** qui peuvent être scindées en deux classes : les vésicules lipidiques (liposomes, micelles mixtes et nanoémulsions) et les particules lipidiques (nanoparticules lipidiques solides, nanovecteurs lipidiques, nanocapsules lipidiques). Notre choix s'est porté sur les nanoformulations lipidiques car elles présentent plusieurs avantages : biodégradables, meilleur taux de chargement en actifs lipophiles, non toxiques et non-irritantes [59]. Leur composition lipidique permet également de mieux interagir à la surface du SC, d'augmenter leur adhésion et l'hydratation de la peau. L'hydratation est un facteur clé car plus la peau est hydratée, plus la pénétration de molécules est facilitée. Différents mécanismes de pénétration des formes lipidiques ont été présentés par Zhai et al. : l'échange de lipides, la désorganisation de la structure du SC, l'altération de la polarité, la fluidisation du SC et l'augmentation de l'hydratation [67]. Certaines formulations comme les liposomes sont utilisées dans la voie topique depuis plus de 30 ans alors que d'autres telles que les nanocapsules lipidiques commencent seulement à émerger.

Les vésicules lipidiques :

Découvert par Bangham et al. en 1965 et commercialisés pour la première fois par Dior (Capture® en 1985), **les liposomes** sont des vésicules sphériques de taille nanométrique constituées d'une bicouche lipidique renfermant un cœur aqueux. La bicouche est généralement composée de phospholipides de type phosphatidylcholine et de cholestérol. La nature et la concentration de ces constituants impactent la fluidité de la bicouche et notamment la température de transition de phase, température

à laquelle la bicouche passe de l'état gel solide à gel fluide [68]. Ainsi, des liposomes de fluidité membranaire et potentiellement de capacité de pénétration différentes peuvent être obtenus en changeant la nature des phospholipides.

Comme représentés sur la Figure 12, les liposomes conventionnels peuvent être de type unilamellaire petit (SUV : 20-100 nm), grand (LUV > 100 nm) ou géant (GUV > 1000 nm) mais aussi multilamellaire (MLV > 500 nm) ou multivésiculaire (100-1000 nm) selon leurs formes, leurs tailles et le procédé de fabrication utilisé [67]. Les liposomes sont très utilisés comme systèmes de délivrance car ils peuvent encapsuler des principes actifs hydrophobes (au sein de la bicouche), hydrophiles (dans le cœur aqueux ou l'espace interlamellaire) ou amphiphiles (à l'interface bicouche-cœur) [66].

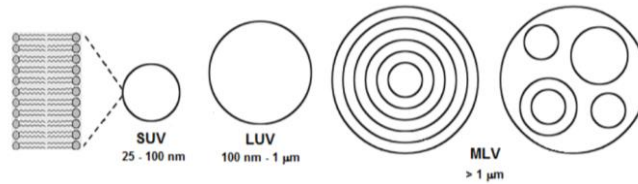


Figure 12 : Schéma des différents types de liposomes, extrait de [69]

Pour améliorer leur stabilité et leur capacité de perméation (élasticité, déformation), de nouveaux liposomes ont été développés tels que les liposomes avec une couronne de polymère poly(éthylène glycol) (PEG) pour augmenter leur stabilité [70]. Par la suite, l'ajout d'éthanol (20-45%) a permis de créer les **éthosomes** pour améliorer la pénétration cutanée car l'éthanol est connu pour être un excellent CPE [66]. L'ajout de tensioactifs de type chlorate de sodium ou tween 80 a conduit à l'obtention des **transfersomes** avec une bicouche fluide et par conséquent plus élastique et déformable [67]. Les mécanismes de pénétration dans la peau des différentes formulations sont résumés dans la Figure 13. Dans le cas des liposomes conventionnels, plusieurs théories ont été développées : soit leur structure reste intacte soit elle s'adsorbe et fusionne avec le SC soit elle se désintègre au contact du SC ; [71] cette dernière option est représentée dans la Figure 13. Dans le cas des éthosomes, le taux élevé d'éthanol perturbe et fluidifie la matrice lipidique intercellulaire. Enfin, les transfersomes peuvent se déformer pour passer dans la matrice lipidique intercellulaire. Quelle que soit leur composition, les liposomes présentent toutefois de nombreux inconvénients : faible taux de charge, risque de relargage de l'actif, coût de production élevé, ce qui a stoppé leur développement pour la voie topique au profit d'autres formulations.

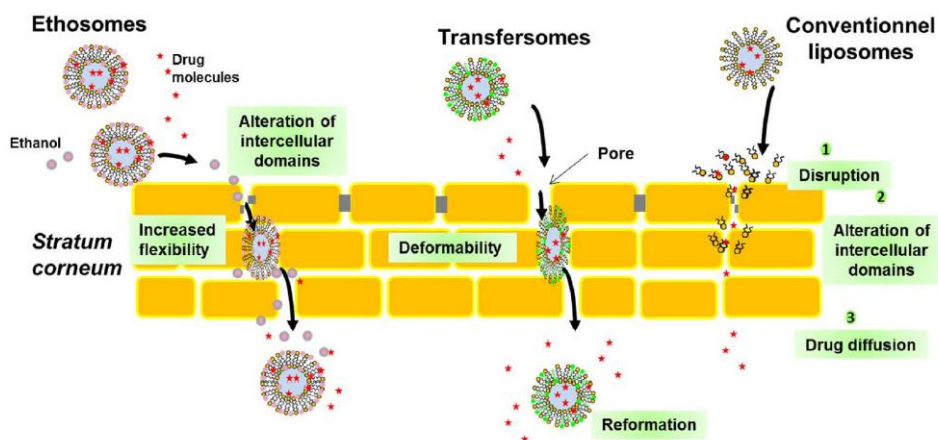


Figure 13 : Présentation des mécanismes de pénétration des liposomes, extrait de [71]

Les **nanoémulsions (NE)** sont des dispersions de gouttelettes d'huile dans l'eau stabilisées par des tensioactifs de taille nanométrique et d'aspect transparent. Une faible quantité de tensioactifs garantit la stabilité cinétique en palliant les phénomènes de séparation, floculation et coalescence et limite les irritations cutanées [58]. La taille des gouttelettes généralement comprise entre 10 et 300 nm [66] permet de former un film homogène et d'obtenir une bonne occlusion à la surface de la peau [58].

Les **micelles mixtes (MM)**, aussi appelées vésicules hybrides lipides/polymères [72], sont un système hybride entre liposomes et polymersomes qui associe dans une même vésicule des phospholipides et des polymères amphiphiles [73]. La formation des MM est facilitée d'une part par la capacité d'auto-assemblage des polymères amphiphiles en solution aqueuse sous forme de micelles à cœur hydrophobe et d'autre part l'organisation des phospholipides en bicouche lipidique. Selon la composition et la concentration en polymères et phospholipides, le système s'organise soit en liposomes soit en micelles mixtes [74]. Les micelles mixtes produites sont de taille nanométrique (inférieure à 100 nm) et peuvent encapsuler des principes actifs hydrophobes dans leur cœur composé de l'enchevêtrement des chaînes alkyle des phospholipides et des polymères. Des MM ont été développées pour l'administration d'indométacine [75], de curcumine [76] par voie intraveineuse (IV) et d'ibuprofène pour la voie topique [77].

Les particules lipidiques :

La Figure 14 présente les trois types de particules lipidiques. A l'interface entre les émulsions, les liposomes et les nanoparticules polymères se trouvent les **nanoparticules lipidiques solides** (appelées « *solid lipid nanoparticle* » (**SLN**)) qui combinent de nombreuses propriétés de ces systèmes [71]. La matrice des SLN est composée de 0,1 à 30 % de lipides solides ou de mélanges de type triglycéride, acide gras, cire dans l'eau et stabilisée par un tensioactif présent entre 0,5 à 5 % pour une taille comprise entre 40 et 1000 nm. Cette matrice peut non seulement protéger les molécules encapsulées contre l'oxydation mais aussi contrôler leur cinétique de libération [67]. Les avantages des SLN sont nombreux : facilité de préparation, absence de solvant organique, bonne biocompatibilité et faible cytotoxicité [78]. Cependant, l'importante cristallinité de la matrice limite considérablement l'encapsulation de PA et peut aussi entraîner le relargage anticipé des molécules encapsulées [79]. Ainsi, une deuxième génération de nanoparticules lipidiques fut développée : les NLC.

Les **nanovecteurs lipidiques structurés** (appelés « *nanostructured lipid carrier* » (**NLC**)) sont composés d'une matrice lipidique mélangeant des lipides solides et liquides. Les lipides liquides sont soit enchevêtrés dans les lipides solides, soit localisés à l'interface entre la matrice solide et la couche de tensioactifs. Ainsi, les NLC présentent les mêmes avantages que les SLN mais offrent un meilleur taux d'encapsulation et une stabilité accrue [67]. Les NLC sont capables de charger des PA hydrophobes comme hydrophiles, de les protéger des dégradations chimiques, d'augmenter leur stabilité à la lumière, l'oxydation et l'hydrolyse et aussi de contrôler leur libération en fonction de la nature du lipide utilisé. Concernant leur mode de pénétration dans la peau, les NLC perturbent l'organisation du SC (celle des cornéocytes comme celle de la matrice intercellulaire) et ils augmentent l'hydratation par effet d'occlusion, facilitant ainsi le passage cutané de la molécule encapsulée [59], [80].

Brevetées en 2002 par Heurtault et al. [81], les **nanocapsules lipidiques** (appelées « *lipid nanocapsule* » (**LNC**)) se composent d'un cœur huileux liquide entouré d'une coque rigide de phospholipides et d'une couronne de tensioactifs non ioniques. Elles sont obtenues par un procédé d'inversion de phase basé sur la capacité du tensioactif non ionique à stabiliser une émulsion de type huile dans eau à eau dans

l'huile suivant la température. De façon réversible, les chaînes du tensioactif se déshydratent et changent d'affinité lors du chauffage. Plusieurs cycles de chauffage et refroidissement sont nécessaires pour diminuer la taille des nanocapsules en formation. Un refroidissement brutal et rapide permet de figer les nanocapsules qui présentent une taille nanométrique (inférieure à 100 nm), monodisperses et une grande stabilité interfaciale [82]. En fonction de la composition et du procédé (nombre de cycles, plage de température), il est possible de modifier la taille et le PDI des LNC [83]. Cette dernière formulation assure un taux d'encapsulation élevé de PA de nature hydrophobe, une bonne stabilité dans le temps et une excellente tolérance cutanée [67].

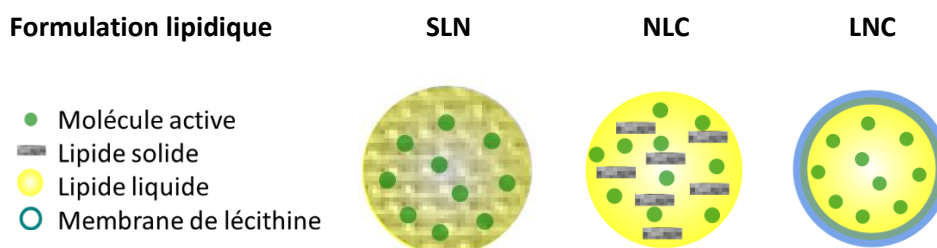


Figure 14 : Représentation des SLN, NLC et LNC

III.3 Les formulations pour la délivrance topique de quercétine

Dans le cadre de ce projet, nous avons orienté notre étude sur la formulation de quercétine pour la voie topique. Nous avons donc réalisé un bilan des formulations de quercétine **pour la délivrance cutanée** en ciblant les **nanoformulations lipidiques** (compte tenu des conclusions de la partie précédente (III.2)). Les formulations sont décrites selon leur type, leur composition et leur taux d'encapsulation dans le Tableau 2. Cette étude démontre qu'il est possible d'encapsuler la quercétine à un taux de chargement suffisant pour observer une activité antioxydante. Les NLC, LNC et liposomes présentent le taux d'encapsulation le plus élevé en quercétine mais seules les LNC allient une taille inférieure à 100 nm et un fort taux d'encapsulation.

Tableau 2 : Récapitulatif des formulations existantes pour la délivrance cutanée de quercétine

Formulation	Composition	Taille (nm)	Taux d'encapsulation	Référence
Liposomes	-Phospholipides (DPPC) -Co-solvant PEG (Cremophor®)	179	2,6 %	[84]
Cristaux	-Tensioactif (Tween 80 ou PEG)	200 et 295	Non défini	[85]
LNC	-Huile (Labrafac®) -Tensioactif PEG (Solutol®) -Phospholipides (S75) -Co-solvant PEG (Cremophor®) -Eau	27 et 54	2,6 et 2,8 %	[86]
Vésicules lipidiques	-Phospholipides (P50) -Tensioactif PEG -Eau	80-220	Non défini	[87], [88]

Cependant, de plus en plus d'études (majoritairement en IV mais aussi en voie orale) mettent en avant **des problèmes de santé** résultant d'une surexposition au PEG pour des raisons que nous allons détailler ci-après.

Dans le cas des administrations par voie IV, la présence de PEG *via* sa conjugaison en pro-drogue ou à la surface de formulations permet d'augmenter la demi vie du principe actif en améliorant la furtivité du système par inhibition des phénomènes d'opsonisation (liaison aux protéines plasmatiques). Mais des études ont mis en évidence la production **d'anticorps PEG**, « anti-PEG Abs » par le système immunitaire, reconnaissent le PEG. Ainsi, l'efficacité du traitement thérapeutique est fortement altérée et des effets secondaires ont été rapportés [97], [98] car la réaction immunitaire génère aussi une accélération de la clairance sanguine et donc une modification de la biodisponibilité du principe actif [99], [100].

Une **hypersensibilité** peut se déclencher quelle que soit la voie d'administration. Dans le cas de la voie IV, il a été observé des chocs anaphylactiques [101] et par voie orale, des cas d'hypersensibilité (laxatif à base de PEG) [102]. Enfin, l'application topique de produits à base de PEG peut aussi provoquer **des allergies** et notamment des dermatites atopiques [103], c'est par exemple le cas en présence d'un sous-produit de dégradation du PEG, le 1,4-dioxane [104], [105] considéré comme ingrédient à éviter en formulation cosmétique.

Le PEG est non-biodégradable ce qui engendre une **bioaccumulation** du polymère. Il est donc préférable d'utiliser des PEG de faible masse molaire pour une meilleure élimination [96] mais il a été démontré que les oligomères de PEG ayant une masse molaire inférieure à 400 Da sont toxiques. Ils conduisent lors de leur oxydation par les alcools et les aldéhydes déshydrogénases à des diacides et des métabolites acides [106] tels que l'acide oxalique dont les sels de calcium sont toxiques pour les reins [107]. Par conséquent, les PEG avec des masses molaires élevées sont donc plus employés mais leur utilisation engendre une clairance rénale ralentie et une bioaccumulation du polymère dans les reins (formation de vacuoles dans les cellules) [108], [109], [110].

La synthèse des PEG peut s'accompagner de **sous-produits toxiques** tel que l'oxyde d'éthylène, monomère de départ, classé dans le groupe 1 cancérigène pour l'homme de l'agence internationale de la recherche contre le cancer (IARC) [96] et qui demande des grandes précautions de manipulation au regard de son caractère explosif. A l'oxyde d'éthylène s'ajoute le 1,4-dioxane cité précédemment qui est classé par l'IARC dans le groupe 2b c'est-à-dire potentiellement cancérigène. Enfin, les peroxydes résiduels contenus dans les PEG peuvent conduire à une auto-oxydation induite par une exposition à la lumière ou à une température élevée [111].

Face à ces multiples inconvénients, plusieurs polymères alternatifs au PEG ont été étudiés : poly(aminoacide)s, poly(glycérol), poly(acrylamide), poly(vinylpyrrolidone) et les poly(oxazoline)s [96]. Dans le cadre d'une collaboration mise en place avec l'équipe IAM de l'ICGM, nous avons choisi les polyoxazolines (POx) comme alternative au PEG pour explorer le fort potentiel et l'utilisation inédite de ces polymères pour la voie topique.

IV.2 Les polyoxazolines comme alternative aux PEG

Découverts en 1966, les **poly(2-R-2-oxazoline)s (POx)** également appelés poly(*N*-acyléthylèneimine) ont une structure analogue aux polypeptides comme représenté Figure 16. Cette similitude explique pourquoi les POx sont considérés comme des polymères dits pseudo-peptidiques bio-inspirés. Mais

contrairement aux polypeptides, la fonction amide tertiaire des POx n'est pas reconnue et hydrolysée par les enzymes conférant ainsi aux POx une grande stabilité en milieu physiologique et une furtivité [112].

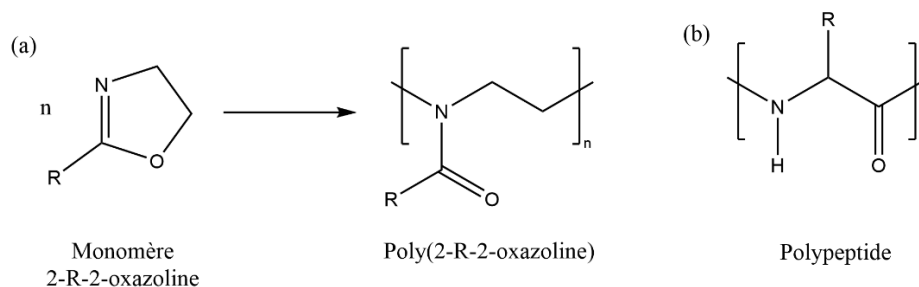


Figure 16 : (a) Synthèse et structure des POx et (b) analogie avec les polypeptides

Les POx sont obtenus par ouverture de cycle du monomère 2-R-2-oxazoline par **polymérisation cationique par ouverture de cycle (CROP, « cationing ring-opening polymerization »)**. La CROP s'effectue en trois étapes : l'amorçage, la propagation et la terminaison (les détails sur la synthèse des POx sont abordés dans le chapitre 2). Il existe deux mécanismes: ionique et covalent conduisant au même produit final [113]. Un des freins au développement des POx a été leur faible vitesse de polymérisation mais en 2005, l'équipe de Schubert a mis au point la polymérisation par micro-ondes qui a permis de passer de plusieurs heures voire dizaines d'heures de réaction à quelques minutes [114].

La **fonctionnalisation** des POx peut provenir de l'utilisation d'un **amorçeur** ou d'un **agent de terminaison** fonctionnalisé (discutée dans le chapitre 2). Une autre façon consiste à faire varier la nature du **monomère**. Les propriétés diffèrent alors en terme de caractère hydrophile/hydrophobe comme illustré Figure 17, de solubilité dans l'eau, de cristallinité [115]. La nature du monomère a également un impact sur le caractère thermosensible du polymère estimé par la valeur de LCST (*lower critical solution temperature*) [116], [117]. Ce type de fonctionnalisation n'est pas possible à partir de la chimie du PEG et en fait un attrait supplémentaire des POx.

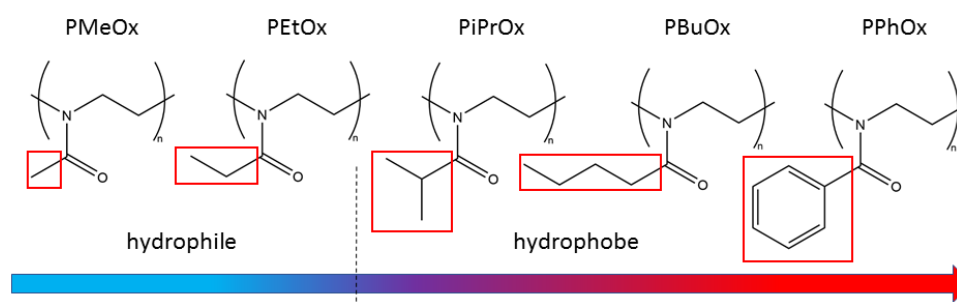


Figure 17 : Propriétés de solubilité des POx

Les **propriétés physico-chimiques des POx** présentent un grand intérêt applicatif dans le domaine **biomédical** avec entre autres une excellente cytocompatibilité et hémocompatibilité. Le caractère hydrophile et non ionique des poly(2-méthyl-2-oxazoline) et poly(2-éthyl-2-oxazoline) expliquent leur grande stabilité en milieu physiologique. Ils sont aussi pourvus d'une solubilité élevée et d'une faible viscosité comme résumé dans la revue de Lorson et al. [117]. De plus, les POx ne présentent pas de sous-produits de synthèse toxiques ni de résidus peroxydes.

Les polyoxazolines ont permis de développer différents types de formulations pour la vectorisation et la libération contrôlée de principes actifs comme des hydrogels, des dispersions solides, la conjugaison de molécules actives (pro-drogues), la bioconjugaison de protéines...[118]. Notamment, l'entreprise pharmaceutique Serina Therapeutics développe des traitements contre la maladie de Parkinson basés sur la technologie des POx et est actuellement en étude clinique chez l'homme en phase 2 [119].

Les POx remplissent également les critères biologiques de polymère à usage thérapeutique et présentent les mêmes propriétés que les PEG telle que la furtivité (POxylation en référence à la PEGylation) ou la biocompatibilité. De plus, les **POx surmontent certains inconvénients du PEG** comme le « *PEG dilemma* ». En effet, pour acheminer le principe actif jusqu'à la cellule, le nanovecteur passe par la voie d'endocytose. Une fois dans l'endosome, il interagit avec la membrane pour assurer la délivrance du principe actif dans le cytosol de la cellule [120]. Or, la présence de PEG limite dans un premier temps l'endocytose des formulations et aussi les interactions avec la membrane de l'endosome ce qui limite l'échappement endosomal et contribue aussi à leur dégradation par les enzymes et le pH acide (suite à la fusion avec les lysosomes). Ainsi, ce « *PEG dilemma* » engendre une forte diminution de l'activité thérapeutique du PA. Nous allons voir dans la partie suivante comment les POx pallient ce problème.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons travaillé avec des polyoxazolines amphiphiles dit **lipopolyoxazolines** qui présentent une chaîne alkyle de nature lipidique et une unité de répétition 2-méthyl-2-oxazoline de nature hydrophile. Dans la prochaine partie, nous présenterons les différentes natures de lipopolyoxazolines, leurs voies de synthèse ainsi que leurs utilisations dans les nanoformulations pour les voies IV et topique. Cette étude a donné lieu à une revue publiée en juin 2020 (DOI : 10.1016/j.ijpharm.2020.119536) dans l'*International Journal of Pharmaceutics* [121].

IV.3 Les lipopolyoxazolines

Recent Advances and Prospects in NanoDrug Delivery Systems using Lipopolyoxazolines

L. Simon¹, N. Marcotte¹, J. M. Devoisselle¹, S. Begu^{1*}, V. Lapinte^{1*}

¹: ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France.

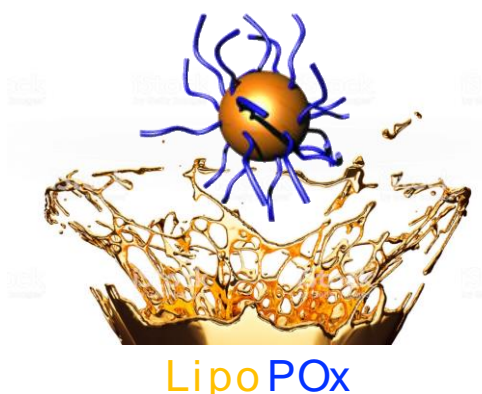
Abstract

Facing the growing demand in nano drug delivery systems (nDDS), hybrid excipients based on natural molecules and well-defined synthetic polymers are intensively investigated. Lipopolyoxazolines (LipoPOx) composed of a polyoxazoline block (POx) and a lipid or lipid-like derivative are detailed in this review. The nature of lipids used, the route to synthesize LipoPOx and their advantages for the formulation of drugs are reported. The place of POx family in nanomedicine is discussed compared to PEG, considered as the gold standard of hydrophilic polymers. LipoPOx nanoformulations including liposomes, mixed micelles, lipid nanocapsules are provided alongside discussion of the nDDS for intravenous or topical administration.

Keywords

drug delivery system, hybrid material, lipid, lipid nanocapsules (LNC), liposomes, micelles, polyoxazoline (POx), LipoPOx.

Graphical abstract



Abbreviations

AUC	area under curve
BCS	biopharmaceutics classification system
CHEMS	cholesterol hemisuccinate
Chi-aDDnS	chimeric advanced drug delivery nanosystem
CHMC	cholesteryl methyl carbonate
CL	conventional liposome
CMC	critical micellar concentration
CPE	chemical penetration enhancer
CROP	cationic ring-opening polymerization
DAG	diacylglycerol
DecenOx	2-(dec-9-enyl)-2-oxazoline
DodOx	2-dodecyl-2-oxazoline
DOX	doxorubicin
DSPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
EPC	egg phosphatidylcholine
FBS	fetal bovine serum
HLB	hydrophilic lipophilic balance
HSPC	hydrogenated soy phosphatidylcholine
IND	incorporated drug
IV	intravenous
LCST	lower critical solution temperature
LipoPOx	lipopolyoxazoline
LNC	lipid nanocapsules
MAG	monoacylglycerol
MM	mixed-micelles
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MPS	mononuclear phagocyte system
MW	molecular weight
nDDS	nano drug delivery system
NonOx	2-nonyl-2-oxazoline
PcPrOx	poly(2-cyclopropyl-2-oxazoline)
PBS	phosphate buffered saline

PEG	poly(ethylene glycol)
PEI	poly(ethyleneimine)
PEtOx	poly(2-ethyl-2-oxazoline)
PPhOx	poly(2-phenyl-2-oxazoline)
PiPrOx	poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
PLA	poly(glutaric acid)
PLL	poly(L-lysine)
PLGA	poly(glutaric acid)
PMOx	poly(2-methyl-2-oxazoline)
PnPrOx	poly(2-n-propyl-2-oxazoline)
POx	poly(2-oxazoline)
PPhOx	poly(2-phenyl-2-oxazoline)
PSLs	pH-sensitive liposomes
PVP	poly(vinyl pyrrolidone)
RBC	red blood cells
Rc	hydrophobic core
RES	reticuloendothelial system
Rh	hydrodynamic radius
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
SC	<i>stratum corneum</i>
SOPC	1-Stearoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine
SoyOx	soy-based oxazoline
SUV	small unilamellar liposome
S75, S100	Soybean phosphatidylcholine
TAG	triacylglycerol
TEC	thiol-ene coupling
TPOS	D-tocopheryl-Polyoxazoline
T _{cp}	cloud point temperature
UndOx	2-undecyl-2-oxazoline

IV.3.1 Introduction

Among drug formulations, nano drug delivery system (nDDS) offer many advantages such as (i) high drug loading, (ii) long circulation time in the body, (iii) targeting the pathological site, (iv) release of encapsulated drugs in the pathological site (pH sensitivity, thermal response) and (v) reduction of side effects [122]. The most common polymers used in nDDS are poly(-L-lysine) (PLL), poly(ethyleneimine) (PEI) [123], poly(lactic acid) (PLA), poly(glutaric acid) (PLGA), poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) and poly(ethylene glycol) (PEG). PEG is considered as the “gold standard” of hydrophilic polymers in medical applications. Nevertheless, many side effects of PEG have been identified such as the presence of PEG antibodies in blood due to immune response in the case of patients treated with PEG asparaginase [124] and PEG uricase [125]. Another drawback called the PEG dilemma has been identified leading to a poor endosomal escape of the nanoformulations with PEG via membrane fusion and the degradation in lysosomes. These phenomena induce a reduction of the treatment efficiency because of a degradation of the drug encapsulated in the formulation and an accelerated blood clearance; furthermore, the non-biodegradability of PEG induces an accumulation of high-molecular mass PEG in the body [124].

Hence, researches were made to find alternative stealth polymers to PEG. Aware of this clinical awareness, researchers proposed poly(amino acid)s, poly(glycerol) or poly(oxazoline)s as alternatives [96]. The family of poly(2-oxazoline)s also named poly(2-R-2-oxazoline)s, or poly(*N*-acyl or *N*-aroyl ethyleneimine)s is abbreviated as POx (or PAOx). The chemical structure is regarded as synthetic polyamide or polypeptide see more pseudopeptide or bioinspired polymers [116]. They aroused considerable enthusiasm since the beginning of the 21th century with the occurrence of the polymerization of oxazolines by microwave process [126]. The production of PEO was an old and well-controlled industry. Nevertheless, the use of volatile and toxic precursors such as the ethylene oxide monomer stays a potential industrial risk as still illustrated in January 2020 in Iqoxe manufactory (Tarragona, Spain) with the explosion of a 20-ton tank of this precursor. The maturity of POx technology has not as much success as PEO but some advantages can be mentioned with the use of low toxic monomer and reactants with a potential gainful business by using micro-wave activation shortening the time of production until only a few minutes. One drawback of the polymerization of oxazolines was the use of toxic and harmful for the environment solvents. The recent successful polymerization in presence of ethyl acetate, viable green solvent, being non-harmful and non-toxic opens up new ways for POx (ethyl acetate as solvent for the synthesis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) [127]. Moreover, for LipoPOx, it is not the addition of a lipid on the POx which increases the environmental impact of these materials by using either as previously described CROP process (initiator route) or by a simple esterification reaction (termination route).

An excellent recent review details the fundamental properties that POx possess for biomedical fields, such as hemocompatibility, low cytotoxicity and non immunogen character [117]. Nowadays, one goal is to evaluate this family of polymers related to PEG when hydrophilic polymer was required in biomedical application. The underlying ambition is to avoid the massive use of PEG [128] at the origin of the appearance of PEG antibody and the resulting loss of furtivity towards immune system [129], [118].

Formulation of drug necessitates to combine excipients such as polymers, lipids, surfactants etc. Among them, promising excipients are lipopolymers, which possess several advantages: (i) increase of the entrapment of drugs with low aqueous solubility and low permeability (BCS IV), (ii) enhancement

of the protection of the drug against degradation during diffusion across membrane (intestinal, skin etc.) and (iii) allowing grafting of ligands to target cells [130], [117], [131]. Lipopolymers can be considered as a homogeneous mixture of natural glycolipids found in cell membranes and can be used in the building of artificial membranes such as vesicles or liposomes. They stabilize surfaces of complex biological matrices or increase the free circulation of nanoobjects in blood or across skin by stealth behavior towards immune system [132]. This review will focus on lipopolyoxazolines (LipoPOx) defined as amphiphilic macromolecules composed of polyoxazoline (POx) block and lipid derivatives (fatty esters, acids, alcohols...) or lipid-like moieties such as (un)saturated long alkyl chains. From the lipids point of view, polyoxazoline-tethered lipids require the functionalization of lipids by oxazolines or polyoxazolines. The relevance of the wedding between POx (case of 2-methyl- and 2-ethyl-2-oxazoline) and lipids results from the antagonism of behavior at the interface - hydrophilicity and lipophilicity, respectively - offering amphiphilic polymers able to self-organize in water. In 2011, Hoogenboom et al. [133] reviewed on "Poly(2-oxazoline)s based on fatty acids" in which the properties of POx and LipoPOx were summarized. Numerous teams in the world study LipoPOx as schematized in Figure 1, where each point represents the number of publications in this topic. We noted the gathering of LipoPOx research in the north of America and even more in Europe with numerous teams in France, Germany and Belgium.

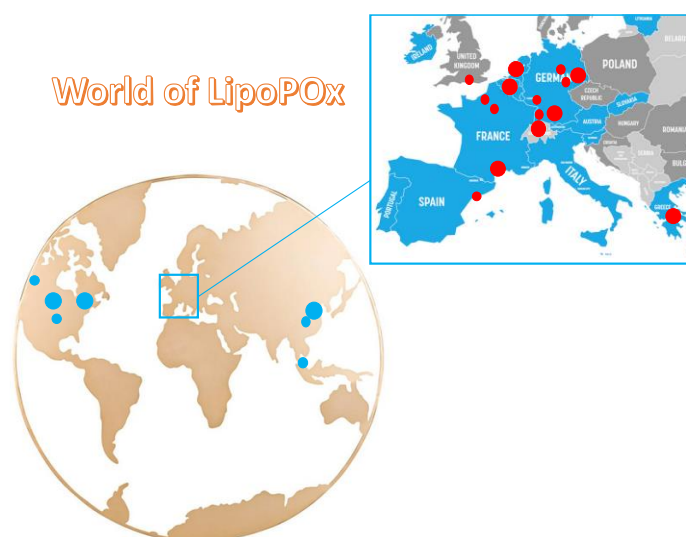


Figure 1: Teams studying LipoPOx in the world. The size of the point corresponds to the number of papers of each team working on LipoPOx.

This review aims to give a comprehensive and critical update of LipoPOx for applications in the formulation field. To do so, we detailed the nature of the lipids and the POx that can be used, then we described the LipoPOx macromolecular engineering, including linear, ramified and brush polymers architectures. All along this review, the position of LipoPOx related to PEG homologues is discussed. Advantages of POx in terms of stability for new nDDS development were given and additional benefits regarding tunability, pH-sensitivity without PEG dilemma were highlighted. The goal of the review is to demonstrate how LipoPOx can be appropriated for nanoformulations like liposomes, mixed micelles (MM) and lipid nanocapsules (LNC) to act as nDDS for drugs being intravenously (IV) and topically delivered.

IV.3.2 POx and lipid precursors features

IV.3.2.1 Generalities on polyoxazolines

POx success arises from the versatility of its synthesis based on a cationic ring-opening polymerization (CROP) of the corresponding 2-R-2-oxazoline monomers. Different synthesis strategies were designed from the initiation step, terminating agent or monomer itself. More especially, oxazoline monomers polymerize by CROP process using an initiator R_1-X where X corresponds to a good leaving group such as tosylate, mesylate, triflate or halide reactive unit (mainly iodide) [115]. The polymerization process enables to control the length of the POx chains by fixing the initial monomer/initiator ratio and thus the preprogrammed HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance) of LipoPOx. To stop the propagation of the polymer chain an end terminating agent (amine, carboxylic acid, thiol...) is required. The resulting POx are non-ionic and stable polymers, whose tunable physicochemical properties vary with the chemical structure. For instance, fine tuning the HLB of POx by modifying the aliphatic side chains from the 2-oxazoline monomer allows to easily control the polymer properties such as its solubility in water. Indeed, short methyl group leads to highly hydrophilic POx whereas alkyl side chains longer than C4 result in water-insoluble polymers [118], [134]. For intermediate side chain lengths, the water solubility of POx decreases as: PEtOx > PiPrOx > PcPrOx > PnPrOx [135], [134]. More interestingly, the solubility can be impacted by temperature of the medium conferring stimuli responsive properties to the polymers with a lower critical solution temperature (LCST). As the LCST phase transition is entropy driven by the water release from polymer chains dehydration upon heating, the cloud point temperature decreases as the hydrophobic character of the alkyl side chains is increased. Thus, the HLB of POx can be easily tuned to produce thermoresponsive polymers presenting interesting properties for drug delivery applications, as recently reviewed by Hoogenboom and Schlaad [136]. POx are also soluble in a broad range of organic solvent from low polarity (chloroform) to polar (acetonitrile, dimethylacetamide). This specificity is useful regarding formulation of water insoluble-drug (BCS class IV). Interestingly, it has been reported that linear and branched PEtOx (MW of 10, 20, 30 and 40 kDa) at a concentration as high as 40% w/v exhibit a significantly lower viscosity than PEG [134]. This physical property of POx plays a crucial role in formulating drugs in low viscosity formulation as it determines the filterability and syringeability characteristics.

Concerning cyto- and hemocompatibility, many studies involving PEG have been published but only few publications report on such experiments using POx [137], [138]. The effect on the integrity of erythrocyte membrane was investigated with an hemolysis study conducted under standardized conditions with PEtOx and PEG with pharmaceutically relevant molar mass (0.4 to 40 kDa). No clear correlation between molar mass and cytotoxicity was evidenced, but medium molar masses presented higher cytotoxicity for unknown reasons. None of the polymer concentration modified the behaviour of erythrocytes or led to significant hemolysis: PEtOx up to 40 kDa and 80 g/L did not cause erythrocyte aggregation and PEtOx of kDa only led to minor erythrocyte aggregation at 40 g/L [139]. Similar cytotoxicity and hemocompatibility studies were assessed using the same conditions with PMOx varying from 2 to 20 kDa even for a concentration of 80 g/L [140]. Polymers were found to slightly reduce the cells viability only for higher concentrations and in long term treatments (MTT assay) [140]. None of the PMOx and PEtOx polymers induced a haemoglobin release. Cytotoxicity studies confirmed the high cytocompatibility of PMOx and PEtOx.

For topical application, evaluations on L929 mouse fibroblasts have been conducted. Only 2 kDa PMOx (80 g/L) reduced the cell viability of L929 mouse fibroblasts to 60 and 44% after 3 and 12 h incubation,

respectively. Globally, a similar behaviour was observed for PEtOx [139]. Even if studies are difficult to compare since they used different test conditions, cell types, and polymers of different origin and purity, POx rather exhibit excellent cyto and hemocompatibility developed in the past 5 years as reported above.

In vivo behaviour of POx was also evaluated. For example, in acute dose studies, PEtOx (10 and 20 kDa) solution was administered intravenously (Sprague Dawley rats) in single and multiple injections at doses of 500, 1 000 and 2 000 mg/kg. Neither toxicity nor adverse effects were observed [134]. Furthermore, the body weights, food intake levels of each animal, blood and serum compositions were normal when compared to the control group that received 0.9% (w/v) sodium chloride. The organ sizes, weights, morphology, and texture of liver, kidney, lung, spleen, heart, and gastrointestinal tract were normal. In the multiple dose essay, rats received seven intravenous doses of 50 mg/kg of PEtOx 20 kDa (14 days). The blood counts and serum chemistry at days 15 and 21 were normal when compared to the control group. The key organ sizes, weights, morphology, and texture were also normal, and the histopathology of the kidney and spleen showed no microscopic differences when compared with the organs of control animals.

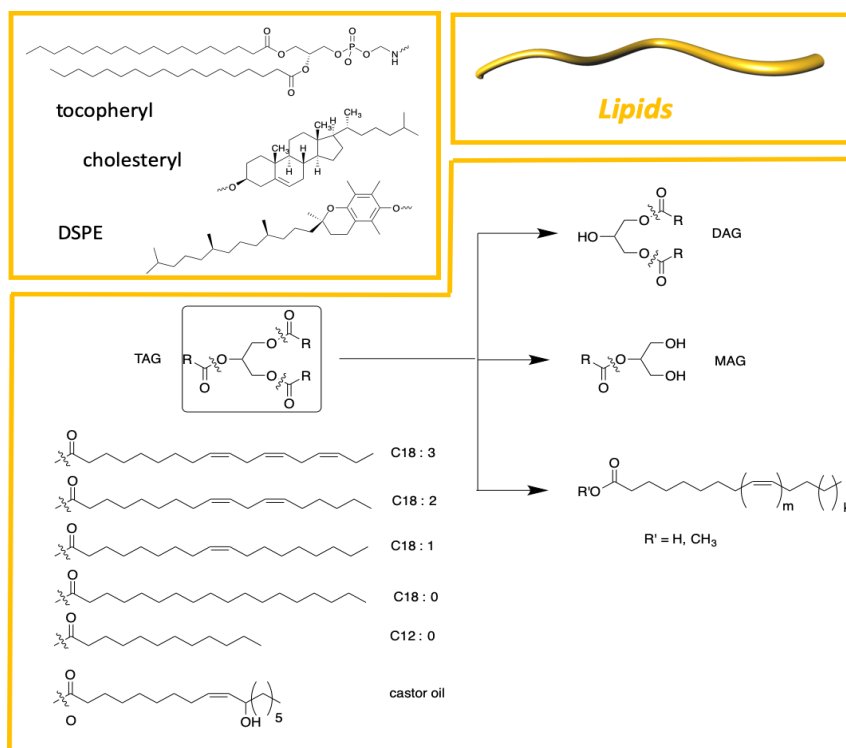
Finally, many studies have evaluated the biodegradability of POx towards hydrolysis or oxidation to predict POx behaviour when administered *in vivo*. POx are amenable to acidic and basic hydrolysis but in simulated stomach and intestine fluids no significant hydrolysis was observed. It has been suggested that the enzymatic degradation may be hindered by the tertiary amide of the pseudo-polypeptides structure, inducing non-biodegradability of the polymers [129], [141]. However, some oxidative pathways may induce mechanisms towards polymer biodegradation. Experiments investigate the effects of ROS/RNS on pseudo-polypeptides and compare their degradation behaviour with PEG (PEtOx) and PEG with a degree of polymerization of approx. 50 and 120 (corresponding to 211 kDa) under physiologically relevant conditions. It was concluded that PEG and POx are degradable by oxidative degradation [142]. Another oxidative degradation route of POx was established by reactive oxygen species (ROS) in macrophages [143], [144]. One interesting aspect of POx related to PEG is the by-products resulting from the hydrolytic process. For POx, degradation resulted in PEI and carboxylic acid derivatives (*e.g.* acetic acid for PMOx, propanoic acid for PEtOx) whereas PEG produce the toxic 1,4-dioxane, one of the seven common ingredients to avoid in cosmetics. As POx are biodegradable, they do not accumulate in tissues and are rapidly cleared from the blood by glomerular filtration in the kidneys. Only minimal amounts of POx are taken up by the reticuloendothelial system (RES) [137].

However, it should never be assumed that these results can be simply extended to POx with different chemical structures, architectures or end groups and must always be assessed on a case-by-case basis. Nonetheless, POx are promising polymers for biomedical applications as they are easy to synthesize and they present not only interesting physico-chemical properties as high stability and low viscosity but also a good cyto- and hemocompatibility, biodegradability and an excellent *in vitro* toxicological feature.

IV.3.2.2 Nature of lipids

Lipids originate from biochemical subunits: ketoacyl and isoprene groups. Among them only the fatty acids such as glycerolipids (TAG: triacylglycerol and ramified derivatives), glycerophospholipids (DSPE: 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) and sterol lipids (cholesterol, tocopherol (named TPOS when associated to POx)) (Scheme 2) are used to design LipoPOx. TAG produce ramified

structures such as diacylglycerol (DAG) and linear ones like monoacylglycerol (MAG), fatty alcohol, amine, ester and fatty oxazoline as detailed in § 2.2. Some other original lipids are not considered in this review even if LipoPOx synthesis with them has been described. For example, it is the case for cardanol for which its aromatic ring connected to a fatty unsaturated chain [145]. The review mainly focuses on glycerolipids because a lot of lipid derivatives are available for oxazoline chemistry. This broad variety comes from the extended length of the fatty chain from $n = 10$ to 22 carbon atoms as well as the number of unsaturations ranging from $m = 0$ (saturated lipids) to 1 (e.g. C18:1, oleic), 2 (e.g. C18:2, linoleic) and 3 (e.g. C18:3, linolenic) (unsaturated lipids). It is known that all vegetable oils (grapeseed oil, sunflower oil, soy oil...) only differ from one to another by lipid composition of saturated and unsaturated fatty chains. LipoPOx produced from fatty chains bearing n carbon atoms and m unsaturations are written as $C_n:mPOx$. Furthermore, LipoPOx can also be synthesized from lipids bearing specific functional groups such as castor oil possessing an alcohol group [146]. In this review, the petrosourced and biosourced saturated chains (C12:0, C16:0, C18:0...) are indifferently considered.



Scheme 2. Nature of lipids used for LipoPOx.

IV.3.3 Overview of LipoPOx

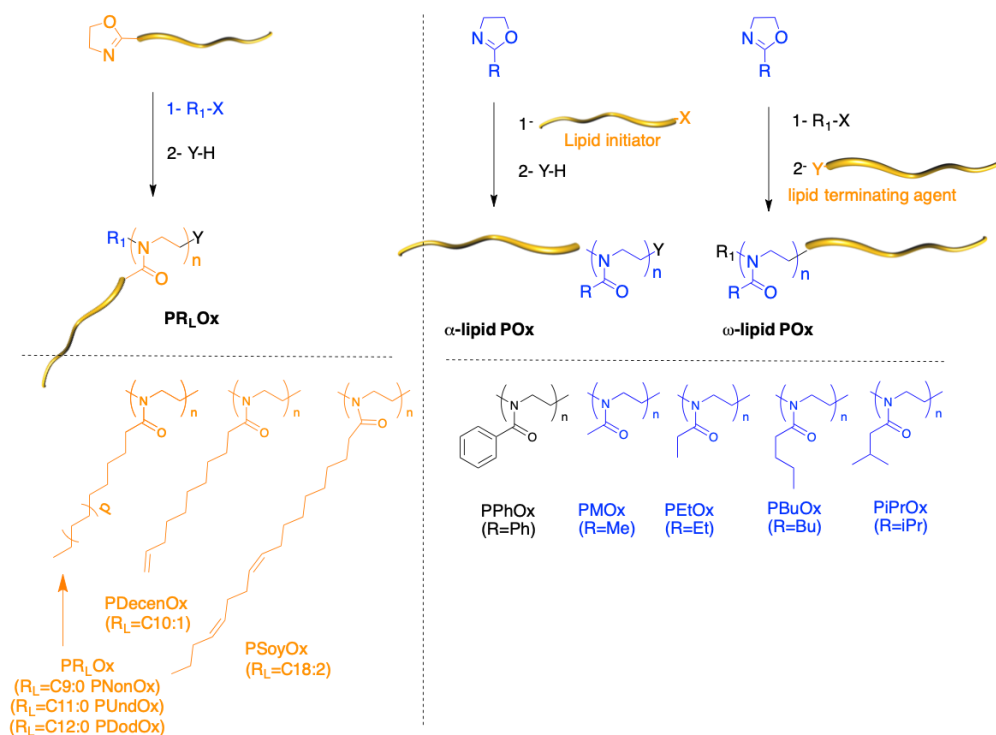
Hybrid materials are extensively studied to build well-shaped liposomes or polymericosomes especially using lipids, glycopolymers. This review focuses on the hybrid polymers resulting from a lipid derivative coupled to a POx block excluding polymericosomes fully based on POx chemistry [72].

IV.3.3.1 Synthesis of LipoPOx

LipoPOx can be produced by three different routes of synthesis: using functional initiator (α -lipid POx), terminating agent (ω -lipid POx) and functional oxazoline (PR_L Ox) (Scheme 3). It is important to highlight one advantage of POx chemistry over PEG's one: the additional functionalization from the R group of

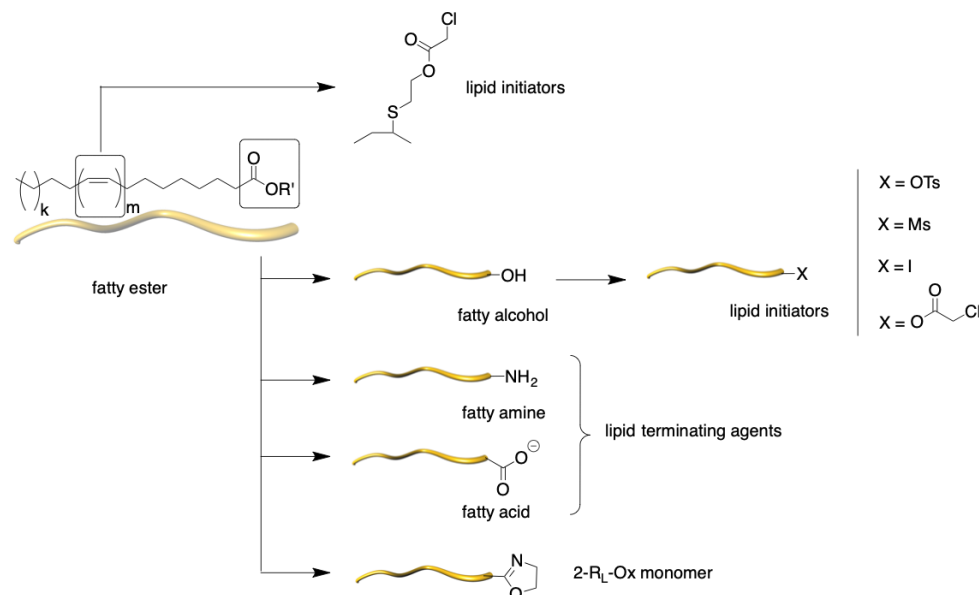
2-R-2-oxazoline monomer in $PR_L\text{Ox}$ route. As a result, a new architecture of brush polymers with lipid pending chains has emerged, which are written as 2- R_L -2-oxazolines. The 2- R_L -2-oxazolines are synthesized by condensation between fatty acids and ethanolamine leading to pending chains in monomers that are either saturated ($R_L=C9:0$, 2-nonyl-2-oxazoline (NonOx), $C11:0$, 2-undecyl-2-oxazoline (UndOx), $C12:0$, 2-dodecyl-2-oxazoline (DodOx)), and unsaturated ($R_L=C10:1$, 2-(dec-9-enyl)-2-oxazoline (DecenOx), $C18:2$, soy-based oxazoline (SoyOx)) [147], [148]. Additional modifications of $C10:1$ pending chain have been undertaken by thiol-ene coupling (TEC) on terminal unsaturation [149], [150]. The two other routes are complementary with either a lipid initiator and non functional terminating agent for α -lipid POx route or a non functional initiator and a lipid terminating agent for ω -lipid POx route. The last two routes occurred with non functional 2-R-2-oxazoline where R corresponds to methyl (MOx), ethyl (EtOx) and isopropyl (iPrOx) groups. In this review, we consider that poly(2-phenyl-2-oxazoline) (PPhOx) can constitute the hydrophobic part of LipoPOx, resulting in PPhOx-b-PMOx copolymers. Indeed, they are able to self-assemble and are used in lipid based nanoformulations such as liposomes (§ 3).

The advantages and drawbacks of initiator and termination routes also apply for LipoPOx. The initiation route allows to have a lipid block (lipid initiator) on all the POx chains. Unfortunately, lipid initiators have a lower reactivity than classical initiators such as MeOTs potentially resulting in ill-defined polymers. One explanation for the low reactivity could be the lipophilic nature of the initiator by contrast with the hydrophilicity of oxazoline monomer. Regarding the termination route, a good molecular weight control of POx chain was reached with an efficient initiator such as MeOTs. Nonetheless, it is necessary to highlight that a low reactivity of the lipid terminating agent on the hydrophilic POx chain can generate an uncompleted functionalization of the end group. Moreover, during the purification of the resulting polymer, the separation of non terminated POx and LipoPOx is difficult.



Scheme 3. The three chemical routes for LipoPOx. (The nature of lipid initiators and terminating agents were described in Scheme 4).

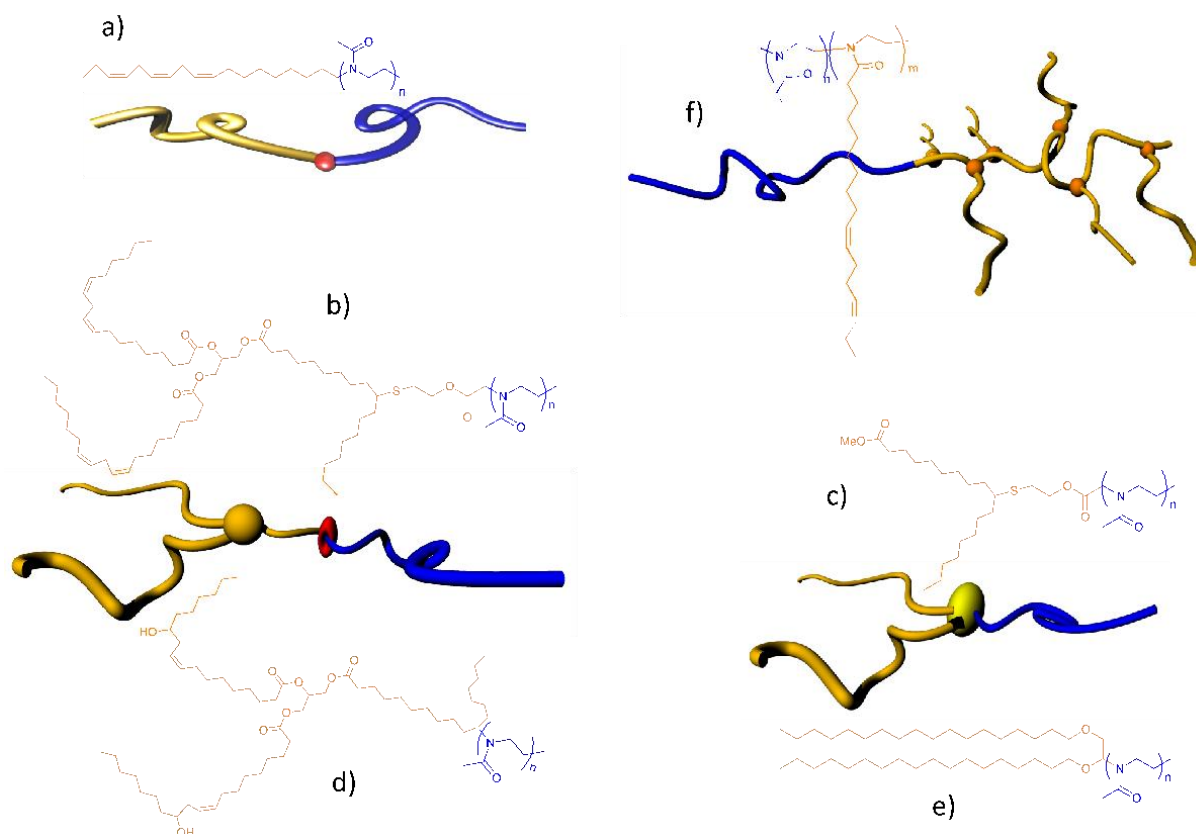
Lipids can be functionalized through many ways depending on the synthetic route followed. For the initiation route, the ester groups of TAG can be converted into alcohol and then into tosylate, mesylate [151], iodate [152] or chlorate initiators after *trans*-esterification [153], [154]. The unsaturations (the other reactive sites of TAG) can be modified into good leaving groups by thiol-ene coupling [153] (Scheme 4). For the termination route, the ester groups of TAG can be transformed into carboxylic acids and fatty amines acting as terminating agents [155]. A specific case has been reported where native alcohol groups of castor oil were directly converted into tosylates [146].



Scheme 4. Lipids modifications for the synthesis of LipoPOx.

IV.3.3.2 Macromolecular engineering of LipoPOx

Linear or ramified LipoPOx can be synthesized with various macromolecular architectures (Scheme 5). The complexity of the structure originates from the lipid. Using fatty esters as lipid initiators or terminating agents linear diblock LipoPOx are produced (Scheme 5a). One example of ramified LipoPOx from fatty ester or native triacylglycerol, TAG, was represented on Scheme 5b and 5c. The unsaturation was converted by thiol-ene coupling into chloride initiator, and further modified *in situ* into iodide. In the specific case of castor oil the synthesis of tosylate initiator from the native alcohol group produces a similar structure of ramified LipoPOx as represented in Scheme 5d [146]. In other cases, ramified LipoPOx results from diacylglycerol, DAG, converted into tosylate initiator [156], [157] (Scheme 5e). The last class of ramified LipoPOx concerns the brush polymers obtained by the copolymerization of hydrophilic oxazoline and 2- R_L -2-oxazolines [158] (Scheme 5f). An alternative route to obtain them is based on the coupling of hydrophilic POx on the terminal reactive function of lipophilic POx.



Scheme 5. Linear and ramified macromolecular architectures of LipoPOx.

This part took stock of the chemical strategies to yield original and well-defined LipoPOx based on various lipid structures from fatty ester group to unsaturated fatty chains and the versatility of oxazoline chemistry with initiation, termination and monomer routes. All these ways produce linear and ramified LipoPOx able to self-assemble in water in nano-objects acting as nDDS thanks to their specific properties described in the following part.

IV.3.3.3 Surfactant properties of LipoPOx

Since the initial report by Kobayashi et al. in 1986, amphiphilic poly(2-oxazoline) block copolymers have been recognized as non-ionic surfactants [159]. Some of them have been evaluated concerning their physico-chemical properties, such as critical micelle concentration (CMC) and surface tension [160]. Naka et al. reported the CMC values and micellization behavior of block copolymers having PMOx backbone and hydrophobic block constituted of short monomer chains like 2-butyl-, 2-octyl- or 2-phenyl-2-oxazoline [161]. Spherical micelles with a diameter of 25 nm were obtained for 2-phenyl-2-oxazoline, while 2-butyl-, 2-octyl-2-oxazoline formed a mixture of spherical and rodlike micelles. Most of the studied block copolymers led to the formation of large aggregates as the hydrophobic content and molecular weight increases [162]. Introducing lipophilic moieties such as C12 or C18 alkyl chains at the end of highly soluble PMOx result in micelle aggregates at a CMC that depends on their HLB. It decreases with a decrease of the hydrophilicity of the polymer backbone or by an increase of the alkyl chain length. For example, replacing a C12 chain by a C18 in LipoPOx of *ca.* 5 kDa the CMC decreases from 4×10^{-2} to 7×10^{-4} wt % [152]. Alternatively, hydrophilicity of the polymer backbone can be tuned by the length and the chemical nature of the polymer. Indeed, substituting the aliphatic side chains of C18-POx 10 kDa by *i*Pr instead of Et decreases the CMC from 4×10^{-3} to 1.6×10^{-3} wt %, whereas reducing the C18-*Pi*PrOx length from 10 to 7 kDa marginally reduces the CMC at 1.2×10^{-3} wt % [163].

The group of Winnik reported another critical parameter concerning the temperature-dependence aggregation phenomenon (defined by the cloud point temperature, T_{cp}) in the case of C18-based LipoPOx [163]. Below T_{cp} , the micellar aggregates form star-like micelles of hydrodynamic radius (R_h) $\sim 7 - 11$ nm depending on alkyl groups and polymer size, which are constituted by a hydrophobic core (R_c) of $\sim 1.2 - 1.4$ nm surrounded by a corona of dangling POx chains. Heating through the T_{cp} induces aggregation of the micelles forming rigid objects of constant size of about 260 nm for C18-PiPrOx. It has been suggested that micelles aggregation form through bridging of water molecules, inducing rearrangement of the rigid micellar core to a more fluid one. This mechanism is supported by the extended conformation of the POx chains in micelles observed from SANS data in semi-dilute regime [164] and microcondensation of the alkyl chains from surface rheological properties measured at the air/water interface [165]. The well-defined behavior and self-organisation in water of POx and LiPOx demonstrated their reassuring uses in nanoformulations.

IV.3.3.4 In vitro biological properties of LipoPOx

The use of LipoPOx in biomedical fields arose for 10 years. They found applications for the formulation of different DDS but only a few basic biological and stability studies were reported such as (i) hemocompatibility, (ii) cytotoxicity and (iii) buffering capacity.

(i) hemocompatibility: In a recent study [131], a LipoPOx associating PMOx to tocopherol named D-tocopheryl-POx (TPOS) was performed to evaluate its safety compared to DSPE-PEG towards red blood cells (RBC) for *in vivo* administration. Human RBC were used as they simulate more accurately *in vivo* environment than animal RBC. From these results, TPOS and DSPE-PEG (FDA approved) presented similar behavior towards human RBC within 5% concentration, indicating TPOS safety to meet the requirements of intravenous injection.

(ii) cytotoxicity: A systematic investigation of the toxicity of a panel of LipoPOx based on homo- and block copolymers has been investigated *in vitro* in three immortal mammalian cell lines [128]. It was found that LipoPOx are very well tolerated even at rather high concentrations ≥ 10 g/L.

(iii) buffering capacity: nDDS such as liposomes entered the cells mainly through energy-dependent endocytosis phenomenon followed by fusion with lysosomes. Liposomes are rapidly degraded by the acidic endolysosomes content. The buffering capacity of the formulation is essential to improve the endosomal escape and the rapid release of the drugs into the cytoplasm without acid degradation. Replacing PEG by TPOS-based LipoPOx in DSPE-PEG formulations resulted in new nDDS formulations that will be described in § 3. TPOS displayed a slower downtrend and gentler slope in the titration curve than DSPE-PEG over the pH range 5.0–7.4, indicating that TPOS exhibits a good buffering capacity [131]. Moreover, it indicates that TPOS would also be pH-sensitive in the acidic environment of lysosomes (pH 5) of cancer cells (see § 3.1.).

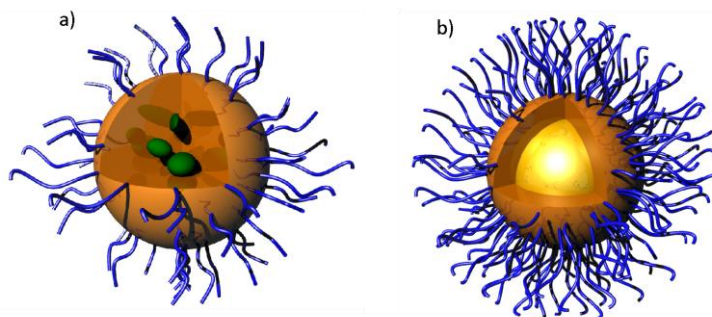
IV.3.4 Nanoformulations of LipoPOx

As LipoPOx hemocompatibility and cytotoxicity have been evaluated and thanks to their physico-chemical properties and synthesis possibilities, LipoPOx are very interesting for formulation work and help designing stable nDDS.

LipoPOx self-assembly into well-defined nano-objects such as micelles which help to solubilize active drugs with hydrophobic properties. Furthermore, the flexible POx backbone [166] with a $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}-$

repetitive unit ensures the stability of the formulation even at a high curvature as it is the case for small spherical nano-objects. The dense corona of POx creates steric repulsion enhancing the stability. The modulation of the LipoPOx physical properties is also a very attractive characteristic as it can introduce thermal stimuli response for formulation. As introduced in part 1.1, depending on the monomer, the hydrophobic and hydrophilic properties can be fine tuned. This directly impacts the crystallinity but also the LCST of the LipoPOx. The formulation behavior with LipoPOx is modified from water soluble to water insoluble upon temperature change. The LCST feature is important to design formulation with a control release of drug at the body temperature [167]. Moreover, the versatility of the LipoPOx synthesis leads to formulations with various organizations such as spherical or lamellar shapes [147]. The addition of excipients (phospholipids, oil, surfactants) to micelles permit further innovant formulations. It is also possible to conjugate molecules such as proteins, peptides or drugs onto the LipoPOx by covalent coupling during its synthesis [134]. This increases the drug solubility and helps to control the drug delivery. Finally, as most of the amphiphilic polymers, LipoPOx also adopts a “frozen behavior” [168]. For the development of formulations, it means that the LipoPOx sometimes require energy supply to interact with the other constituents of the formulation. This can be easily balanced with an increase of agitation, temperature or ultrasound, to disperse the mixture that further reorganizes.

Up-to-date, different types of nanoformulations were designed with LipoPOx such as liposome, mixed-micelle (MM) and lipid nanocapsule (LNC) as represented on Scheme 6. Liposomes are currently made of a lipid bilayer of phospholipids (S75, S100, HSPC) and cholesterol (molar ratio around 3:2) enclosing an aqueous core [67] with LipoPOx inserted into small unilamellar liposomes (SUV). This formulation of about 100 nm in size enables encapsulation of hydrophilic, amphiphilic and lipophilic drugs with a high drug loading [169], [170], [131], [130]. Mixed-micelles are a mixture of lipids, more especially phospholipids and amphiphilic LipoPOx, forming a single vesicle of about 30 nm [171] and 100nm [75] (Scheme 6a). This matrix system can be seen as a hybrid system combining features of liposome and polymersome. Finally, LNC are composed of a liquid lipid core surrounded by a solid membrane formed by lecithin and LipoPOx (Scheme 6b). The phase inversion process was readapted to LipoPOx. This core/shell system has a size of approximately 20 nm and its oily core considerably improved the solubility of hydrophobic drugs [172]. In all of the three formulations LipoPOx coexist with phospholipids but in various ways: insertion in liposomes, entanglement in MM and interaction in LNC. These formulations are applied in most of the cases as nDDS for intravenous administration and more recently for topic applications as respectively described in § 3.1 and § 3.2.



Scheme 6. a) Mixed micelle loaded with drugs, b) Lipid nanocapsule enclosing drugs in its core.

IV.3.4.1 LipoPOx nanoformulations designed for intravenous route

Reduction or suppression of biological recognition mechanisms is of first importance for the efficiency of nDDS. As conventional DDS preferentially accumulate in organs of the reticuloendothelial system (RES), mainly liver and spleen, and to avoid the short blood lifetimes, nDDS are often pegylated to reduce protein adsorption and recognition by the immune system [173], [96]. As a result, such nDDS present enhanced circulation times inducing drug release over a longer time period. Furthermore, different types of nDDS, which belong to the class of soft colloidal nanomaterials such as liposomes, micelles and lipid nanocapsules [174], [175] were tested to enhance drug solubility of hydrophobic drugs and targeting [176], [177]. These formulations have been recently studied using LipoPOx as a new excipient to improve their properties and also reduce side effects (PEG dilemma). Indeed, the LipoPOx major advantage over PEG is its ability to overcome the PEG dilemma which will present a barrier to the development of PEGylated nanoformulations. As represent in Scheme 7, PEGylated nanoformulations with their PEG hydrophilic corona induced first a weak cellular uptake by the target cells compared to LipoPOx nanoformulations. After the cellular uptake a poor and late endosomal escape is observed in presence of PEGylated nanoformulations while LipoPOx nanoformulations by interacting directly with the endosome membrane, lead to a rapid escape of the drug in the cytoplasm before the lysosomal degradation (pH 5.5). LipoPOx nanoformulations improve the cellular uptake and the integrity of the drug loaded and therefore the efficiency of the treatment. In a first study published in 1994 [138], PMOx and PEOx amphipathic polymers were investigated. Both POx bore a carboxylic group end group on which DSPE was covalently linked. LipoPOx was incorporated readily (5 mol %) into liposomes bilayer containing HSPC and cholesterol. PMOx-DSPE and PEOx-DSPE exhibited long plasma lifetimes and low hepatosplenic uptake. PMOx-DSPE was more effective at decreasing blood clearance rates than PEOx-DSPE and best results were reached with PMOx-DSPE 3.26 kDa. LipoPOx liposomes were demonstrated to have similar and even better advantages compared to PEGylated liposomes. These results stimulated the keen interest of nDDS to overcome the PEG dilemma and improve drug delivery. Indeed, for many years, liposomes were coated with PEG on surfaces to improve pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of liposomes [178] but many side effects were observed. The intersurface aqueous layer and the dense PEG corona partly inhibited the ability of cellular uptake [179] leading to a poor endosomal escape via membrane fusion and favor the degradation of drugs in lysosomes referred as the "PEG dilemma" [180]. To overcome this phenomenon, pH-sensitive liposomes based on TPOS have been investigated improving endosomal escape. As previously described (section 2.4), TPOS had satisfactory biocompatibility and pH sensitivity. The cellular uptake of TPOS-liposomes increased with pH compared to conventional liposomes and PEG-liposomes. The intracellular distribution of liposomes was evaluated. Contrary to PEG-liposomes (and conventional liposomes), TPOS-liposomes were localized into the cytoplasm. Thus, the modification of liposomes with TPOS improves the cellular uptake capabilities. Furthermore, after cell internalization, TPOS promoted liposome destabilization leading to endosomal escape and cytoplasmic release. In this study, the cellular uptake and endosomal escape were weaker for the PEG-liposomes and conventional liposomes [131].

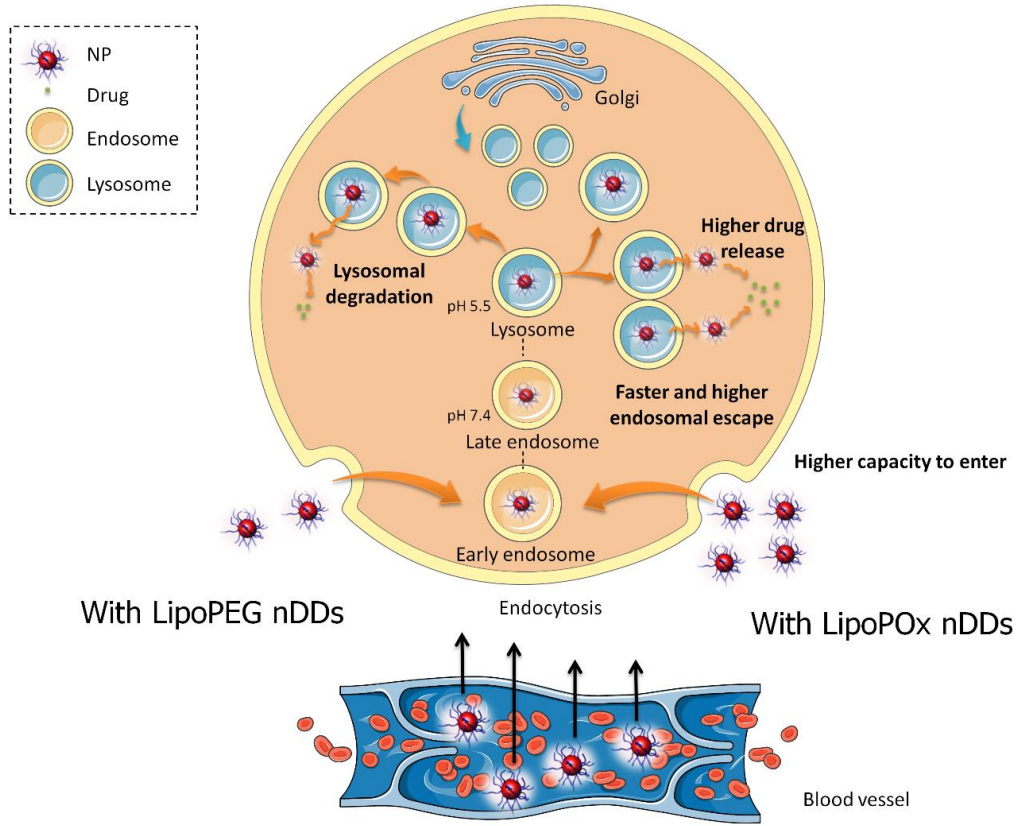
Based on this property, increasing research interest on pH-sensitive liposomes has emerged to improve cancer treatment efficiency. Thus, the use of liposomes loaded with new effective biological anti-cancer drugs, such as genes or proteins, has received increasing attention for two main reasons. Firstly, when pH-sensitive liposomes are ingested by cancer cells, and because the pH in endosomes can reach values below 5.5, the encapsulated genes or proteins must be released rapidly into the cytosol after

having entered the endosome to avoid their digestion and metabolization by lysosomes and their subsequent loss of anticancer activity. Secondly, the extracellular pH values of most solid tumors range from 5.7 to 7.8, whereas the pH of normal tissues is at pH 7.4 [181]. Therefore, LipoPOx based on PEtOx is suitable for pH-sensitive drug delivery systems as recently reported for liposomes and mixed micelles.

Concerning liposomes, a first study reports on a bifunctional liposome using PEtOx-CHMC with long-circulating and pH-sensitive properties. PEtOx-CHMC modified liposomes (PEtOx-CHMC-lipo) were loaded with calcein and an increase of calcein release at low pH was observed. Flow cytometric analysis results showed that the fusion and cellular uptake of PEtOx-CHMC-lipo could be promoted significantly at pH 6.4 compared with those at pH 7.4. Confocal laser scanning microscopy first revealed that PEtOx-CHMC-lipo could be sensitive to low endosomal pH and directly released the fluorescent probe into the cytoplasm of HeLa cells. Then, MTT assays with HeLa cells demonstrated that doxorubicin hydrochloride (DOX) loaded in PEtOx-CHMC-lipo exhibited stronger anti-tumor activity at pH 6.4 than 7.4 (culture cell medium). PEtOx-CHMC-lipo also remained stable when incubated in calcium chloride solution. The pharmacokinetic experiments of liposomes in rats showed that $t_{1/2}$ and AUC of PEtOx-CHMC-lipo were 4.13 and 4.71 times higher than those of classic liposomes.

In a second study, PEtOx was applied in pH-sensitive liposomes named PEtOx-cholesterol hemisuccinate (PEtOx-CHEMS) [130] loaded in DOX. Compared to conventional and PEGylated liposomes, PEtOx-CHEMS can fuse with the endosomal membrane under acidic conditions inducing DOX release in the cytoplasm. In addition, *in vivo* experiments using rats demonstrated that pH-sensitive PEtOx-CHEMS-Lipo were promising formulations for intracellular targeted delivery system to overcome the "PEG dilemma".

In a last liposomes study, Han et al. [131] investigated a liposomal formulation with TPOS (TPOS-L) to yield a sustained and controlled *in vitro* drug delivery. The characteristics of TPOS-L were compared to PEG liposomes (PEG-L). TPOS-L presents a strong hydrophilic shell and conformation cloud increasing its stability. The pH-sensitivity of TPOS-L was attributed to the carbonyl group of TPOS which had a non shared electron pair. When pH decreases, the carbonyl group binds to the hydrogen and undergoes protonation, and the charge transfer changes "N" to "N+", which induces the molecular chain to possess positive charges. The transfer of charge density and the greater steric hindrance around the carbonyl group make the polymer molecules change from hydrophilic to hydrophobic in an acidic environment. As a result, TPOS will induce the destruction of the liposomes bilayer and the release of the anticancer drug loaded in liposomes (Docetaxel) into the cytoplasm. PEtOx modified liposomes exhibit excellent long circulating and pH-sensitive properties as described in Table 1 summarizing all the studies related to this topic.



Scheme 7. Illustration of PEG dilemma.

Table 1. LipoPOx used in nanoformulations for intravenous route.

Reference	Formulation	Composition	Entrapped drug	Nature of LipoPOx	Results
[138]	Liposomes	EPC/chol (3:1)	None	DSPE-PEtOx DSPE-PMOx	POx for protection from rapid recognition and clearance
[169]	Liposomes	HSPC/Chol (3:1)	None	DSPE-PEtOx DSPE-PMOx	POx for long plasma lifetimes low hepatosplenic uptake. Decrease blood clearance.
[182]	Liposomes	Water soluble polymers	None	DSPE-PEtOx DSPE-PMOx	Comparison of soluble polymers -POxylated liposome -furtivity
[129]	Micelles	POX-PEI	None	POX-PEI	Review on membranes, nanoparticles, DDS, stimuli responsive systems
[183]	Chi-aDDns	DPPC:MPOx	Indomethacin	MPOx = PPhOx-g-PMOx	Thermoresponsive behavior of POx -Understanding POx-lipid interactions in bilayer liposome

[75]	Chi-aDDns	DPPC:MPOx	Indomethacin	MPOx = PPhOx-g-PMOx	Preparation of liposomes nanovectors
[184]	Chi-aDDns Liposomes	DPPC:MPOx	Indomethacin	DPPC:MPOx	-Comparison diblock and gradient polymers -Understanding POx-lipid interactions in bilayer liposome
[170]	Liposomes	S75/chol (3:2)	Calcein	PEtOx-CHMC	Liposomes exhibit stronger anti tumor activity
[130]	Liposomes	Phospholipid/chol (3:1)	Doxorubicin	PEtOx-CHEMS	
[131]	Liposomes	S100/chol (3:1)	Docetaxel	TPOS	New pH sensitive DDS for anti tumor activity

A series of papers reported the work of Pippa et al. on advanced DDS named “chimeric advanced drug delivery nanosystems” (chi-aDDnSs) entrapping indomethacin (IND) drug. Two first publications focus on chimeric nano-assemblies composed of DPPC and gradient copolymer: PMOx-*g*-PPhOx named MPOx (be careful of the confusion with the homopolymer PMOx) [183], [75]. The impact of the molar ratio between the components, the temperature, the concentration and the medium (PBS and fetal bovine serum (FBS)) on the size and the stability of chimeric nanocarriers was evaluated. The penetration of PPhOx into lipid domains increases the stability of liposomes of similar nano-objects size except at the higher molar DPPC:MPOx ratio. This increased stability was interpreted by morphological perturbations of the biomolecular sculpture originating from several entry and exit points in the lipid membrane. The thermoresponsive behavior of the chimeric nanocarriers was also highlighted with a change of structural characteristics under increased temperature. Drug release was also detailed with a variation of the MPOx content. Chi-aDDnSs were found to be efficient DDS as MPOx allows the release control of the incorporated drug.

In a more recent paper, these chimeric vesicles were compared to DPPC liposomes modified by an amphiphilic block polymer guest (PEO-*b*-PCL) [184]. The study of various macromolecular architectures was motivated by the understanding of the polymer-lipid interactions because the phospholipid bilayer can be modified with the number of entry points of polymer chains into bilayer - low for block polymer and multiple for gradient polymers. The impact can be measured with the size of the liposomes as well as its thermotropic behavior. A reduction in size was observed with a copolymer architecture dependence (compared to DPPC). Gradient copolymers have intuitively low cooperative interaction with phospholipid bilayer regarding the appearance of a pre-transition enthalpy. However, the main transition of lipid membrane increased from 41 (DPPC) to 52 °C (DPPC/MPOx) and to 54°C (DPPC/PEO-*b*-PCL) and the enthalpy associated with this transition decreased. The conclusions of this detailed work are the key role of the composition and the fractal sculpture of these chimeric systems for designing future nanovectors. Even if this investigation concerns phospholipid with amphiphilic polyoxazoline and not LipoPOx it was very instructive to better understand the behavior of POx in lipid bilayer.

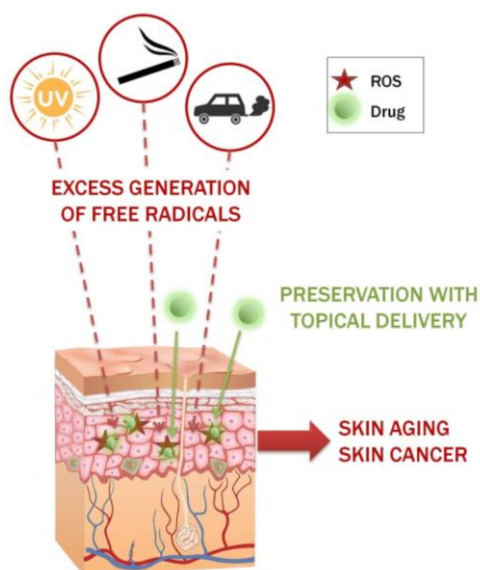
Currently, there is no commercialized nanoformulations with LipoPOx even if Ultraxa company designs and produces high-quality, well-defined, ultra-pure poly(2-oxazoline)s.

Moreover, the Serina Therapeutics company investigated a technology for drug delivery based on POx, drug conjugates delivered by injection [185]. They reach the FDA approval and are currently in clinical trials phase 2 for Parkinson disease treatment [119]. It holds great promises for further nDDs developments based on LipoPOx. LipoPOx were mainly used in formulations for IV administration, no other routes of administration were explored. Consequently, our group was interested in evaluating the potential of LipoPOx for topical delivery of active compounds.

IV.3.4.2 Opening towards nanoformulations for topical route

To topically deliver a molecule to the epidermis or the dermis, the main barrier to overcome is the *stratum corneum* (SC). It acts as a shield to protect the skin from chemical and mechanical aggressions and prevent from water loss. This role is ensured by its unique structure and composition of a series of corneocytes layers embedded in a lipid matrix that limits drug permeability. In addition, most of the therapeutic molecules such as the BCS IV are poorly soluble and have a low penetration capacity, which further enhances the penetration issue [186] (Scheme 8). Therefore, the main challenge is to design a formulation able to cross the SC without altering its integrity and deliver the drug to the targeted layer

(epidermis or dermis). Taking up this challenge to create new skin treatment becomes a growing concern especially with the increase of the environmental pollutants impacting skin health [18]. Air pollution, UV irradiation, tobacco are over generating reactive oxygen species (ROS) in the skin potentially leading to skin aging and cancer [23] as represented in Scheme 8.



Scheme 8. Enhanced skin damages requiring effective topical formulation treatment.

Therefore, nDDS of LipoPOx were evaluated as a potential solution to reach a topical delivery in the case of C16:0PMOx15 [171]. First, the cell viability of the LipoPOx was tested by our group on skin cells, more especially on NiH3T3 mice fibroblasts. After 24 hours, cell viability was impacted (according to the limit of 70% of cells alive, ISO 10993-5) with a concentration of C16:0PMOx15 over 0.2 g/L. Looking at the cellular study on PMOx23 conducted by Bauer et al [140] on L929 mice fibroblasts for which PMOx23 had no impact on cell viability until 20 g/L, it evidenced the impact of the alkyl chain of LipoPOx on cell viability. With the same cell source and close polymerization degree, the alkyl chain decreased by a factor of 100 the cell viability. Therefore, as highlighted in part 1.1, each LipoPOx has its own properties and behaves differently, and no general conclusion can be drawn before conducting cell viability experiments. However, when our group compared LipoPOx to LipoPEG with the same alkyl chain, LipoPOx had significantly less impact on cell viability than LipoPEG [171].

To reach the skin targeted layer, a formulation interacts, enhances permeability and penetrates the SC. Looking at the literature, LipoPOx were proven to have a good interaction with lipid membranes of various compositions (DSPE, SOPC). Used as lipopolymer tethers, the lipid head group of the LipoPOx incorporates into the lipid bilayer by hydrophobic interactions to support phospholipid bilayers [187]. The morphology, stability and physical properties (lipid diffusivity, mobile lipid fraction) of the supported lipid membrane can be modulated with the LipoPOx HLB [157]. Indeed, it is possible to fine-tune the LipoPOx HLB depending on the choice of the monomer, the degree of polymerisation and the lipid head group [187]. This first evidences the potential of LipoPOx to incorporate and destabilize a lipid membrane. As the SC is often modeled as a simple lipid bilayer, LipoPOx promise to definitely interact with the skin as well. Moreover, the literature on chemical penetration enhancers (CPE) supports this assumption since it was demonstrated that the alkyl chain of fatty acid improves skin penetration. For example, it has been proven in several studies that fatty acid such as oleic acid is an effective skin penetration enhancer [188]. Based on those facts, a LipoPOx with oleic acid as lipid chain

should raise hope for skin penetration. In addition, non ionic surfactants composed of lipophilic alkyl chain and hydrophilic head group are known to solubilise lipophilic active ingredients and so they should be able to solubilise lipids with the lipids of SC and enhanced penetration [189].

Since LipoPOx have never been tested on skin, there is no evidence of enhanced penetration. However as described above, the different works conducted on supported lipid membrane and evaluation of CPE suggest a potential penetration for LipoPOx regarding topical delivery of drugs. Oftenly, lipid based formulations are used for their capacity to enhance penetration thanks to their composition close to that of the SC [186]. Therefore lipid based nanoformulations stabilized by LipoPOx were recently developed for topical delivery: mixed-micelles and lipid nanocapsules as represented in Scheme 8. We aimed to conjugate the penetration enhancement of lipid based formulation and the potential effect of LipoPOx for example with the design of LipoPOx mixed-micelles and LipoPOx lipid nanocapsules.

IV.3.5 Conclusion

Lipopolyoxazolines are readily obtained thanks to an adjustable chemistry of lipids and preprogrammed POx CROP. The broad macromolecular engineering allows to synthesize LipoPOx with fine tuned chemical structure. This high degree of modulation combined with the suitable resulting physico-chemical and biological properties place LipoPOx as a valuable asset for formulation work. Indeed, lipid based nanoformulations such as liposomes, mixed micelles and lipid nanocapsules were designed with LipoPOx and ensured stability, encapsulation of drugs and efficacy. Thus, liposomes were successfully designed to match the requirements for IV delivery with appropriate pH sensitivity and even exceed expectations by overcoming the current main issue known as PEG dilemma. LipoPOx also hold great promise for further skin application as a potential chemical penetration enhancer to improve topical drug delivery.

As a new challenging perspectives, LipoPOx also start helping the design of nDDS either for pulmonary route such as for potential lung cancer treatment [190] or for oral administration to improve pharmaceutical applications [191].

Dans une dernière partie, nous allons voir comment évaluer la pénétration au travers de la peau. Nous allons détailler les différents modèles possibles et les techniques associées du plus simple mimant la barrière lipidique du SC aux études *in vivo* sur la peau humaine.

V. Evaluation de la pénétration au travers de la peau

Depuis de nombreuses années, les industriels mettent en place la **règle des 3R** (Russel et Burch) : « *replacement, reduction, refinement* » pour développer des méthodes alternatives qui suppriment, réduisent ou améliorent le recours aux animaux en recherche (Figure 18). Par la suite, la directive européenne 2010/63/UE du 22 septembre 2010 a interdit de tester les matières premières et les produits finis à usage cosmétique sur les animaux.



Figure 18 : Illustration de la règle des 3 R, extraite de la « Fondation Droit Animal Ethique & Science »

Ainsi aujourd'hui, pour **évaluer la pénétration des formulations et des principes actifs dans la peau**, de nombreux modèles sont disponibles sur le marché, chacun présentant des avantages et des inconvénients. Il est certes préférable de tester directement les formulations sur des explants de peau humaine mais ces modèles sont très chers et peu disponibles. **Des outils prédictifs** (liposomes, membranes artificielles) et **des modèles alternatifs** (peau humaine reconstruite, peau animale) ont été développés par de nombreuses équipes de recherche pour prédire le passage des actifs au travers de la peau comme représenté dans la Figure 19. Chacun de ces modèles va ensuite être détaillé.

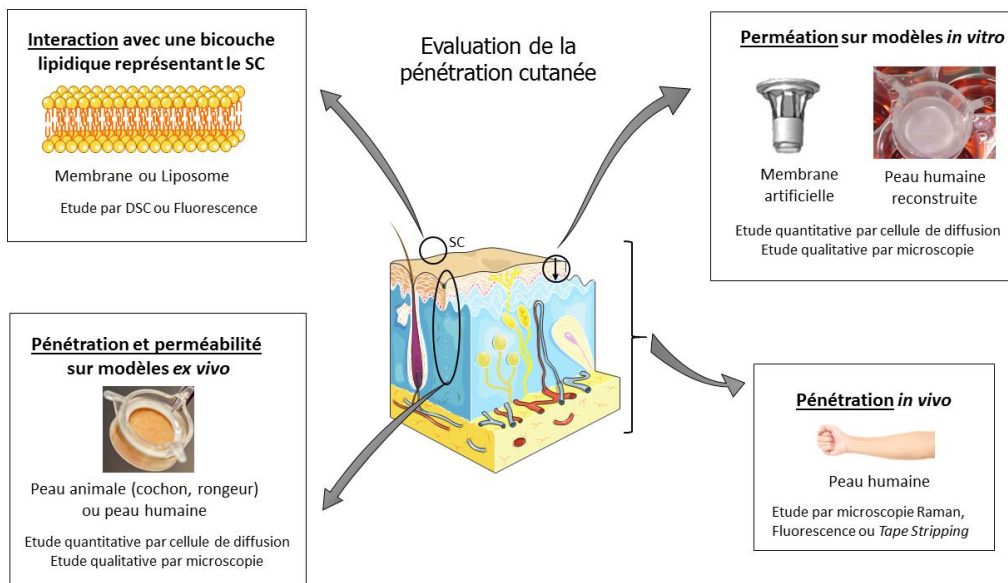


Figure 19 : Ensemble des modèles et techniques pour évaluer la pénétration cutanée

V.1 Mimer la barrière du *stratum corneum* par une bicouche lipidique

Une première approche consiste à **observer l'interaction de la molécule d'intérêt** (principe actif ou excipient de type CPE) **avec une membrane lipidique** de composition proche du SC. Pour cela, des modèles ont été développés avec des membranes lipidiques déposées sur un support [192], [193] ou des liposomes. Les liposomes utilisés dans ces expériences ont d'abord été de composition simple à base de phosphatidylcholine (DPPC) [194],[195] puis plus complexe pour mieux mimer le SC. Appelés SCLL pour «*stratum corneum lipids liposomes* », ces **liposomes** sont composés en général de 40% de céramides, 25% de cholestérol, 25% d'acide palmitique et 10% de sulfate de cholestérol [196], [197], [198]. Ces modèles ont été utilisés pour évaluer l'effet des CPE seuls par exemple par calorimétrie différentielle à balayage (suivi du pic endothermique) ou par mesure indirecte avec des sondes fluorescentes telles que la carboxyfluorescéine ou le diphénylhexatriène (DPH) [199], [200]. Cette approche a montré une bonne corrélation avec les tests de perméation sur peau animale [201]. Depuis quelques années, avec le développement de méthodes alternatives, de nombreux modèles de peau ont été développés et commercialisés.

V.2 Les modèles de peau *in vitro*

De nombreuses **membranes artificielles** à base de lipides ont été mises au point telle que la membrane PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), une membrane artificielle formée d'un filtre hydrophobe recouvert de phospholipides (phosphatidylcholine) solubilisés dans un solvant organique et de deux compartiments : un donneur et un accepteur (Figure 20). Ce modèle a été développé par Kansy et al. en 1998 [202] pour étudier la perméabilité intestinale et effectuer un *screening* rapide de molécules d'intérêts. Depuis, il a été adapté pour les études cutanées avec une composition lipidique plus proche du SC dans **le modèle Skin-PAMPA** qui présente une bonne corrélation avec la peau humaine [203], [204]. Cette membrane est constituée de ceramides (analogues des céramides), de cholestérol, d'acide stéarique et d'huile siliconée pour permettre un *screening* de molécules.

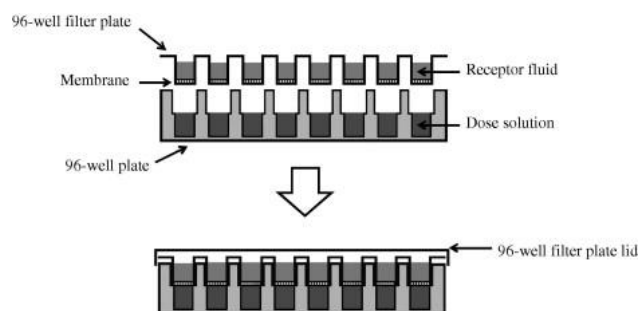


Figure 20 : Représentation de la membrane Skin-PAMPA, extrait de [204]

Dans le même esprit, **la membrane PVPA** (*Phospholipid Vesicle-based Permeation Assay*) (Figure 21) a été initialement développée pour étudier la perméation au travers d'une membrane intestinale avec des couches de liposomes déposées sur un filtre support [205]. La composition des liposomes a aussi été adaptée pour la voie topique avec des phosphatidylcholines, des céramides, du cholestérol, des acides gras et du sulfate de cholestérol [206]. Une étude comparative avec les modèles de peau reconstituée met en avant les nombreux avantages de la membrane PVPA : facile d'utilisation, peu coûteuse et apte à discriminer efficacement des formulations pour la voie topique [207].

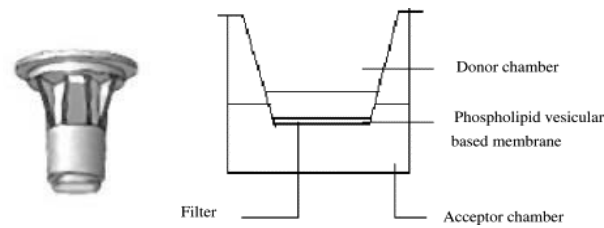


Figure 21 : Représentation de la membrane PVPA, extraite de [205, 208]

Enfin, des membranes à base de poly(diméthoxysiloxane) (PDMS) ou silicone ont été utilisées pour évaluer des formulations topiques [209] et leur influence sur la perméation a été déterminée par une étude cinétique et thermodynamique. Ces membranes permettent aussi d'étudier le transport des composés lipophiles [210]. Dans le cas des molécules hydrophiles, des membranes à base de PDMS et PEG 6000 ont été développées [211].

Après 25 ans de recherche, en combinant l'ingénierie tissulaire et la culture cellulaire *in vitro*, des **modèles de peau humaine reconstruite** ont été élaborés (Figure 22). Dans un premier temps, ils ont été développés à des fins thérapeutiques pour traiter les maladies cutanées, les brûlures ou les greffes, puis ils ont été utilisés *in vitro* pour réaliser des tests de toxicité et de pénétration.

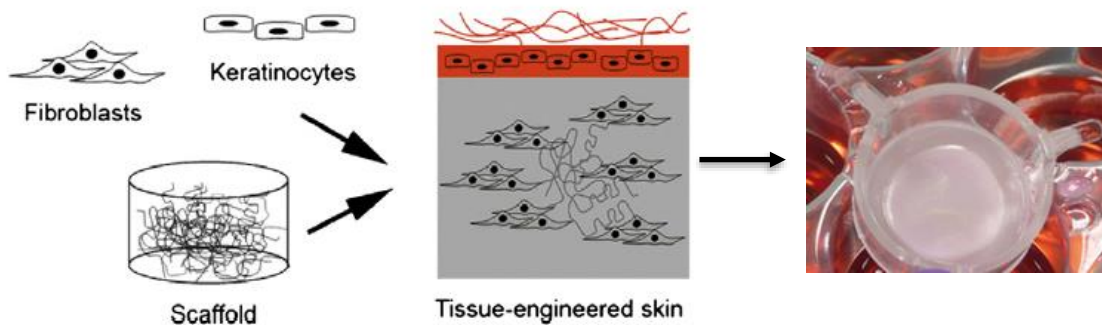


Figure 22 : Illustration du principe de peau humaine reconstruite à gauche, extrait de [212] et exemple de modèle EpiSkin® à droite

Un premier modèle simple a été développé pour obtenir un **épiderme reconstruit humain (ERH)** par ensemencement de kératinocytes sur un support synthétique ou collagène (EpiSkin®, SkinEthic®, EpiDerm® de l'Oréal). Pour les études de perméation, le modèle ERH est suffisant si on s'intéresse seulement à la diffusion par voie intercellulaire et transcellulaire. Une étude comparative des trois principaux ERH commercialisés a été faite par Netzlaff et al. pour évaluer leur morphologie et leur compatibilité pour mener des tests de toxicité, irritabilité, corrosion et perméation [213]. Leur structure générale et leur composition sont proches de la peau humaine et les modèles sont adaptés pour les tests de toxicité. Pour les tests de perméabilité, des études démontrent une bonne corrélation entre la perméation observée sur les modèles ERH et sur la peau humaine alors que d'autres études montrent une perméation plus importante avec le ERH (10 fois supérieure) [214]. Ainsi, un **modèle de peau complet** contenant toutes les couches allant du derme à l'épiderme par l'addition de fibroblastes appelé « **full thickness (FT)** » (GraftSkin, EpiDermFT, Pheninon) a été développé [212]. Le modèle FT présente une perméabilité seulement 3-4 fois supérieure à la peau humaine grâce aux conditions de culture et à la composition en lipides [215]. Les modèles de peau reconstruite sont aujourd'hui facilement disponibles, reproductibles, proches de la structure de la peau *in vivo* ; ils permettent donc de faire un *screening* rapide de la perméation de molécules car ils miment très fortement les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques de la peau. Cependant, ils sont encore chers, la

barrière cutanée est faible induisant une perméation plus forte, les annexes pilosébacées ne sont pas présentes et leur stabilité dans le temps est faible [216]. Toutefois, ces modèles permettent d'étudier d'une part la perméation par **une méthode quantitative basée sur des cellules de diffusion** et d'autre part la pénétration en suivant qualitativement la molécule d'intérêt par microscopie (partie V.4). La **cellule de diffusion** la plus utilisée est celle de **Franz** (Figure 23). Elle est composée d'un compartiment donneur, de la membrane, puis d'un compartiment récepteur. La formulation est appliquée dans le compartiment donneur, la molécule diffuse dans la membrane et est collectée dans le compartiment récepteur pour être dosée [217].

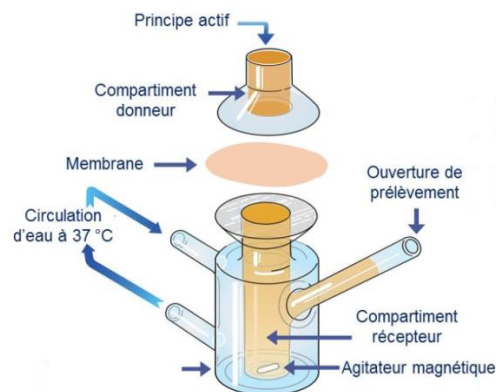


Figure 23 : Représentation d'une cellule de Franz, extraite de [218]

V.3 Les modèles de peau *ex vivo* : les explants

Puisque les modèles de peau humaine ne sont pas toujours accessibles, **des modèles de peau animale** ont été utilisés tels que la peau de cochon, de serpent, de souris, de rat, de lapin, de chien ou de singe [216]. De par son anatomie, son histologie et sa physiologie, la peau de cochon est le modèle le plus proche de celui de l'homme et le plus approprié pour des études de pénétration et perméation. Les études de perméation entre la peau de cochon et la peau humaine ont montré une bonne corrélation alors que la peau de rongeurs est plus perméable [219] bien qu'ils soient plus faciles à manipuler et moins chers [214]. Les conditions de stockage et le traitement des tissus comme la congélation ont également un impact sur les tests de perméabilité.

Suite à des chirurgies, il est également possible de travailler ***ex vivo* avec des explants de peau humaine** de l'abdomen, du dos, des jambes ou de la poitrine. Le commerce de peau humaine est strictement encadré par des autorisations éthiques et gérées par des laboratoires spécialisés. La perméabilité des peaux varie en fonction du donneur (sexe, âge, type de peau) et du site anatomique se traduisant par des différences de composition lipidique, d'épaisseur de peau et d'hydratation. De nombreuses formulations topiques ont été testées, elles sont regroupées dans le Tableau 3. Ce tableau regroupe les différentes études réalisées avec les explants de peau avec le type de formulation testée et les techniques utilisées. Les deux techniques les plus utilisées sont le *tape stripping* (TS) et l'étude de perméabilité avec les cellules de Franz. L'étude qualitative par l'observation en microscopie à fluorescence reste peu utilisée. Nous allons étudier plus en détails ces techniques dans la partie suivante.

Tableau 3 : Evaluation des formulations topiques sur des différents modèles d'explants de peau, adapté de [214]

Site	Méthode	Formulation	Molécule testée	Conclusions	Référence
Abdomen	TS, Fluo	Niosomes	Trétinoïne	Amélioration de l'étalement cutané	[220]
Abdomen	Fluo	Niosomes	Acide ellargique	Délivrance efficace dans les couches profondes. Pénétration dépendante de la taille, taux de chargement et agent de solubilité	[221]
Abdomen	TS	Liposomes	Témoporfine	Amélioration du dépôt dans le SC	[222]
Abdomen	TS	Flexible liposomes	Témoporfine	Délivrance maximum avec liposomes flexibles dans les couches profondes	[223]
Abdomen	FC	Liposomes avec propylène glycol	Miconazole	Amélioration du dépôt par rapport aux liposomes conventionnels	[224]
Abdomen	FC	NE,SLNs, liposomes	Palmitate de rétinol	Meilleure perméation de la molécule avec les liposomes que SLN et NE	[225]
Cuisses	FC	Emulsions	Céramide	Amélioration de la perméabilité du SC	[226]
Thorax, (cadavre)	TS	Hydrogel, Emulsions	Linalol, terpinen-4-ol	Pénétration des molécules : émulsion < solution huileuse < hydrogel	[227]
Abdomen	FC	NLC	Artéméther	Libération contrôlée sur une longue période	[228]
Poitrine	FC	Liposomes, transfersomes, éthosomes	Célécoxib	Pénétration dans l'ordre suivant : Solution aqueuse < liposomes < transfersomes < éthosomes	[229]

Cy5 : iodure de 1,1-di-((Z)-octadéc-9-èn-1-yl) pyrrolidinium; FC : Cellules de Franz ; TS : *tape stripping*, NP : nanoparticules ; Fluo : microscopie à fluorescence

Les explants de peau humaine sont donc les modèles les plus pertinents pour l'évaluation de la pénétration et de la perméation de principes actifs et des formulations topiques.

V.4 Les méthodes d'évaluation *in vivo*

La pénétration de PA et de formulations peut être évaluée de façon non invasive, **quantitative** et plus ou moins complexe en fonction des outils mis en œuvre. Ainsi, la méthode du « *tape stripping* » consiste à déposer la formulation contenant le principe actif sur la peau, après pénétration, les couches du SC sont retirées successivement par application et arrachement d'une bande adhésive. Le principe actif est ensuite dosé dans l'adhésif couche par couche (HPLC, UV) pour déterminer la quantité ayant

passée la barrière du SC [216]. Cependant, cette technique peut être biaisée d'une part si la surface de la peau est irrégulière notamment avec la présence de rides, de pilosité importante ou de sillons et d'autre part, à cause de la nature de la formulation qui peut altérer le pouvoir d'adhésion de la bande [230].

Pour une étude plus poussée, **des mesures en microscopie confocale, microscopie polarisée et multiphotons pour localiser les molécules** peuvent être réalisées. Il est aussi possible de comprendre les changements morphologiques et biologiques en les combinant avec des techniques spectroscopiques et microscopiques basées sur la réflectance, le Raman, la tomographie en temps de vie de fluorescence (FLIM). Deux options sont envisageables pour un suivi *in vivo* jusqu'à une profondeur de 200 μm par fluorescence (multiphotonique) : soit le principe actif est intrinsèquement fluorescent, soit il faut lui greffer une sonde fluorescente ou en introduire une dans la formulation étudiée. De plus, la peau disposant de fluorochromes naturels (auto-fluorescents) (Figure 24), il est possible de localiser chaque couche de la peau : le SC *via* la kératine, l'épiderme avec les NADPH, FAD et mélanine, et le derme grâce à l'élastine et au collagène [231], [232].

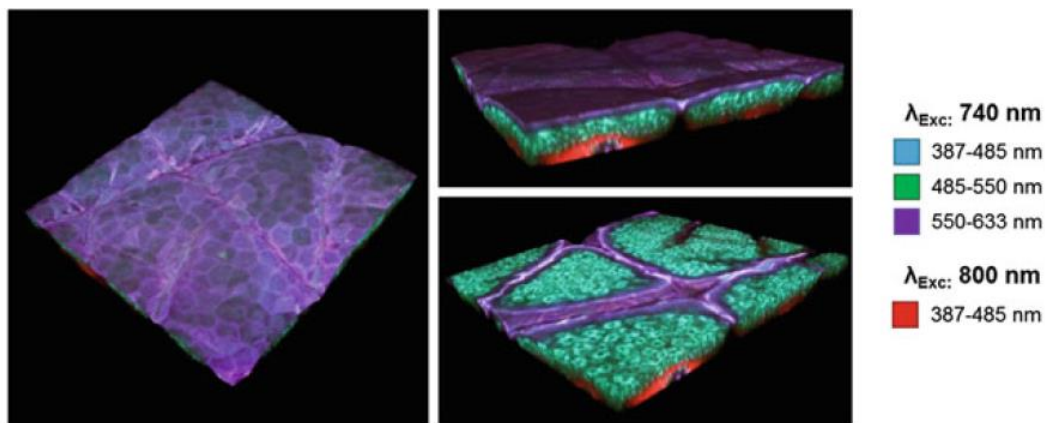


Figure 24 : Image de l'auto fluorescence de la peau, [231]

La microscopie confocale Raman est aussi une méthode non invasive, facile d'utilisation et efficace pour observer la pénétration de molécule au travers de la peau à condition bien sûr que la molécule possède un signal Raman significatif et différent de celui de la peau. Cependant, l'interprétation des spectres peut s'avérer difficile. La pénétration peut être suivie jusqu'à 2 μm de profondeur avec une grande sensibilité [217], [230]. L'université de Bordeaux développe un outil Raman portatif pour évaluer la pénétration des principes actifs *in vivo* [233].

Les méthodes de microscopie peuvent également être utilisées sur les modèles *in vitro* ou *ex vivo* pour une analyse quantitative.

Conclusion du chapitre

Ce chapitre bibliographique a permis d'exposer les principales propriétés de la peau ainsi que les enjeux de sa protection, notamment contre les agressions par les radicaux libres. L'état de l'art des formulations par voie topique a mis en avant l'intérêt des nanoformulations lipidiques pour délivrer efficacement la quercétine par voie topique. Toutefois, ce bilan a également souligné la surutilisation des PEG dans ces formulations et leur potentiel nocif pour la santé. Les polyoxazolines ont alors été présentées comme une alternative prometteuse aux PEG dans ces formulations. Toutefois, aucune formulation par voie topique utilisant des POx n'a été reportée jusqu'à présent dans la littérature. L'objectif de ces travaux de thèse a été de développer des formulations innovantes utilisant des lipopolyoxazolines avec des chaînes alkyle lipidiques variables. Nous avons d'abord synthétisé différentes architectures macromoléculaires de LipoPOx puis étudié leurs propriétés physico-chimiques et leurs cytotoxicités (Chapitre 2). Ensuite, nous les avons employés dans des nanoformulations chargées en antioxydant et évalués en termes de stabilité, de taux de chargement et d'activité antioxydante (Chapitre 3). Également, nous avons examiné les interactions de surface de ces formulations avec un modèle de peau non biologique pour comprendre les interactions mises en jeu (Chapitre 4). Finalement, nous avons évalué leurs capacités d'insertion dans plusieurs modèles mimant la structure de la peau et de pénétration notamment au travers d'explant de peau humaine (Chapitre 5).

Références

1. Lai-Cheong, J.E. and J.A. McGrath, *Structure and function of skin, hair and nails*. Medicine, 2009. 37(5): p. 223-226.
2. van Smeden, J., et al., *The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014. 1841(3): p. 295-313.
3. Verdier-Sévrain, S. and F. Bonté, *Skin hydration: a review on its molecular mechanisms*. Journal of Cosmetic Dermatology, 2007. 6(2): p. 75-82.
4. Marks, J.G. and J.J. Miller, *2 - Structure and Function of the Skin*, in *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology (Sixth Edition)*, J.G. Marks and J.J. Miller, Editors. 2019, Content Repository Only!: London. p. 2-10.
5. Menon, G.K., G.W. Cleary, and M.E. Lane, *The structure and function of the stratum corneum*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. 435(1): p. 3-9.
6. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.-M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. Experimental Dermatology, 2008. 17(12): p. 1063-1072.
7. Feingold, K.R. and P.M. Elias, *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 2014. 1841(3): p. 280-294.
8. Darlenski, R., et al., *Non-invasive in vivo methods for investigation of the skin barrier physical properties*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2009. 72(2): p. 295-303.
9. Norlén, L., et al., *A new HPLC-based method for the quantitative analysis of inner stratum corneum lipids with special reference to the free fatty acid fraction*. Archives of dermatological research, 1998. 290: p. 508-16.
10. Elias, P.M., *Epidermal lipids, barrier function, and desquamation*. J Invest Dermatol, 1983. 80 Suppl: p. 44s-49s.
11. Wertz, P.W. and B. van den Bergh, *The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers*. Chemistry and Physics of Lipids, 1998. 91(2): p. 85-96.
12. Mendelsohn, R., C.R. Flach, and D.J. Moore, *Determination of molecular conformation and permeation in skin via IR spectroscopy, microscopy, and imaging*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2006. 1758(7): p. 923-933.
13. Boncheva, M., F. Damien, and V. Normand, *Molecular organization of the lipid matrix in intact Stratum corneum using ATR-FTIR spectroscopy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2008. 1778(5): p. 1344-1355.
14. Zeng, Q., et al., *6.20 Skin Tissue Engineering* ✱, in *Comprehensive Biomaterials II*, P. Ducheyne, Editor. 2017, Elsevier: Oxford. p. 334-382.
15. Bouwstra, J.A. and M. Ponc, *The skin barrier in healthy and diseased state*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2006. 1758(12): p. 2080-2095.
16. Björklund, S., et al., *A water gradient can be used to regulate drug transport across skin*. Journal of Controlled Release, 2010. 143(2): p. 191-200.
17. Kobayashi, T., S. Naik, and K. Nagao, *Choreographing Immunity in the Skin Epithelial Barrier*. Immunity, 2019. 50(3): p. 552-565.
18. Krutmann, J., et al., *The skin aging exposome*. Journal of Dermatological Science, 2017. 85(3): p. 152-161.
19. Valacchi, G., et al., *Cutaneous responses to environmental stressors*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. 1271(1): p. 75-81.
20. Poljšak, B., U. Glavan, and R. Dahmane, *Skin Cancer, Free Radicals and Antioxidants*. Vol. 4. 2011. 1554-1134.
21. Waris, G. and H. Ahsan, *Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions*. Journal of carcinogenesis, 2006. 5: p. 14-14.
22. Vierkötter, A. and J. Krutmann, *Environmental influences on skin aging and ethnic-specific manifestations*. Dermato-endocrinology, 2012. 4(3): p. 227-231.
23. Baudouin, C., et al., *Environmental pollutants and skin cancer*. Cell Biology and Toxicology, 2002. 18(5): p. 341-348.
24. Godic, A., et al., *The Role of Antioxidants in Skin Cancer Prevention and Treatment*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2014. 2014: p. 6.
25. Dröge, W., *Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function*. Physiological Reviews, 2002. 82(1): p. 47-95.
26. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015. 97: p. 55-74.
27. Gu, Y., et al., *Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging*. Ageing Research Reviews, 2020. 59: p. 101036.
28. Fussell, J.C. and F.J. Kelly, *Oxidative contribution of air pollution to extrinsic skin ageing*. Free Radical Biology and Medicine, 2019.
29. Rinnerthaler, M., et al., *Oxidative Stress in Aging Human Skin*. Biomolecules, 2015. 5(2): p. 545.
30. El-Mohtadi, F., R. d'Arcy, and N. Tirelli, *Oxidation-Responsive Materials: Biological Rationale, State of the Art, Multiple Responsiveness, and Open Issues*. Macromolecular Rapid Communications, 2019. 40(1): p. 1800699.
31. Ye, H., et al., *Recent Advances on Reactive Oxygen Species-Responsive Delivery and Diagnosis System*. Biomacromolecules, 2019. 20(7): p. 2441-2463.
32. Song, C.-C., F.-S. Du, and Z.-C. Li, *Oxidation-responsive polymers for biomedical applications*. Journal of Materials Chemistry B, 2014. 2(22): p. 3413-3426.
33. Clark, T., et al., *Why are dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone such good solvents?* Journal of Molecular Modeling, 2008. 14(8): p. 689-697.

34. Sun, X., et al., "Integrated" and "insulated" boronate-based fluorescent probes for the detection of hydrogen peroxide. *Chemical Communications*, 2013. 49(75): p. 8311-8313.
35. Poole, K.M., et al., ROS-responsive microspheres for on demand antioxidant therapy in a model of diabetic peripheral arterial disease. *Biomaterials*, 2015. 41: p. 166-175.
36. Gupta, M.K., et al., Poly(PS-*b*-DMA) micelles for reactive oxygen species triggered drug release. *Journal of Controlled Release*, 2012. 162(3): p. 591-598.
37. Velluto, D., D. Demurtas, and J.A. Hubbell, PEG-*b*-PPS Diblock Copolymer Aggregates for Hydrophobic Drug Solubilization and Release: Cyclosporin A as an Example. *Molecular Pharmaceutics*, 2008. 5(4): p. 632-642.
38. Hu, P. and N. Tirelli, Scavenging ROS: Superoxide Dismutase/Catalase Mimetics by the Use of an Oxidation-Sensitive Nanocarrier/Enzyme Conjugate. *Bioconjugate Chemistry*, 2012. 23(3): p. 438-449.
39. Allen, S.D., et al., Celestrol-loaded PEG-*b*-PPS nanocarriers as an anti-inflammatory treatment for atherosclerosis. *Biomaterials Science*, 2019. 7(2): p. 657-668.
40. Napoli, A., et al., Oxidation-responsive polymeric vesicles. *Nature Materials*, 2004. 3(3): p. 183-189.
41. Reddy, S.T., et al., In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 2006. 112(1): p. 26-34.
42. Chen, G., et al., Reactive oxygen species-responsive polymeric nanoparticles for alleviating sepsis-induced acute liver injury in mice. *Biomaterials*, 2017. 144: p. 30-41.
43. Stano, A., et al., PPS nanoparticles as versatile delivery system to induce systemic and broad mucosal immunity after intranasal administration. *Vaccine*, 2011. 29(4): p. 804-812.
44. Gupta, M.K., et al., Cell Protective, ABC Triblock Polymer-Based Thermoresponsive Hydrogels with ROS-Triggered Degradation and Drug Release. *Journal of the American Chemical Society*, 2014. 136(42): p. 14896-14902.
45. Shim, M.S. and Y. Xia, A Reactive Oxygen Species (ROS)-Responsive Polymer for Safe, Efficient, and Targeted Gene Delivery in Cancer Cells. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013. 52(27): p. 6926-6929.
46. Wilson, D.S., et al., Orally delivered thioketal nanoparticles loaded with TNF- α -siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines. *Nature materials*, 2010. 9(11): p. 923-928.
47. Sun, C., et al., A ROS-responsive polymeric micelle with a π -conjugated thioketal moiety for enhanced drug loading and efficient drug delivery. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017. 15(43): p. 9176-9185.
48. Martin, J.R., et al., A porous tissue engineering scaffold selectively degraded by cell-generated reactive oxygen species. *Biomaterials*, 2014. 35(12): p. 3766-3776.
49. Huo, M., et al., Redox-responsive polymers for drug delivery: from molecular design to applications. *Polymer Chemistry*, 2014. 5(5): p. 1519-1528.
50. Liang, J. and B. Liu, ROS-responsive drug delivery systems. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2016. 1(3): p. 239-251.
51. Maqsoudlou, A., et al., Improving the efficiency of natural antioxidant compounds via different nanocarriers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2020. 278: p. 102122.
52. Nagula, R.L. and S. Wairkar, Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *Journal of Controlled Release*, 2019. 296: p. 190-201.
53. Hatahet, T., et al., Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016. 108(Supplement C): p. 41-53.
54. D'Andrea, G., Quercetin: A flavonol with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia*, 2015. 106: p. 256-271.
55. Loughton, M.J., et al., Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochemical Pharmacology*, 1989. 38(17): p. 2859-2865.
56. Lafforgue, C. and J.P. Marty, Absorption percutanée. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 2007. 134(3, Part 2): p. 18-23.
57. Carla, V., S. Joao, and P. Alberto, Overcoming the Skin Permeation Barrier: Challenges and Opportunities. *Current Pharmaceutical Design*, 2015. 21(20): p. 2698-2712.
58. Roberts, M.S., et al., Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *Journal of Controlled Release*, 2017. 247(Supplement C): p. 86-105.
59. Czajkowska-Kośnik, A., M. Szekalska, and K. Winnicka, Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems. *Pharmacological Reports*, 2019. 71(1): p. 156-166.
60. Münch, S., J. Wohlrab, and R.H.H. Neubert, Dermal and transdermal delivery of pharmaceutically relevant macromolecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017. 119: p. 235-242.
61. Cross, S.E. and M.S. Roberts, Physical Enhancement of Transdermal Drug Application: Is Delivery Technology Keeping up with Pharmaceutical Development? *Current Drug Delivery*, 2004. 1(1): p. 81-92.
62. Dragicevic, N., J.P. Atkinson, and H.I. Maibach, Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action, in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, N. Dragicevic and H.I. Maibach, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 11-27.
63. Barry, B.W., Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. *Journal of Controlled Release*, 1991. 15(3): p. 237-248.
64. Williams, A.C. and B.W. Barry, Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. 56(5): p. 603-618.
65. Passive Skin Permeation Enhancement, in *Topical and Transdermal Drug Delivery*. p. 23-42.

66. Mota, A.H., et al., *Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. 532(2): p. 710-728.
67. Zhai, Y. and G. Zhai, *Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery*. Journal of Controlled Release, 2014. 193: p. 90-99.
68. Eze, M.O., *Phase transitions in phospholipid bilayers: Lateral phase separations play vital roles in biomembranes*. Biochemical Education, 1991. 19(4): p. 204-208.
69. E. Sanarova, A.L., N. Oborotova, O. Orlova, A. Polozkova, M. Dmitrieva, N. Nikolaeva, *Liposome Drug Delivery*. J. Pharm. Sci. & Res, 2019. 11: p. 1148-1155.
70. Palchetti, S., et al., *The protein corona of circulating PEGylated liposomes*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2016. 1858(2): p. 189-196.
71. Sala, M., et al., *Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. 535(1): p. 1-17.
72. Le Meins, J.F., et al., *Hybrid polymer/lipid vesicles: state of the art and future perspectives*. Materials Today, 2013. 16(10): p. 397-402.
73. Almgren, M., *Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. 1508(1): p. 146-163.
74. Kozlov, M.M., D. Lichtenberg, and D. Andelman, *Shape of Phospholipid/Surfactant Mixed Micelles: Cylinders or Disks? Theoretical Analysis*. The Journal of Physical Chemistry B, 1997. 101(33): p. 6600-6606.
75. Pippa, N., et al., *DPPC:MPOx chimeric advanced Drug Delivery nano Systems (chi-aDDnSs): Physicochemical and structural characterization, stability and drug release studies*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. 450(1): p. 1-10.
76. Duan, Y., et al., *Curcumin-loaded mixed micelles: preparation, optimization, physicochemical properties and cytotoxicity in vitro*. Drug Delivery, 2015. 22(1): p. 50-57.
77. Sun, S., et al., *Development and evaluation of ibuprofen loaded mixed micelles preparations for topical delivery*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2018. 48: p. 363-371.
78. Czajkowska-Kośnik, A., M. Szekalska, and K. Winnicka, *Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems*. Pharmacol Rep, 2019. 71(1): p. 156-166.
79. Rainer, H.M., S. Ranjita, and M.K. Cornelia, *20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications*. Current Drug Discovery Technologies, 2011. 8(3): p. 207-227.
80. Garcês, A., et al., *Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018. 112: p. 159-167.
81. Heurtault, B., et al., *A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers*. Vol. 19. 2002. 875-80.
82. Heurtault, B., et al., *Interfacial stability of lipid nanocapsules*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2003. 30: p. 225-235.
83. Anton, N., et al., *Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion*. International Journal of Pharmaceutics, 2007. 344(1): p. 44-52.
84. Hatahet, T., et al., *Liposomes, lipid nanocapsules and smartCrystals®: A comparative study for an effective quercetin delivery to the skin*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. 542(1): p. 176-185.
85. Hatahet, T., et al., *Dermal quercetin smartCrystals®: Formulation development, antioxidant activity and cellular safety*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. 102(Supplement C): p. 51-63.
86. Hatahet, T., et al., *Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. 518(1): p. 167-176.
87. Caddeo, C., et al., *Topical Anti-Inflammatory Potential of Quercetin in Lipid-Based Nanosystems: In Vivo and In Vitro Evaluation*. Pharmaceutical Research, 2014. 31(4): p. 959-968.
88. Chessa, M., et al., *Effect of Penetration Enhancer Containing Vesicles on the Percutaneous Delivery of Quercetin through New Born Pig Skin*. Pharmaceutics, 2011. 3(3): p. 497-509.
89. Manca, M.L., et al., *Improvement of quercetin protective effect against oxidative stress skin damages by incorporation in nanovesicles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. 123: p. 566-574.
90. Bose, S., et al., *Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. 441(1): p. 56-66.
91. Chen-yu, G., et al., *Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. 430(1): p. 292-298.
92. Martena, V., et al., *Permeation and skin retention of quercetin from microemulsions containing Transcutol® P AU - Censi, Roberta*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2012. 38(9): p. 1128-1133.
93. Tan, Q., et al., *Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery*. International journal of nanomedicine, 2011. 6: p. 1621-1630.
94. Pool, H., et al., *Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles*. Journal of Nanomaterials, 2012. 2012: p. 12.
95. Shen, Z., et al., *1 - PEGylated "stealth" nanoparticles and liposomes, in Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, A. Parambath, Editor. 2018, Woodhead Publishing. p. 1-26.

96. Knop, K., et al., *Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010. 49(36): p. 6288-6308.
97. Zhang, P., et al., *Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation*. *Journal of Controlled Release*, 2016. 244: p. 184-193.
98. Lubich, C., et al., *The Mystery of Antibodies Against Polyethylene Glycol (PEG) - What do we Know?* *Pharmaceutical Research*, 2016. 33(9): p. 2239-2249.
99. Dams, E.T.M., et al., *Accelerated Blood Clearance and Altered Biodistribution of Repeated Injections of Sterically Stabilized Liposomes*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000. 292(3): p. 1071-1079.
100. Ishida, T. and H. Kiwada, *Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. 354(1): p. 56-62.
101. Chanan-Khan, A., et al., *Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil®): possible role in hypersensitivity reactions*. *Annals of Oncology*, 2003. 14(9): p. 1430-1437.
102. Assal, C. and P.Y. Watson, *Angioedema as a hypersensitivity reaction to polyethylene glycol oral electrolyte solution*. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2006. 64(2): p. 294-295.
103. Fisher, A.A., *Immediate and delayed allergic contact reactions to polyethylene glycol*. *Contact Dermatitis*, 1978. 4(3): p. 135-138.
104. Le Coz, C.-J. and E. Heid, *Allergic contact dermatitis from methoxy PEG-17/dodecyl glycol copolymer (Elfacos® OW 100)*. *Contact Dermatitis*, 2001. 44(5): p. 308-319.
105. Quartier, S., et al., *Allergic contact dermatitis to copolymers in cosmetics – case report and review of the literature*. *Contact Dermatitis*, 2006. 55(5): p. 257-267.
106. Herold, D.A., K. Keil, and D.E. Bruns, *Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase*. *Biochemical Pharmacology*, 1989. 38(1): p. 73-76.
107. Webster, R., et al., *PEG and PEG conjugates toxicity: towards an understanding of the toxicity of PEG and its relevance to PEGylated biologicals*, in *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, F.M. Veronese, Editor. 2009, Birkhäuser Basel: Basel. p. 127-146.
108. Rudmann, D.G., et al., *High Molecular Weight Polyethylene Glycol Cellular Distribution and PEG-associated Cytoplasmic Vacuolation Is Molecular Weight Dependent and Does Not Require Conjugation to Proteins*. *Toxicologic Pathology*, 2013. 41(7): p. 970-983.
109. Baumann, A., et al., *Pharmacokinetics, metabolism and distribution of PEGs and PEGylated proteins: quo vadis?* *Drug Discovery Today*, 2014. 19(10): p. 1623-1631.
110. Irizarry Rovira, A.R., et al., *Scientific and Regulatory Policy Committee Points to Consider: Histopathologic Evaluation in Safety Assessment Studies for PEGylated Pharmaceutical Products*. *Toxicol Pathol*, 2018. 46(6): p. 616-635.
111. Kumar, V. and D.S. Kalonia, *Removal of peroxides in polyethylene glycols by vacuum drying: Implications in the stability of biotech and pharmaceutical formulations*. *AAPS PharmSciTech*, 2017. 7(3): p. E47.
112. Hoogenboom, R. and H. Schlaad, *Bioinspired Poly(2-oxazoline)s*. *Polymers*, 2011. 3(1): p. 467-488.
113. Verbraeken, B., et al., *The chemistry of poly(2-oxazoline)s*. *European Polymer Journal*, 2017. 88: p. 451-469.
114. Wiesbrock, F., R. Hoogenboom, and U.S. Schubert, *Microwave-Assisted Polymer Synthesis: State-of-the-Art and Future Perspectives*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004. 25(20): p. 1739-1764.
115. Guillerm, B., et al., *How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012. 33(19): p. 1600-1612.
116. Schlaad, H., et al., *Poly(2-oxazoline)s as Smart Bioinspired Polymers*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2010. 31(6): p. 511-525.
117. Lorson, T., et al., *Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update*. *Biomaterials*, 2018. 178: p. 204-280.
118. Luxenhofer, R., et al., *Poly(2-oxazoline)s as Polymer Therapeutics*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012. 33(19): p. 1613-1631.
119. Moreadith, R.W., et al., *Clinical development of a poly(2-oxazoline) (POZ) polymer therapeutic for the treatment of Parkinson's disease – Proof of concept of POZ as a versatile polymer platform for drug development in multiple therapeutic indications*. *European Polymer Journal*, 2017. 88: p. 524-552.
120. Hillaireau, H. and P. Couvreur, *Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery*. *Cell Mol Life Sci*, 2009. 66(17): p. 2873-96.
121. Simon, L., et al., *Recent Advances and Prospects in NanoDrug Delivery Systems using Lipopolyoxazolines*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020: p. 119536.
122. Torchilin, V., *Multifunctional and stimuli-sensitive pharmaceutical nanocarriers*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2009. 71(3): p. 431-444.
123. Kunath, K., et al., *Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine*. *Journal of Controlled Release*, 2003. 89(1): p. 113-125.
124. Armstrong, J.K., et al., *Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients*. *Cancer*, 2007. 110(1): p. 103-111.
125. Sherman, M.R., M.G.P. Saifer, and F. Perez-Ruiz, *PEG-uricase in the management of treatment-resistant gout and hyperuricemia*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. 60(1): p. 59-68.

126. Hoogenboom, R., et al., *Microwave-assisted synthesis and properties of a series of poly(2-alkyl-2-oxazoline)s*. *Designed Monomers and Polymers*, 2005. 8(6): p. 659-671.
127. Vergaelen, M., et al., *Ethyl acetate as solvent for the synthesis of poly(2-ethyl-2-oxazoline)*. *Green Chemistry*, 2020. 22(5): p. 1747-1753.
128. Barz, M., et al., *Overcoming the PEG-addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure–property relationships to better defined therapeutics*. *Polymer Chemistry*, 2011. 2(9): p. 1900-1918.
129. Adams, N. and U.S. Schubert, *Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. 59(15): p. 1504-1520.
130. Xu, H., et al., *Design and evaluation of pH-sensitive liposomes constructed by poly(2-ethyl-2-oxazoline)-cholesterol hemisuccinate for doxorubicin delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. 91: p. 66-74.
131. Han, S., et al., *Delivery of docetaxel using pH-sensitive liposomes based on D- α -tocopheryl poly(2-ethyl-2-oxazoline) succinate: Comparison with PEGylated liposomes*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019. 14(4): p. 391-404.
132. Gupta, M.N. and I. Roy, *How Corona Formation Impacts Nanomaterials as Drug Carriers*. *Molecular Pharmaceutics*, 2020. 17(3): p. 725-737.
133. Hoogenboom, R., *Poly(2-oxazoline)s based on fatty acids*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 2011. 113(1): p. 59-71.
134. Viegas, T.X., et al., *Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery*. *Bioconjugate Chemistry*, 2011. 22(5): p. 976-986.
135. Foreman, M.B., et al., *Gelation of Amphiphilic Lipopolymers at the Air–Water Interface: 2D Analogue to 3D Gelation of Colloidal Systems with Grafted Polymer Chains?* *Langmuir*, 2003. 19(2): p. 326-332.
136. Hoogenboom, R. and H. Schlaad, *Thermoresponsive poly(2-oxazoline)s, polypeptoids, and polypeptides*. *Polymer Chemistry*, 2017. 8(1): p. 24-40.
137. Gaertner, F.C., et al., *Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s*. *Journal of Controlled Release*, 2007. 119(3): p. 291-300.
138. Woodle, M.C., C.M. Engbers, and S. Zalipsky, *New Amphipatic Polymer-Lipid Conjugates Forming Long-Circulating Reticuloendothelial System-Evading Liposomes*. *Bioconjugate Chemistry*, 1994. 5(6): p. 493-496.
139. Bauer, M., et al., *Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility*. *Macromolecular Bioscience*, 2012. 12(7): p. 986-998.
140. Bauer, M., et al., *In vitro hemocompatibility and cytotoxicity study of poly(2-methyl-2-oxazoline) for biomedical applications*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013. 51(8): p. 1816-1821.
141. Hoogenboom, R., *Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009. 48(43): p. 7978-7994.
142. Ulbricht, J., R. Jordan, and R. Luxenhofer, *On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s*. *Biomaterials*, 2014. 35(17): p. 4848-4861.
143. Van Kuringen, H.P.C., et al., *Partial Hydrolysis of Poly(2-ethyl-2-oxazoline) and Potential Implications for Biomedical Applications?* *Macromolecular Bioscience*, 2012. 12(8): p. 1114-1123.
144. Shah, R., et al., *In vitro study of partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazolines) as materials for biomedical applications*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2015. 26(4): p. 157.
145. Delage, B., et al., *Polyoxazoline associated with cardanol for bio-based linear alkyl benzene surfactants*. *Polymer International*, 2019. 68(4): p. 755-763.
146. Giardi, C., et al., *Nonionic polyoxazoline surfactants based on renewable source: Synthesis, surface and bulk properties*. *Reactive and Functional Polymers*, 2009. 69(9): p. 643-649.
147. Huang, H., et al., *Solvent-Induced Morphological Transition in Core–Cross-Linked Block Copolymer Micelles*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. 128(11): p. 3784-3788.
148. Hoogenboom, R., et al., *Synthesis, characterization, and cross-linking of a library of statistical copolymers based on 2-“soy alkyl”-2-oxazoline and 2-ethyl-2-oxazoline*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2007. 45(23): p. 5371-5379.
149. Del Rio, E., et al., *Poly-2-oxazoline-derived polyurethanes: A versatile synthetic approach to renewable polyurethane thermosets*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2011. 49(14): p. 3069-3079.
150. Kempe, K., R. Hoogenboom, and U.S. Schubert, *A Green Approach for the Synthesis and Thiol-ene Modification of Alkene Functionalized Poly(2-oxazoline)s*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2011. 32(18): p. 1484-1489.
151. El Asmar, A., et al., *Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach*. *Macromolecules*, 2016. 49(11): p. 4307-4315.
152. Volet, G., et al., *Synthesis of Monoalkyl End-Capped Poly(2-methyl-2-oxazoline) and Its Micelle Formation in Aqueous Solution*. *Macromolecules*, 2005. 38(12): p. 5190-5197.
153. Stemmelen, M., et al., *Synthesis and self-assembly of amphiphilic polymers based on polyoxazoline and vegetable oil derivatives*. *Polymer Chemistry*, 2013. 4(5): p. 1445-1458.
154. Travelet, C., et al., *Amphiphilic copolymers based on polyoxazoline and grape seed vegetable oil derivatives: Self-assemblies and dynamic light scattering*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2013. 15.
155. Waschinski, C.J. and J.C. Tiller, *Poly(oxazoline)s with Telechelic Antimicrobial Functions*. *Biomacromolecules*, 2005. 6(1): p. 235-243.

156. Einzmann, M. and W.H. Binder, *Novel functional initiators for oxazoline polymerization*. Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry, 2001. 39(16): p. 2821-2831.
157. Lüdtke, K., et al., *Lipopolymers from New 2-Substituted-2-Oxazolines for Artificial Cell Membrane Constructs*. Macromolecular bioscience, 2005. 5: p. 384-93.
158. Baekmark, T.R., et al., *Compression-Induced Formation of Surface Micelles in Monolayers of a Poly(2-oxazoline) Diblock Copolymer at the Air-Water Interface: A Combined Film Balance and Electron Microscopy Study*. Langmuir, 1998. 14(15): p. 4222-4226.
159. Kobayashi, S., et al., *Block copolymers from cyclic imino ethers: a new class of nonionic polymer surfactant*. Macromolecules, 1986. 19(3): p. 535-541.
160. Aoi, K. and M. Okada, *Polymerization of oxazolines*. Progress in Polymer Science, 1996. 21(1): p. 151-208.
161. Naka, K., et al., *Aggregation behavior and interaction with human serum albumin of 2-oxazoline block copolymers in aqueous solutions*. Macromolecular Chemistry and Physics, 1997. 198(1): p. 101-116.
162. Binder, W.H. and H. Gruber, *Block copolymers derived from photoreactive 2-oxazolines, 1. Synthesis and micellization behavior*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2000. 201(9): p. 949-957.
163. Obeid, R., F. Tanaka, and F. Winnik, *Heat-Induced Phase Transition and Crystallization of Hydrophobically End-Capped Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)s in Water*. Macromolecules, 2009. 42.
164. Volet, G., L. Auvray, and C. Amiel, *Monoalkyl Poly(2-methyl-2-oxazoline) Micelles. A Small-Angle Neutron Scattering Study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2009. 113(41): p. 13536-13544.
165. Lüdtke, K., et al., *Two-Dimensional Center-of-Mass Diffusion of Lipid-Tethered Poly(2-methyl-2-oxazoline) at the Air-Water Interface Studied at the Single Molecule Level*. Langmuir, 2008. 24(10): p. 5580-5584.
166. Luxenhofer, R., et al., *Doubly amphiphilic poly(2-oxazoline)s as high-capacity delivery systems for hydrophobic drugs*. Biomaterials, 2010. 31(18): p. 4972-4979.
167. Tokuyama, H. and Y. Kato, *Preparation of poly(N-isopropylacrylamide) emulsion gels and their drug release behaviors*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2008. 67(1): p. 92-98.
168. Nicolai, T., O. Colombani, and C. Chassenieux, *Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers*. Soft Matter, 2010. 6(14): p. 3111-3118.
169. Zalipsky, S., et al., *Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. 85(2): p. 133-137.
170. Xu, H., et al., *The Bifunctional Liposomes Constructed by Poly(2-ethyl-oxazoline)-cholesteryl Methyl Carbonate: an Effectual Approach to Enhance Liposomal Circulation Time, pH-Sensitivity and Endosomal Escape*. Pharmaceutical Research, 2014. 31(11): p. 3038-3050.
171. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2019. 570: p. 118516.
172. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based lipid nanocapsules for topical delivery of antioxidants*. International Journal of Pharmaceutics, 2020. 579: p. 119126.
173. Cheng, Z., et al., *Multifunctional Nanoparticles: Cost Versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities*. Science, 2012. 338(6109): p. 903.
174. Bonaccucina, G., et al., *Colloidal soft matter as drug delivery system*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. 98(1): p. 1-42.
175. Mishra, B., B.B. Patel, and S. Tiwari, *Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2010. 6(1): p. 9-24.
176. Veronese, F.M., *Peptide and protein PEGylation: a review of problems and solutions*. Biomaterials, 2001. 22(5): p. 405-417.
177. Torchilin, V.P., *Targeted polymeric micelles for delivery of poorly soluble drugs*. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2004. 61(19): p. 2549-2559.
178. Mo, R., et al., *Intracellular delivery and antitumor effects of pH-sensitive liposomes based on zwitterionic oligopeptide lipids*. Biomaterials, 2013. 34(11): p. 2773-2786.
179. Mishra, S., P. Webster, and M.E. Davis, *PEGylation significantly affects cellular uptake and intracellular trafficking of non-viral gene delivery particles*. European Journal of Cell Biology, 2004. 83(3): p. 97-111.
180. Chen, Y., et al., *Intein-mediated site-specific synthesis of tumor-targeting protein delivery system: Turning PEG dilemma into prodrug-like feature*. Biomaterials, 2017. 116: p. 57-68.
181. Wang, Z., et al., *The use of a tumor metastasis targeting peptide to deliver doxorubicin-containing liposomes to highly metastatic cancer*. Biomaterials, 2012. 33(33): p. 8451-8460.
182. Kierstead, P.H., et al., *The effect of polymer backbone chemistry on the induction of the accelerated blood clearance in polymer modified liposomes*. Journal of Controlled Release, 2015. 213: p. 1-9.
183. Pippa, N., et al., *DPPC/poly(2-methyl-2-oxazoline)-grad-poly(2-phenyl-2-oxazoline) chimeric nanostructures as potential drug nanocarriers*. Journal of Nanoparticle Research, 2013. 15(6): p. 1685.
184. Pippa, N., et al., *Studying the colloidal behavior of chimeric liposomes by cryo-TEM, micro-differential scanning calorimetry and high-resolution ultrasound spectroscopy*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2018. 555: p. 539-547.
185. Harris, J.M., et al., *Tuning drug release from polyoxazoline-drug conjugates*. European Polymer Journal, 2019. 120: p. 109241.

186. Roberts, M.S., et al., *Topical and cutaneous delivery using nanosystems*. Journal of Controlled Release, 2017. 247: p. 86-105.
187. Förtig, A., et al., *Solid-supported biomimetic membranes with tailored lipopolymer tethers*. Macromol. Symp., 2004. 210: p. 329-338.
188. Kanikkannan, N., et al., *Structure-activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery*. Current Medicinal Chemistry, 2000. 7(6): p. 593-608.
189. Williams, A.C. and B.W. Barry, *Penetration enhancers*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012. 64: p. 128-137.
190. Silva, M.C., et al., *Supercritical CO₂-Assisted Spray Drying of Strawberry-Like Gold-Coated Magnetite Nanocomposites in Chitosan Powders for Inhalation*. Materials (Basel, Switzerland), 2017. 10(1): p. 74.
191. Moustafine, R.I., A.S. Viktorova, and V.V. Khutoryanskiy, *Interpolymer complexes of carbopol® 971 and poly(2-ethyl-2-oxazoline): Physicochemical studies of complexation and formulations for oral drug delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2019. 558: p. 53-62.
192. de Jager, M., et al., *A Novel in Vitro Percutaneous Penetration Model: Evaluation of Barrier Properties with P-Aminobenzoic Acid and Two of Its Derivatives*. Pharmaceutical Research, 2006. 23(5): p. 951-960.
193. Ochalek, M., et al., *Characterization of lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and penetration*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. 81(1): p. 113-120.
194. Rolland, A., et al., *Effect of penetration enhancers on the phase transition of multilamellar liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine. A study by differential scanning calorimetry*. International Journal of Pharmaceutics, 1991. 76(3): p. 217-224.
195. Bonina, F., et al., *Partitioning and differential scanning calorimetry studies of N-alkyllactame ester dermal prodrugs of indomethacin*. International Journal of Pharmaceutics, 1994. 106: p. 115-123.
196. Wertz, P.W., et al., *Preparation of Liposomes from Stratum Corneum Lipids*. Journal of Investigative Dermatology, 1986. 87(5): p. 582-584.
197. Maghraby, G.M.M.E., M. Campbell, and B.C. Finnin, *Mechanisms of action of novel skin penetration enhancers: Phospholipid versus skin lipid liposomes*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. 305(1): p. 90-104.
198. Kim, C.-K., et al., *Effect of penetration enhancers (pyrrolidone derivatives) on multilamellar liposomes of stratum corneum lipid: a study by UV spectroscopy and differential scanning calorimetry*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. 95(1): p. 43-50.
199. Yoneto, K., et al., *Fluorescent Probe Studies of the Interactions of 1-Alkyl-2-Pyrrolidones with Stratum Corneum Lipid Liposomes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. 85(5): p. 511-517.
200. Sakdiset, P., H. Todo, and K. Sugibayashi, *Potential of Stratum Corneum Lipid Liposomes for Screening of Chemical Skin Penetration Enhancers*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2017. 65(8): p. 776-783.
201. Čuríková, B.A., et al., *Simplified stratum corneum model membranes for studying the effects of permeation enhancers*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. 534(1): p. 287-296.
202. Kansy, M., F. Senner, and K. Gubernator, *Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes*. J Med Chem, 1998. 41(7): p. 1007-10.
203. Sinkó, B., et al., *Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012. 45(5): p. 698-707.
204. Karadzovska, D. and J.E. Riviere, *Assessing vehicle effects on skin absorption using artificial membrane assays*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. 50(5): p. 569-576.
205. Flaten, G.E., et al., *Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: A novel approach for studying passive diffusion*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. 27(1): p. 80-90.
206. Engesland, A., et al., *New applications of phospholipid vesicle-based permeation assay: permeation model mimicking skin barrier*. J Pharm Sci, 2013. 102(5): p. 1588-600.
207. Engesland, A., N. Škalko-Basnet, and G.E. Flaten, *Phospholipid Vesicle-Based Permeation Assay and EpiSkin® in Assessment of Drug Therapies Destined for Skin Administration*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. 104(3): p. 1119-1127.
208. Engesland, A., et al., *New Applications of Phospholipid Vesicle-Based Permeation Assay: Permeation Model Mimicking Skin Barrier*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013. 102(5): p. 1588-1600.
209. Ng, S.F., et al., *The relevance of polymeric synthetic membranes in topical formulation assessment and drug diffusion study*. Arch Pharm Res, 2012. 35(4): p. 579-93.
210. Oliveira, G., et al., *Alcohol enhanced permeation in model membranes. Part II. Thermodynamic analysis of membrane partitioning*. International Journal of Pharmaceutics, 2011. 420(2): p. 216-222.
211. Miki, R., et al., *Development of a membrane impregnated with a poly(dimethylsiloxane)/poly(ethylene glycol) copolymer for a high-throughput screening of the permeability of drugs, cosmetics, and other chemicals across the human skin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. 66: p. 41-49.
212. Groeber, F., et al., *Skin tissue engineering — In vivo and in vitro applications*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. 63(4): p. 352-366.
213. Netzlaff, F., et al., *The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2005. 60(2): p. 167-178.
214. Flaten, G.E., et al., *In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. 75: p. 10-24.

215. Mathes, S.H., H. Ruffner, and U. Graf-Hausner, *The use of skin models in drug development*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2014. 69-70: p. 81-102.
216. Machado, A.C.H.R., et al., *Skin Penetration*. 2017. p. 741-755.
217. Zsikó, S., et al., *Methods to Evaluate Skin Penetration In Vitro*. Scientia Pharmaceutica, 2019. 87(3): p. 19.
218. Talbi, Y., *Conception d'un patch transdermique intelligent pour le monitoring et l'aide à la prise de médicament*. 2018.
219. Godin, B. and E. Touitou, *Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. 59(11): p. 1152-1161.
220. Manca, M.L., et al., *Development of novel diolein-niosomes for cutaneous delivery of tretinoin: Influence of formulation and in vitro assessment*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. 477(1): p. 176-186.
221. Junyaprasert, V.B., et al., *Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. 423(2): p. 303-311.
222. Dragicevic-Curic, N., et al., *Temoporfin-loaded invasomes: Development, characterization and in vitro skin penetration studies*. Journal of Controlled Release, 2008. 127(1): p. 59-69.
223. Dragicevic-Curic, N., et al., *Surface charged temoporfin-loaded flexible vesicles: In vitro skin penetration studies and stability*. International Journal of Pharmaceutics, 2010. 384(1): p. 100-108.
224. Elmoslemany, R.M., et al., *Propylene Glycol Liposomes as a Topical Delivery System for Miconazole Nitrate: Comparison with Conventional Liposomes*. AAPS PharmSciTech, 2012. 13(2): p. 723-731.
225. Clares, B., et al., *Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. 473(1): p. 591-598.
226. Sahle, F.F., J. Wohlrab, and R.H.H. Neubert, *Controlled penetration of ceramides into and across the stratum corneum using various types of microemulsions and formulation associated toxicity studies*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2014. 86(2): p. 244-250.
227. Cal, K., *How does the type of vehicle influence the in vitro skin absorption and elimination kinetics of terpenes?* Archives of Dermatological Research, 2006. 297(7): p. 311-315.
228. Nnamani, P.O., et al., *Development of artemether-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for topical application*. International Journal of Pharmaceutics, 2014. 477(1): p. 208-217.
229. Bragagni, M., et al., *Comparative study of liposomes, transfersomes and ethosomes as carriers for improving topical delivery of celecoxib*. Drug Delivery, 2012. 19(7): p. 354-361.
230. Lademann, J., et al., *In vivo methods for the analysis of the penetration of topically applied substances in and through the skin barrier*. Int J Cosmet Sci, 2012. 34(6): p. 551-9.
231. Sanchez, W.Y., et al., *Fluorescence Lifetime Imaging of the Skin*, in *Advanced Time-Correlated Single Photon Counting Applications*, W. Becker, Editor. 2015, Springer International Publishing: Cham. p. 457-508.
232. Roberts, M.S., et al., *Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. 77(3): p. 469-488.
233. Touti, R., et al., *What is the fate of multi-lamellar liposomes of controlled size, charge and elasticity in artificial and animal skin?* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2020. 151: p. 18-31.

Chapitre 2 : Synthèses et propriétés des polyoxazolines amphiphiles

Nous avons présenté les polyoxazolines (POx) au cours du chapitre 1 (partie IV.2) et discuté de l'intérêt des LipoPOx pour le développement de nouvelles nanoformulations pour la voie topique (partie III.2). Nous allons maintenant nous intéresser à **la synthèse et la caractérisation des POx** étudiés au cours de ces travaux de recherche. Il est à noter que les POx synthétisés sont des LipoPOx mais pour simplifier la lecture et homogénéiser le texte par rapport aux articles déjà publiés, nous les appellerons ici POx. Il s'agit bien de **polymères amphiphiles constitués d'une chaîne alkyle lipidique et d'une chaîne hydrophile POx**.

L'objectif est de synthétiser des POx amphiphiles de structure et de propriétés différentes pour évaluer **leurs capacités tensioactives et de pénétration cutanée**. Pour cela, nous avons modulé leur balance hydrophile/hydrophobe en jouant sur la chaîne alkyle hydrophobe et sur le degré de polymérisation moyen en nombre (DP_n) du POx hydrophile. Grâce à ces modifications structurales, nous souhaitons induire des comportements à l'interface air/eau variés et favoriser des interactions avec les couches lipidiques de la peau pour améliorer la pénétration cutanée des nanoformulations. Nous avons conçu des architectures macromoléculaires variées avec une chaîne alkyle saturée et insaturée, ramifiée provenant de l'huile de lin et à chaque fois avec deux DP_n POx différents. La Figure 25 résume l'objectif de ce chapitre : synthétiser des POx capables de pénétrer les couches lipidiques en partie grâce à une chaîne alkyle provenant de l'huile de lin.

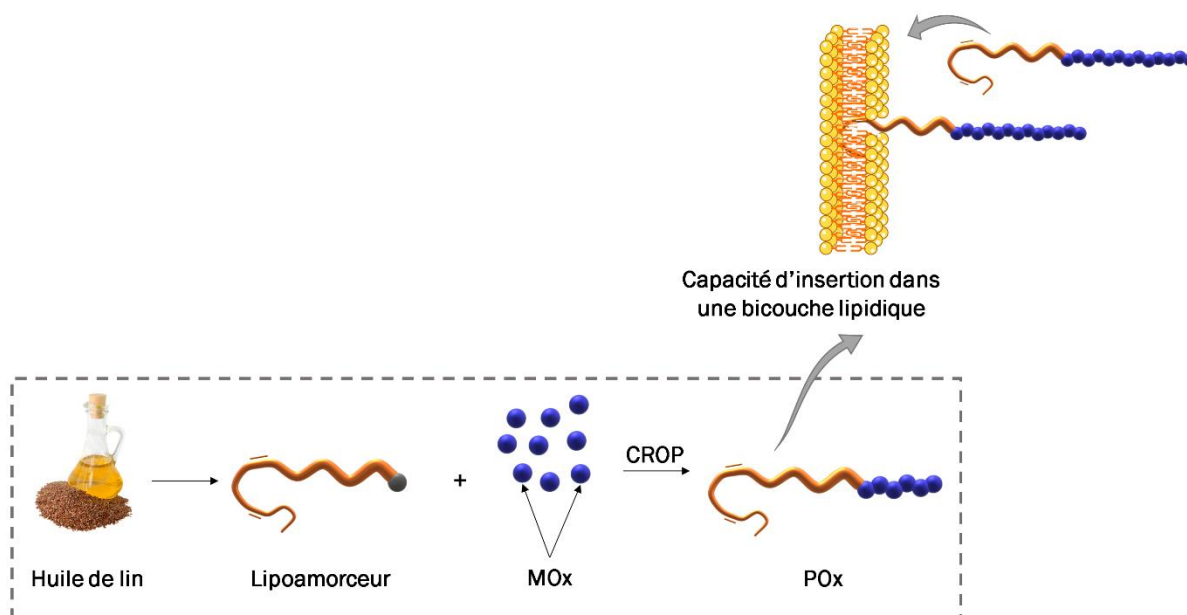


Figure 25 : Stratégie d'élaboration des POx

Le choix de ces structures est justifié par le fait que les chaînes alkyle saturées de C12 à C16 et les chaînes alkyle insaturées de C18 à C22 possèdent les meilleures capacités de pénétration au travers de la peau [1]. Nous avons également choisi de développer un POx ramifié pour évaluer l'impact des ramifications sur le comportement à l'interface air/eau et pour diversifier les propriétés avec un POx possédant un caractère hydrophobe plus important. Une des possibilités serait de diminuer l'apport

hydrophile en limitant le DP_n , cependant il est difficile d'isoler par précipitation des courtes chaînes POx (DP_n inférieur à 8). Nous avons donc augmenté la chaîne alkyle par l'ajout de ramifications par une réaction thiol-ène sur les doubles liaisons. De plus, l'incorporation de groupements thioéther permet d'ajouter une propriété supplémentaire à notre structure car ces groupements sont connus pour avoir une capacité dite « *ROS responsive* », en neutralisant les radicaux libres par réaction d'oxydation en sulfone (cf chapitre 1, partie II.1). Les structures ramifiées ajoutent donc une activité anti-radicalaire intéressante. Cette structure ramifiée a suscité l'intérêt de la SATT AxLR (AAP *proof of concept* ROS-Peau-POx) qui soutient financièrement son développement scientifique. Concernant le monomère, nous avons choisi d'utiliser la 2-méthyl-2-oxazoline (MOx) pour son hydrophilie et sa grande solubilité aqueuse. Les trois architectures des POx synthétisés sont représentées et schématisées sur la Figure 26.

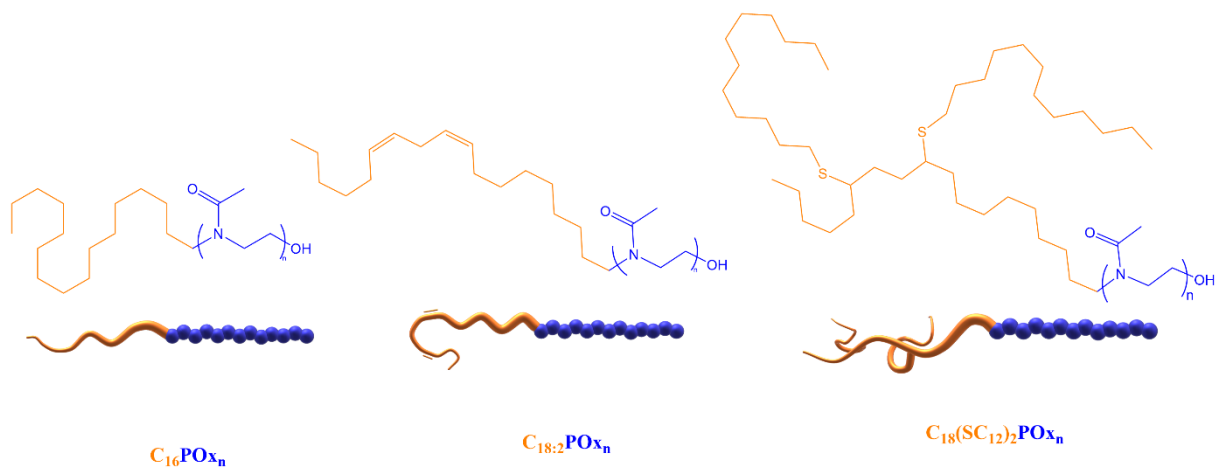


Figure 26 : Architectures des POx amphiphiles synthétisés $C_{16}POx_n$, $C_{18:2}POx_n$, $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$

Pour mener à bien ce projet, nous avons travaillé sur des synthèses de POx rapides et efficaces avec des étapes de purification simples permettant d'avoir accès rapidement aux POx pour commencer la caractérisation et le travail de formulation. Nous nous sommes basés sur des synthèses connues ou maîtrisées par l'équipe IAM.

Nous aborderons dans un premier temps la partie bibliographique puis dans un second temps la synthèse des amorceurs, enfin la polymérisation des différents POx, leurs caractérisations physico-chimiques et les évaluations de la viabilité cellulaire.

I. Bibliographie

I.1 Généralités sur la polymérisation des oxazolines

Découverte en 1966 et très étudiée jusque dans les années 70, cette famille de polymères est ensuite oubliée à cause d'un temps de polymérisation considéré trop long. En 2005, l'équipe de Schubert pallie ce problème en utilisant un procédé micro-ondes accélérant considérablement ce type de polymérisation – passant de quelques heures à quelques dizaines de secondes [2]. Les POx sont obtenus par un procédé de polymérisation cationique par ouverture de cycle soit « *cationic ring-opening polymerization* » (CROP). La polymérisation s'opère par ouverture du cycle monomère 2-R-2-oxazoline : hétérocycle insaturé à 5 atomes avec un atome d'oxygène et un atome d'azote en position β l'un de l'autre. Le groupement R représente des chaînes alkyle ou des groupements aromatique. La

polymérisation est amorcée par un amorceur Am-X et terminée par l'agent de terminaison At-H comme représentée sur la Figure 27.

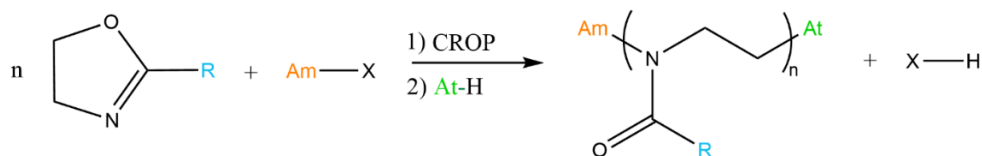


Figure 27 : Bilan de la synthèse par CROP de POx (Am : amorceur et At : agent de terminaison)

Le **mécanisme** de polymérisation peut être **ionique ou covalent** selon la nucléophilie du contre-ion de l'amorceur (X⁻) par rapport au monomère et cationique car l'espèce propageante est un cation. L'atome X doit être un bon groupe partant allant des dérivés halogénés de type chlorure (Cl⁻), bromure (Br⁻) et iodure (I⁻), aux groupements tosylate (TsO⁻), mésylate (MsO⁻) et triflate (TfO⁻)[3]. Le Tableau 4 illustre la nature du mécanisme mis en jeu en fonction de la nucléophilie du contre-ion X et du monomère avec nos choix expérimentaux surlignés en bleu. Parmi tous les amorceurs utilisés au cours de ces travaux, le monomère MOx étant plus nucléophile que le contre-ion de l'amorceur, le **mécanisme** de polymérisation est exclusivement ionique.

Tableau 4 : Mécanismes de polymérisation CROP en fonction du monomère et contre-ion [3], [4]

Monomères	Contre ions, X ⁻ nucléophilie					
	Cl	Br	I	TsO	MsO	TfO
	covalent	ionique	ionique	ionique	ionique	ionique
	covalent	covalent et ionique	covalent et ionique	ionique	ionique	ionique
	covalent	covalent	covalent et ionique	ionique	ionique	ionique
	-	covalent	covalent et ionique	ionique	ionique	ionique
	-	-	covalent	covalent	ionique	ionique

La Figure 28 décrit les trois étapes du mécanisme de polymérisation : amorçage, propagation et terminaison dans le cas du monomère MOx. Lors de l'étape d'amorçage, le doublet non-liant de l'atome d'azote du monomère attaque l'amorceur pour former l'espèce active, un sel d'oxazolinium. Cette attaque nucléophile est possible car X est un groupement faiblement nucléophile et un bon groupe partant et Am un groupement électrophile. La propagation est assurée par les attaques nucléophiles successives des MOx sur le sel d'oxazolinium qui par clivage de la liaison C-O provoque l'ouverture du cycle et l'addition de nouvelles unités répétitives. Après l'ajout des MOx par ce processus, une succession de motifs acyléthylèneimine est obtenue avec un groupement terminal oxazolinium. Cette propagation a lieu car le monomère est plus nucléophile que le contre-ion X⁻. Enfin, la polymérisation est terminée par l'attaque nucléophile de l'agent de terminaison sur l'oxazolinium

terminal provoquant l'ouverture du cycle en extrémité de chaîne en croissance et l'addition de l'agent de terminaison At sur la chaîne.

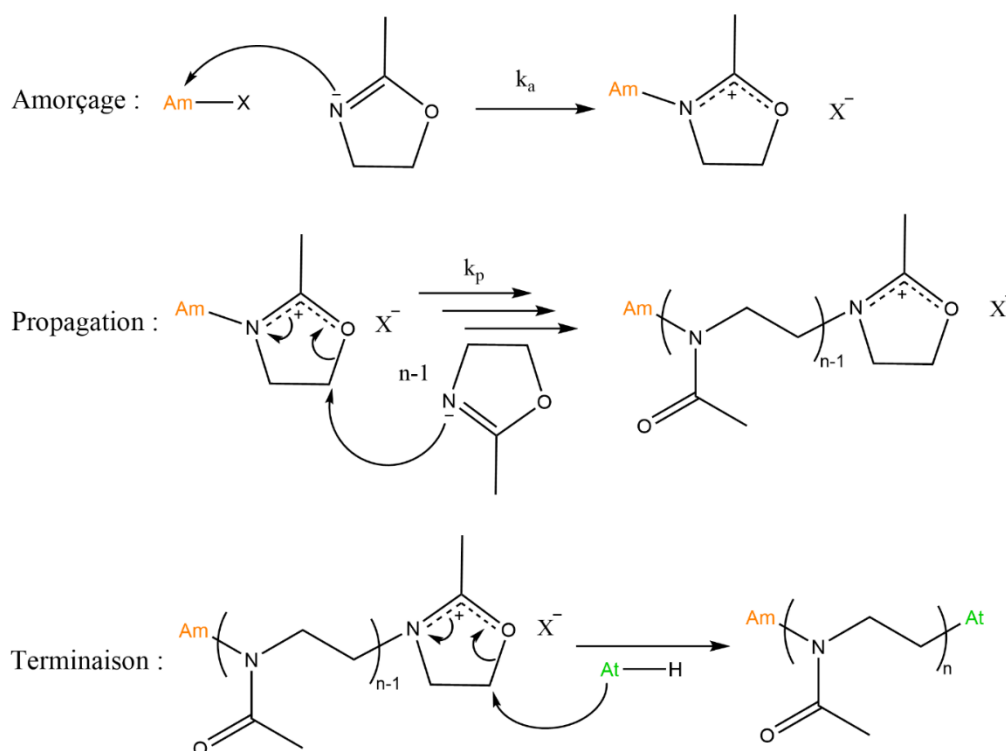


Figure 28 : Mécanisme ionique de la CROP dans le cas de la MOx

Cette **polymérisation CROP est vivante/contrôlée** c'est-à-dire qu'elle se déroule sans réaction parasite de transfert ni de terminaison. Cela signifie donc que i) l'amorçage est plus rapide que la propagation ($k_a \gg k_p$) afin que toutes les chaînes de polymère soient amorcées au même instant, ii) la vitesse de dépropagation est plus lente que celle de la propagation et iii) le système est en milieu homogène c'est-à-dire totalement solubilisé. Pour être dans ces conditions et éviter les réactions de transfert, il faut maîtriser plusieurs paramètres essentiels : la concentration en espèces actives, la température et la nature du solvant de la réaction [3]. En respectant ces critères, des polymères parfaitement définis avec des indices de polymolécularité faibles et des masses molaires expérimentales proches de celles visées théoriquement et prédéfinies sont obtenues. En effet, il est possible de pré-programmer des longueurs de POx en jouant sur le ratio monomère/amorceur (comme expliqué dans le chapitre 1 partie IV.3). Plus spécifiquement, le contrôle des masses molaires est lié au rapport des constantes de vitesse de l'étape de propagation et d'amorçage ($k_a \gg k_p$). Des études précédentes ont montré qu'en fonction des amorceurs utilisés, le contrôle des masses molaires sera plus ou moins bon : R-I permet un contrôle relatif, ROTs et ROTf entraîne la perte du contrôle [3] et ROMs est moins étudié mais engendre un assez bon contrôle [5].

Enfin, un des avantages de la chimie des POx est sa polyvalence de **fonctionnalisation**. Des fonctions peuvent être introduites soit en position α par l'intermédiaire d'un **amorceur** fonctionnalisé (voie amorceur) soit en position ω par l'intermédiaire d'un agent de **terminaison** fonctionnalisé (voie terminaison) [6] comme représenté Figure 29. Ces multiples sites de fonctionnalisation font des POx une plateforme versatile. Les deux stratégies présentent des avantages et des inconvénients. Dans le cas de l'amorçage, le groupe fonctionnel est présent sur toutes les chaînes polymères mais l'amorçage peut être partiel et lent occasionnant un faible contrôle des masses molaires. Au contraire, par l'agent

de terminaison, le contrôle des masses molaires est assuré (sous réserve d'un bon choix d'amorceur) mais la terminaison peut être partielle si la réactivité de l'agent de terminaison est trop lente entraînant un mélange de chaînes non terminées et fonctionnalisées.

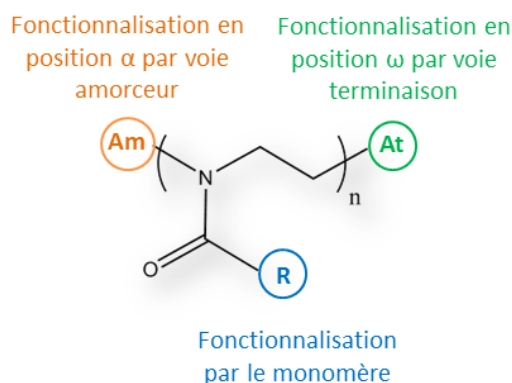


Figure 29 : Représentation des sites de fonctionnalisation sur les POx

La fonctionnalisation des POx peut également venir des **monomères** eux-mêmes. Plusieurs variantes de groupement R existent allant des chaînes alkyle (linéaires, ramifiées) à des groupements aromatique ou bien encore à des chaînes porteuses de groupements fonctionnels qui nécessitent souvent une protection pour éviter des réactions secondaires pendant la polymérisation. Ces fonctionnalisations induisent une modulation des propriétés physiques du polymère (solubilité, cristallinité, LCST...) [7]. Une fonctionnalisation du groupement R particulièrement intéressante consiste à substituer le cycle oxazoline par une chaîne lipidique pendante comme vu dans la revue sur les LipoPOx (chapitre 1 partie IV.3).

I.2 Propriétés des POx amphiphiles

Les **tensioactifs** (TA) ou surfactifs, appelés « *surfactants* » en anglais (de l'abréviation de « *surface active agents* »), ont une structure amphiphile qui leur permet de s'adsorber aux interfaces et d'abaisser les tensions interfaciales. Ils sont composés d'une partie hydrophobe souvent des chaînes hydrocarbonées aliphatique ou aromatique et d'une partie hydrophile constituée de groupements polaires, ioniques ou non ioniques. Il existe des TA de nature cationique, anionique, zwitterionique et non ionique. Les TA non ioniques sont des produits de synthèse, le plus souvent polyfonctionnels tels que les polyéthers. Leur partie hydrophobe est issue de la pétrochimie ou d'huiles végétales générant des mélanges de chaînes alkyle linéaires de C8 à C18 pouvant posséder des ramifications ; la majeure partie des TA commerciaux ont une chaîne alkyle linéaire dont la longueur est comprise entre C10 et C16 [8]. Dans le cadre des tensioactifs macromoléculaires, il en existe deux types : les copolymères amphiphiles composés d'un bloc polymère hydrophobe et d'un bloc polymère hydrophile et les polymères amphiphiles constitués d'une chaîne alkyle hydrophobe et d'un bloc polymère hydrophile.

Dans la littérature, de nombreux **copolymères amphiphiles POx** ont été décrits avec, par exemple, un bloc hydrophobe de type polycaprolactone [9], polyacrylate [10] ou poly(acide L-lactique) [11]. Cependant, l'objectif ici n'est pas de faire un bilan exhaustif de l'ensemble de POx amphiphiles (copolymères et polymères). Dans la revue LipoPOx (partie 2.3) du chapitre 1 (partie IV.3), nous avons développé le cas des polymères POx amphiphiles associant une chaîne lipidique à un bloc POx

hydrophile. Dans notre étude, nous avons uniquement travaillé sur les **polymères amphiphiles** non ioniques à base de POx.

La différence d'affinité entre les deux parties des POx amphiphiles leur confère une capacité d'**auto-association** dans l'eau et d'adsorption aux interfaces diminuant la tension superficielle de l'eau. D'ordre général et également dans le cas des POx amphiphiles, le TA cherche à réduire son énergie libre, il forme des agrégats pour maximiser les interactions hydrophobes et favoriser la solvation de la partie hydrophile. Ce phénomène peut aussi être expliqué par les interactions attractives (interactions de Van Der Waals et forces de Debye) entre les parties hydrophobes. Ce processus d'agrégation dans l'eau est réversible conférant ainsi aux TA un aspect dynamique.

Les POx en solution aqueuse s'adsorbent préférentiellement à l'interface eau/air. A partir d'une certaine concentration l'interface est saturée, et ils s'auto-associent en solution formant des agrégats avec un cœur hydrophobe pouvant être des micelles. La concentration à partir de laquelle le POx s'auto-associe est appelée concentration micellaire critique (CMC) ou concentration d'agrégation critique (CAC).

Comme représentée Figure 30, la mesure de **CMC** peut être réalisée selon plusieurs techniques telles que la tensiométrie (lame de Wilhelmy ou anneau de du Noüy), la diffusion de lumière ou la spectrofluorimétrie en présence d'une sonde fluorescente comme le pyrène. Dans le cas de la tensiométrie, l'immersion de la lame Wilhelmy permet de mesurer la force capillaire exercée par le liquide sur la lame et donc celle à l'interface air-liquide (protocole chapitre Matériels et Méthodes).

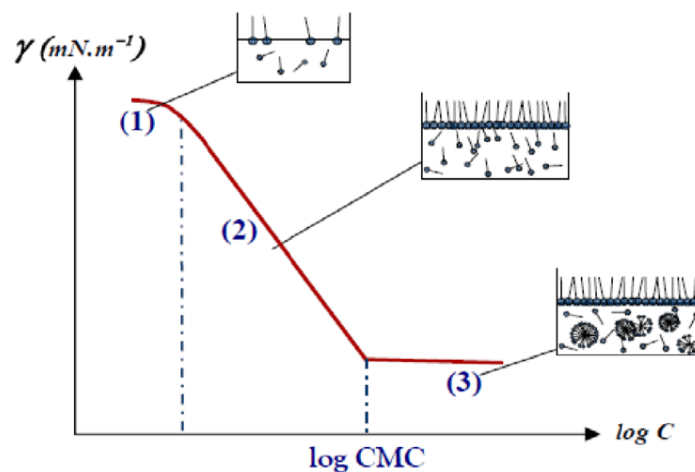


Figure 30 : Détermination de la CMC d'un TA par tensiométrie (la tension de surface en fonction de la concentration), extrait de [12]

La méthode par spectrofluorimétrie repose sur une différence entre les propriétés photophysiques du pyrène solubilisé dans l'eau et dans un milieu hydrophobe (cœur de la micelle). En dessous de la CMC, cette sonde fluorescence est dans l'eau alors qu'au-dessus de cette concentration elle s'insère dans le cœur hydrophobe des micelles de TA. Ce changement d'environnement se reflète par une chute du rapport d'intensité des bandes vibroniques donnant ainsi la valeur de CMC. Cependant, pour les POx et les polymères en général, il a été démontré que cette technique est peu fiable et peut être facilement faussée par les conditions de mesure [13].

I.3 Le cas des tensioactifs ramifiés

L'efficacité des tensioactifs (effectivité) se mesure à leur capacité à diminuer la tension de surface de la solution qui est maximale dans le cas des **tensioactifs** dits « **super efficaces** » qui sont des TA fluorés ou siliconés pour lesquels la tension de surface passe de 72 à 25-20 mN/m. Cependant, ces deux types de TA ont chacun leur limite : fort impact sur la viabilité cellulaire pour l'un et chimie spécifique pour l'autre. Il serait intéressant d'atteindre de telles valeurs avec des TA hydrocarbonés à tête hydrophobe hyper-encombrée comme, développé par Eastoe [14], qui ont permis d'atteindre des tensions de surface de l'ordre de 20 mN/m.

Nous avons ainsi souhaité développer des TA super efficaces porteurs de chaînes hydrophobes encombrées par des chaînes ramifiées de dérivés lipidiques. Une voie consiste à utiliser les doubles liaisons des chaînes lipidiques pour introduire les ramifications souhaitées. La réaction de prédilection est la **réaction thiol-ène** (TEC pour « *thiol-ene click* »), représentée Figure 31, qui est d'autant plus pertinente que l'addition se fait par un atome de soufre qui a un caractère hydrophobe prononcé contrairement aux autres hétéroatomes. En utilisant des dérivés thiol linéaires ou eux-mêmes ramifiés, des chaînes fortement ramifiées peuvent ainsi être facilement synthétisées. La réaction TEC a déjà largement été étudiée pour la modification des huiles végétales et leurs dérivés lipidiques. En effet, des dérivés thiol fonctionnalisés par des groupements alcool (mercaptoéthanol) ont permis d'élaborer des polyols, précurseurs de polyuréthanes linéaires [15] ou réticulés [16]. Des groupements amines (cystéamine) ont également déjà été greffés par TEC sur des chaînes lipidiques pour élaborer des durcisseurs amine pour élaborer des résines époxy [17] [18].

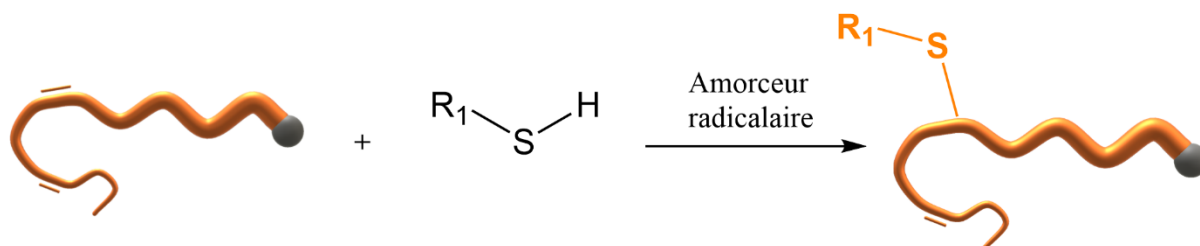


Figure 31 : Exemple de réaction TEC

A partir de ces différentes observations, nous avons envisagé de synthétiser des POx amphiphiles dont la partie hydrophobe lipidique est ramifiée par des groupements thiol encombrants (Figure 32) dans le but d'induire un comportement original à l'interface air/eau et lors de la pénétration cutanée.

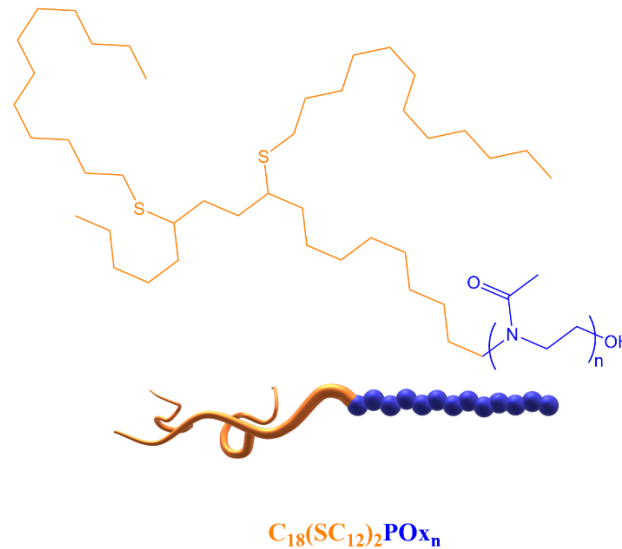


Figure 32 : POx amphiphile ramifié

II. Synthèse d'amorceurs lipidiques

Pour élaborer les POx amphiphiles, trois d'amorceurs différents ont été utilisés (Figure 33). La synthèse de POx saturés a été effectuée à partir d'un **amorceur linéaire saturé** commercial de type R-I ($C_{16}I$) comme cela a déjà été décrit par Volet et al. [19]. Les autres types de POx ont été synthétisés à partir d'huiles végétales : l'huile de lin obtenue à partir des graines mûres du lin par pression à froid ou à chaud. Riche en triglycérides composés d'acides gras de type linoléique ($C_{18:3}$) et linoléique ($C_{18:2}$), l'huile de lin est l'une des huiles présentant le plus d'insaturations [20]. L'huile de lin est d'abord modifiée en alcools gras insaturés puis convertie en mésylate ($C_{18:2}OMs$) facilement purifiable (**amorceur linéaire insaturé**) et en tosylate ($C_{18}(SC_{12})_2OTs$) (**amorceur ramifié saturé**).

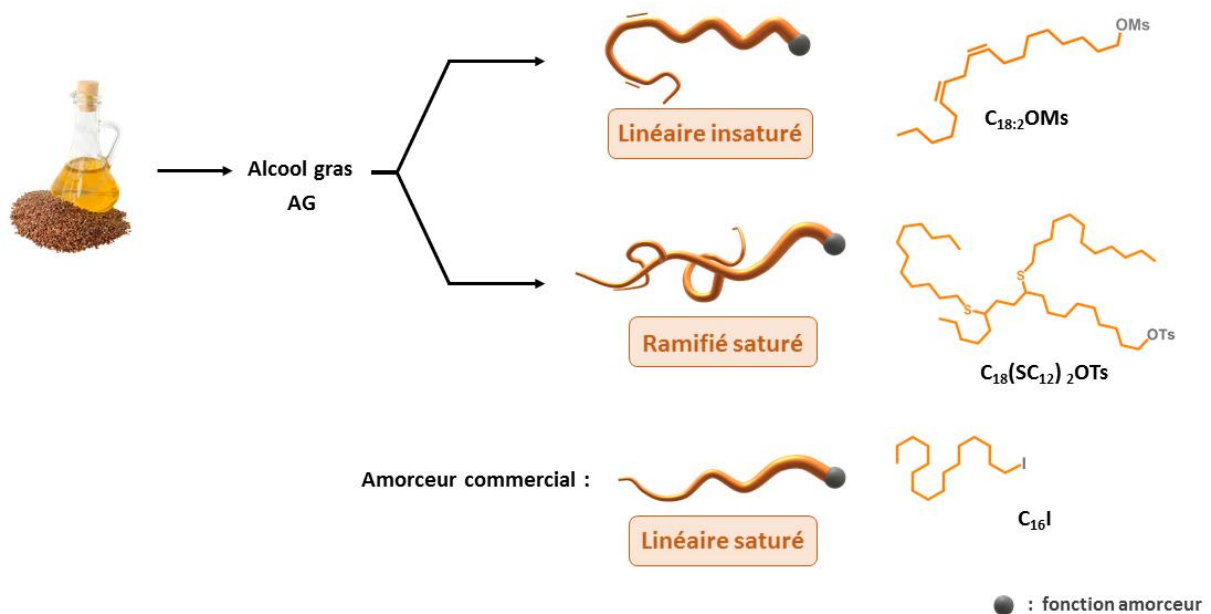


Figure 33 : Structure chimique des amorceurs lipidiques

Alors que l'amorceur linéaire saturé $C_{16}I$ est d'origine commerciale, $C_{18:2}OMs$ a été obtenu en deux étapes (Figure 34). La première étape consiste à hydrolyser le triglycéride (structure de l'huile de lin) en acides gras suivi de leur réduction en alcools gras (AG). La deuxième étape est la méthylation de AG. Une étude menée au laboratoire (IAM, ICGM) lors d'une thèse précédente a démontré que les amorceurs de type mésylate présentent une bonne réactivité, des étapes de purification simples et efficaces. Les amorceurs de type tosylate sont certes plus efficaces mais leur synthèse est plus complexe [21], [5]. La synthèse de $C_{18}(SC_{12})_2OTs$ nécessite une étape supplémentaire qui est la ramification de l'alcool gras AG par TEC en présence de dodécane-thiol et finalement la tosylation.

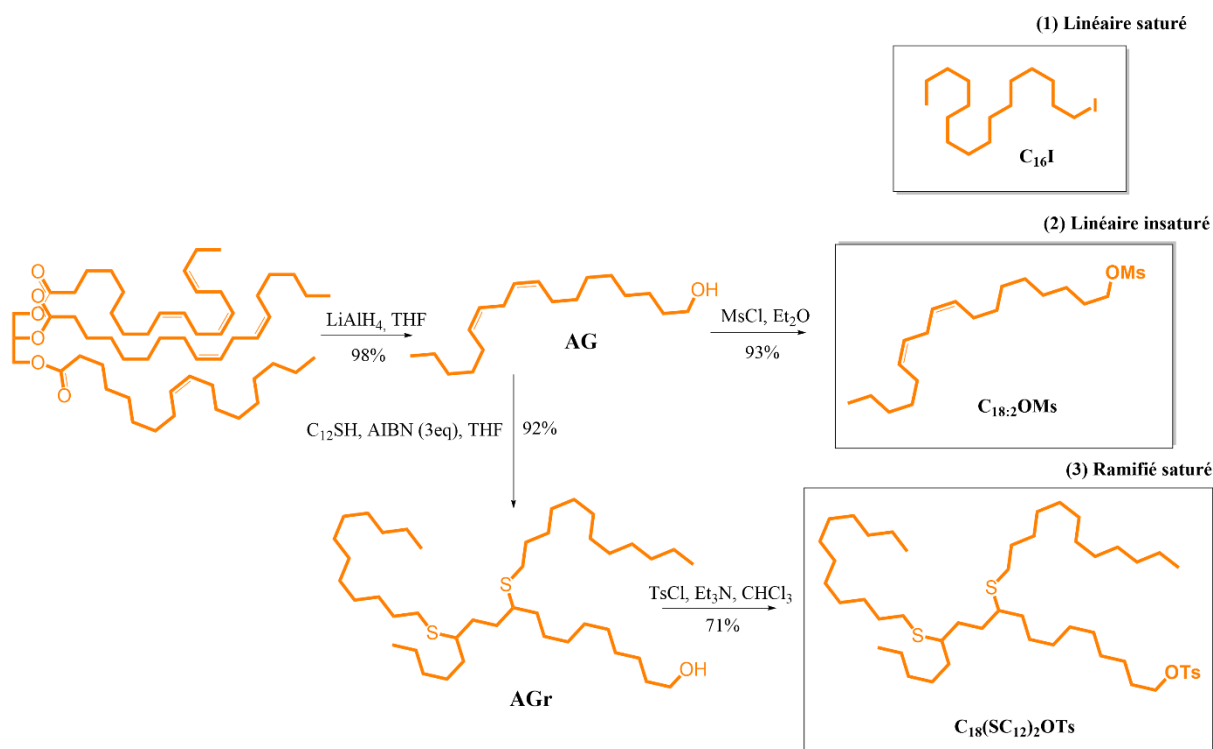
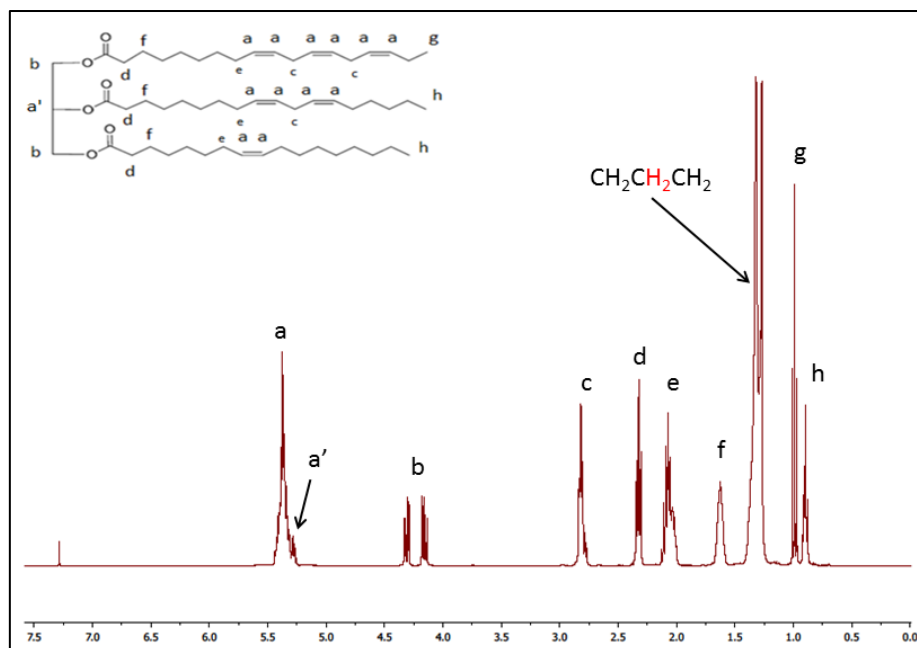


Figure 34 : Synthèse des amorceurs lipidiques

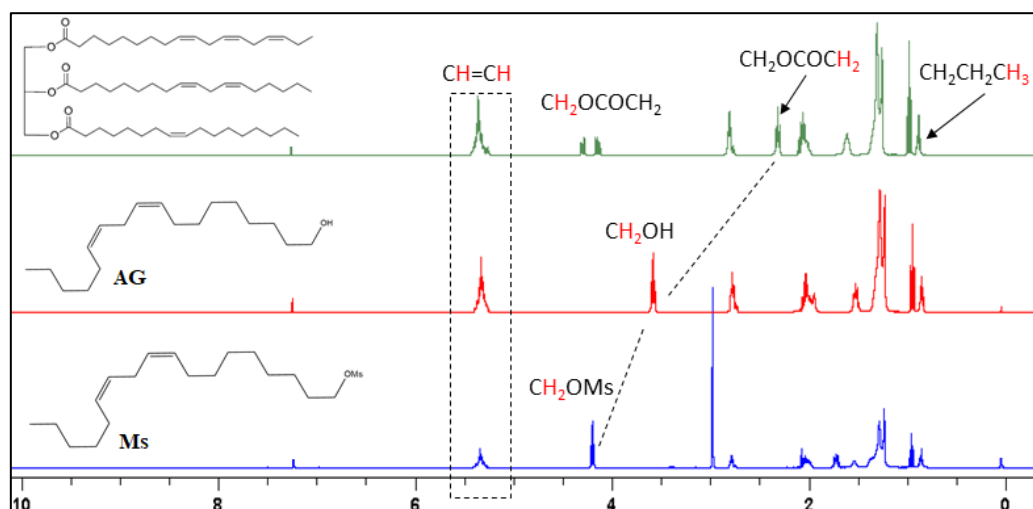
L'**huile de lin** est une huile végétale riche en insaturations [20] dont le nombre peut être déterminé par spectroscopie RMN 1H (Figure 35). On note la structure triglycéride de l'huile par la présence du proton H_a' à 5,3 ppm. L'ensemble des protons éthyléniques H_a correspondant aux insaturations sont localisés à 5,4 ppm. La difficulté est de dissocier la contribution des protons H_a provenant des chaînes oléiques, linoléiques et linoléiques. Cela est rendu possible par la différenciation des chaînes linoléiques qui ont des protons H_g situés à 1 ppm de celles des oléiques et linoléiques ayant un signal H_h à 0,9 ppm. On s'appuie aussi sur les protons H_c situés à 2,75 ppm présents sur les chaînes linoléiques et linoléiques. Le détail du calcul présenté en partie expérimentale (Chapitre Matériels et Méthodes partie I.2) a permis de déterminer la composition en acides gras suivante : linoléique 54% ($C_{18:3}$), linoléique 15% ($C_{18:2}$), oléique 21% ($C_{18:1}$), saturé 10% ($C_{18:0}$) soit une moyenne de 2,1 insaturations par chaîne lipidique.


 Figure 35 : Spectre RMN ^1H de l'huile de lin (CDCl_3)

II.1 Amorceur lipidique linéaire : $\text{C}_{18:2}\text{OMs}$

L'étape commune à la synthèse des amorceurs $\text{C}_{18:2}\text{OMs}$ et $\text{C}_{18}(\text{SC}_{12})_2\text{OTs}$ est la **réduction de l'huile de lin** en alcools gras (AG) qui a été réalisée avec un rendement de 98% en présence d'hydrures AlLiH_4 . On note sur la Figure 36 la conservation des insaturations au regard des protons à 5,4 ppm et la disparition de la structure triglycéride avec la disparition des signaux des protons $\text{H}_{a'}$ à 5,3 ppm et H_d à 2,3ppm. De plus, on observe l'apparition du signal à 3,6 ppm correspondant au $-\text{CH}_2-\text{OH}$.

Concernant plus spécifiquement le $\text{C}_{18:2}\text{OMs}$, l'amorceur est obtenu par **mésylation** d'AG en présence de chlorure de mésyle avec un rendement de 93%. Cette modification est aisément observée par spectroscopie RMN ^1H par le suivi des signaux CH_2OH associés à la fonction alcool situés à 3,6 ppm convertis en CH_2OMs de la fonction mésylate situés à 4,2 ppm (Figure 36).


 Figure 36 : Superposition des spectres RMN ^1H de l'huile de lin (vert), AG (rouge) et $\text{C}_{18:2}\text{OMs}$ (bleu) (CDCl_3)

II.2 Amorceur lipidique ramifié : C₁₈(SC₁₂)₂OTs

La ramification de la chaîne grasse a été réalisée par réaction TEC qui consiste en l'addition d'un groupement thiol sur une double liaison lipidique dans des conditions radicalaires en présence d'AIBN ou de DMAP comme vu dans la partie I.3. Des études mécanistiques ont montré l'importance d'un excès de thiol par rapport à l'insaturation ($n_{\text{RSH}} / n_{\text{C=C}} = 3$) afin de compenser la consommation des thiols lors de réactions secondaires comme le couplage disulfure ou l'oligomérisation comme cela a été mis en évidence avec d'autres dérivés lipidiques [18].

La **première stratégie** de ramification consiste à ajouter le dodécane-thiol sur les C_{18:2}POx déjà synthétisés. Cela a été entrepris par voie thermique (AIBN) et voie photochimique (DMAP). Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau 5. Par voie thermique (80 °C), seulement 45% des insaturations ont été converties. Pour améliorer ce taux, des ajouts successifs d'AIBN ont été réalisés pour finalement atteindre un plafond de 67%. La voie UV n'a pas permis d'améliorer cette conversion. Ce faible taux TEC signifie que nous sommes en présence d'un mélange de chaînes linéaires mono- et disubstituées qu'il sera difficile de séparer par la suite.

Tableau 5 : Réaction thiol-ène sur C_{18:2}POx par voie thermique et photochimique

Amorceur	$n_{\text{amorceur}} / n_{\text{C=C}}$	Procédé	Conversion (%)
AIBN	0,1	Δ	45
AIBN	0,1 + 0,1 ^{a)}	Δ	45
AIBN	0,2	Δ	54
AIBN	0,2+0,2 ^{a)}	Δ	67
DMAP ^{b)}	0,3	UV (365 nm)	58

a) Ajout successifs, b) 8h de réaction au lieu de 4h pour les essais en condition thermique.

Face à ce problème, **une deuxième stratégie** a été mise en place. AGr le précurseur ramifié correspondant à C₁₈(SC₁₂)₂OTH a été synthétisé par TEC thermique de **dodécane-thiol sur AG** en présence d'AIBN. Plusieurs ajouts successifs d'AIBN (3 à 4 ajouts) ont été nécessaires pour atteindre une conversion totale des doubles liaisons en groupements thioéther. Le suivi de la réaction a été possible par spectroscopie RMN ¹H avec la disparition du signal situé à 5,4 ppm correspondant aux protons éthyléniques et à l'apparition du signal à 2,5 ppm correspondant aux protons -CHS-R (Figure 37). Le taux de conversion est de 100 % avec une disparition totale des insaturations (signal à 5,4 ppm) mais le taux de ramification des thiols obtenu est en réalité de 92 % (signal des CH₃ terminaux à 0,8 ppm).

La dernière étape pour obtenir C₁₈(SC₁₂)₂OTs est la **tosylation d'AGr**. Différentes conditions ont été testées : la nature du solvant (THF, chloroforme) et de la base (triéthylamine, pyridine), la concentration en réactif (0,5 ou 1 M), le nombre d'équivalents en TsCl (1,2 ou 1,5) et de base (1,5 et 2) et enfin la méthode de purification (recristallisation, colonne flash, colonne sur silice). L'objectif était de trouver le meilleur compromis entre un bon taux de conversion et une séparation efficace des sous-

produits. Ainsi, les conditions optimales correspondantes à un taux de conversion quantitatif et un rendement de 71% sont les suivantes : le chloroforme anhydre à une concentration en réactif de 1 M avec la triéthylamine à 2 équivalents et TsCl à 1,5 équivalent et en purifiant par colonne sous vide. Le suivi RMN a permis de suivre la conversion CH_2OH en CH_2OTs avec la disparition du signal à 3,5 ppm et l'apparition des signaux à 7,8, 7,3 ppm et 4,0 ppm (Figure 37).

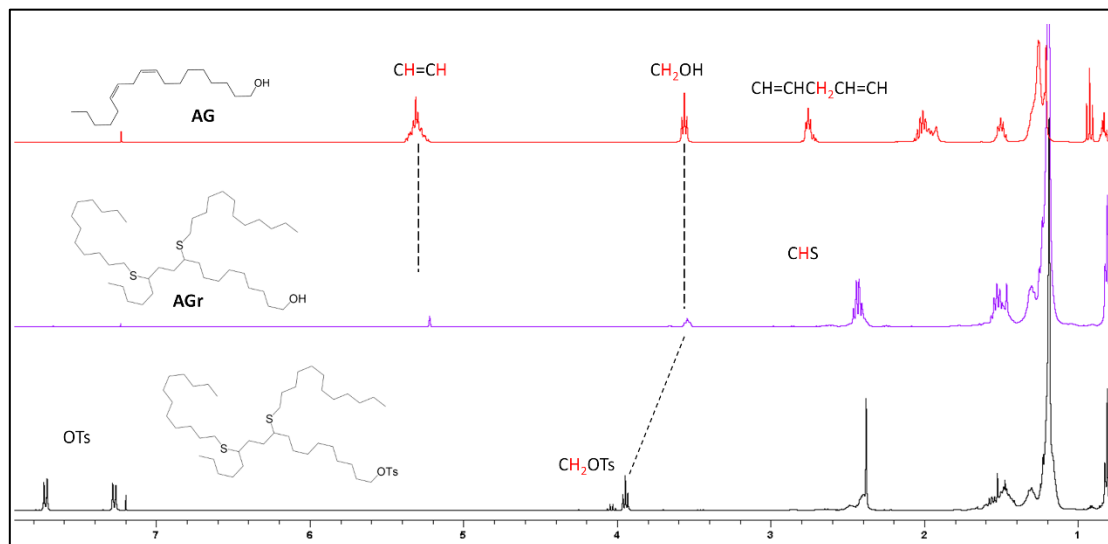


Figure 37 : Superposition des spectres RMN ¹H (CDCl₃) de AG (rouge), AGr (violet) et C₁₈(SC₁₂)₂OTs (noir)

III. Synthèse par polymérisation CROP de POx amphiphiles

Des POx amphiphiles ont été élaborés par polymérisation de type CROP de la MOx dans l'acétonitrile à 80 °C sous atmosphère inerte grâce aux amorceurs précédemment décrits (Figure 38). Afin de pouvoir comparer avec des tensioactifs PEG commerciaux et puisqu'il est possible de préprogrammer la longueur des chaînes POx par le rapport initial $n_{\text{monomère}}/n_{\text{amorceur}}$, des polyoxazolines de DP_n relativement faibles : 15 et 35 ont été visés. La terminaison des chaînes en croissance a été effectuée en présence de potasse dans le méthanol.

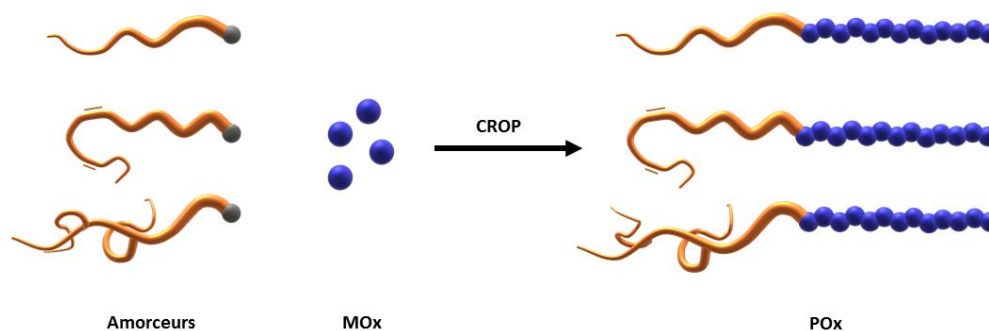


Figure 38 : Bilan de la synthèse des C_mPOx_n

La caractérisation des POx amphiphiles linéaires saturés (C₁₆POx_n), linéaires insaturés (C_{18:2}POx_n) et ramifiés saturés (C₁₈(SC₁₂)POx_n) a été réalisée par spectroscopie RMN ¹H et par chromatographie GPC. Les masses molaires moyennes en nombre (M_n) et l'indice de polymolécularité (I_p) des échantillons sont ainsi reportés dans le Tableau 6. L'ensemble des POx a été synthétisé avec un bon contrôle des masses molaires visible par une cohérence entre les valeurs expérimentales (M_{n, RMN}) et théoriques

($M_{n, th}$) et un I_p de l'ordre de 1,4. Pour les POx linéaires, les valeurs de $M_{n, GPC}$ restent voisines des théoriques. Par contre, dans le cas des polymères ramifiés, les valeurs $M_{n, GPC}$ s'éloignent des valeurs $M_{n, th}$ et $M_{n, RMN}$. Ce phénomène est bien connu car la GPC est basée sur une mesure de rayon de giration correspondant à un polymère linéaire très éloigné de celui d'un polymère ramifié et en plus dans notre cas la nature chimique est différente. Bien que le DP_n théorique soit légèrement différent du DP_n expérimental, les POx seront nommés dans le reste du manuscrit en fonction du $DP_{n, th}$ pour simplifier le raisonnement.

Tableau 6 : Récapitulatif des caractéristiques des POx amphiphiles synthétisés

Amorceur	Type de POx	Formule théorique	$M_{n, th}$ (g/mol)	RMN 1H ^{a)}		GPC ^{b)}	
				M_n (g/mol)	DP_n	M_n (g/mol)	I_p
C ₁₆ I	Saturé	C ₁₆ POX ₁₅	1 500	2 000	20	1 400	1,4
C ₁₆ I	Saturé	C ₁₆ POX ₃₅	3 200	3 500	38	2 500	1,4
C _{18:2} OMs	Insaturé	C _{18:2} POX ₁₅	1 500	2 000	20	1 300	1,6
C _{18:2} OMs	Insaturé	C _{18:2} POX ₃₅	3 200	3 400	37	3 200	1,4
C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ OTs	Ramifié	C ₁₈ (SC ₁₂)POX ₁₅	2 000	2 100	17	7 800	1,3
C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ OTs	Ramifié	C ₁₈ (SC ₁₂)POX ₃₅	3 700	3 200	30	12 000	1,3

a) : analyse réalisée dans le CDCl₃, b) : analyse réalisée dans le DMF en équivalents PMMA.

La Figure 39 représente la superposition des traces GPC monomodales des POx ramifiés de DP_n 15 et 35 après dialyse. Bien qu'ajoutés en excès lors de la synthèse, on note l'absence de thiols résiduels assurant la pureté des produits obtenus après dialyse. Le décalage entre les deux pics d'éluion confirme la différence de masses molaires des deux POx. Le temps d'éluion nécessaire pour le C₁₈(SC₁₂)POX₁₅ est plus long puisque ce POx est de masse molaire plus faible.

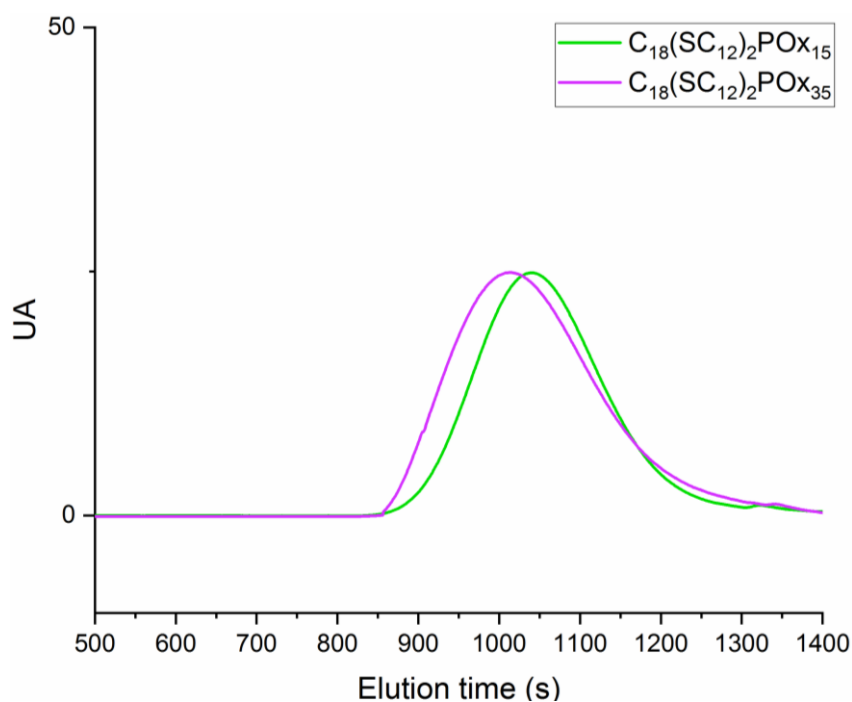


Figure 39 : Superposition du tracé GPC de $C_{18}(SC_{12})_2POX_{15}$ et $C_{18}(SC_{12})_2POX_{35}$

Les spectres RMN 1H des trois types de POx amphiphiles (Figure 40) présentent les pics de l'unité de répétition POx à 2,1 ppm (CH_3) et 3,5 ppm ($-CH_2-$). Les pics caractéristiques de $C_{16}POX_{15}$, $C_{18:2}POX_{15}$ et $C_{18}(SC_{12})_2POX_{15}$ sont identifiés selon la chaîne alkyle qu'ils portent. Pour le linéaire saturé : $C_{16}POX_n$ tous les CH_2 sont visibles à 1,2 ppm, pour le linéaire insaturés $C_{18:2}POX_n$ la double liaison est présente à 5,3 ppm. Enfin, le ramifié saturé $C_{18}(SC_{12})_2POX_n$ présente quatre pics : CH_2SCH à 2,5 et 2,7 ppm et SCH_2CH_2 et $SCHCH_2$ à 1,5 et 1,7 ppm.

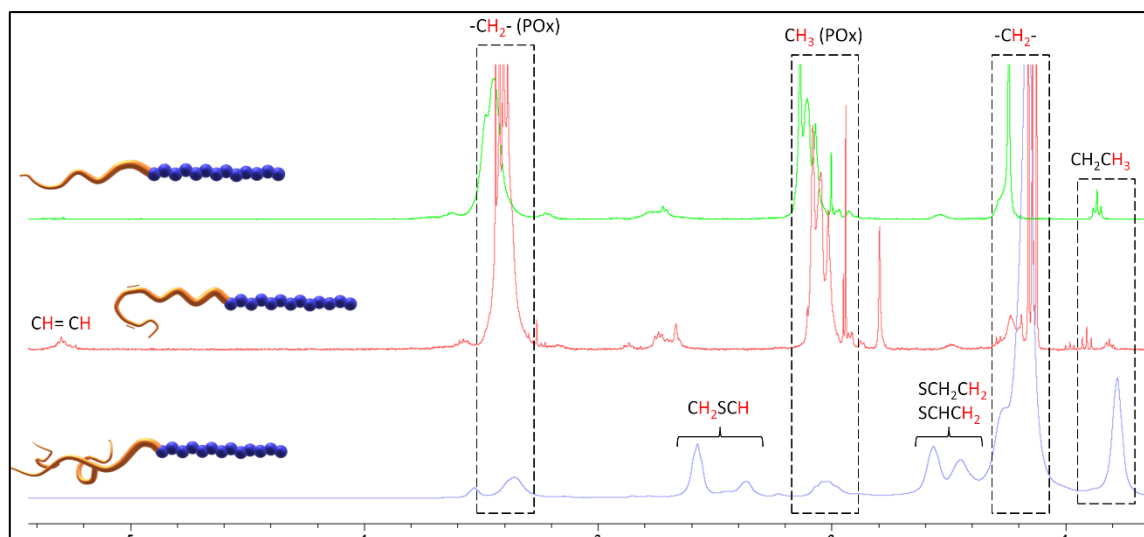


Figure 40 : Superposition des spectres RMN 1H ($CDCl_3$) de $C_{16}POX_{15}$ (vert), $C_{18:2}POX_{15}$ (rouge) et $C_{18}(SC_{12})_2POX_{15}$ (bleu)

IV. Comportement des POx en solution aqueuse

Nous avons étudié les propriétés physico-chimiques des POx synthétisés dans l'eau et comparé ces résultats avec la littérature (Tableau 7). La mesure de tension de surface des solutions de tensioactifs a été effectuée par tensiométrie utilisant la technique de la lame de Wilhelmy pour déterminer la concentration d'agrégation critique (CAC) du tensioactif. Pour l'ensemble des POx, on observe une même tendance avec un plateau entre 0,0001 et 1 mg/L autour de 72 mN/m correspondant aux unimères présents dans l'eau, puis la tension de surface chute jusqu'à 150 mg/L avec une zone très perturbée de 75 à 150 mg/L. La CAC est assimilée à cette zone d'instabilité et ainsi **tous les POx ont une CAC comprise entre 75 et 150 mg/L** (Figure 41). Il est difficile de donner une valeur plus précise mais ces valeurs sont en accord avec la littérature. La différence de degré de polymérisation entre les POx semble trop faible pour se répercuter sur les valeurs de CAC. Enfin, aux fortes concentrations, il n'y a pas de plateau mais une décroissance continue qui peut s'expliquer par la formation d'agrégats instables qui évoluent avec la concentration comme cela a déjà été décrit dans la littérature [22]. Cette zone d'instabilité peut également provenir de la méthode utilisée, en effet pour les macromolécules, la méthode de la goutte pendante est recommandée. Cependant, cette méthode n'était pas disponible au laboratoire.

Tableau 7 : Valeurs de tension de surface de POx amphiphiles issues de la littérature

Type de POx	Bloc hydrophobe	CAC (mg/L)	CAC (mol/L)	Auteurs
PMOx	C12	100	5.10^{-5}	Volet, [19]
PMOx	C18	100	2.10^{-5}	Volet, [19]
PMOx	PtBA	35	--- ^{a)}	Brieuc, [10]
PEtOx	PLA	0,03	--- ^{a)}	Hsiue, [11]
PEtOx	PCL	1-2	--- ^{a)}	Peng, [9]

a) : valeur non déterminée dans la littérature.

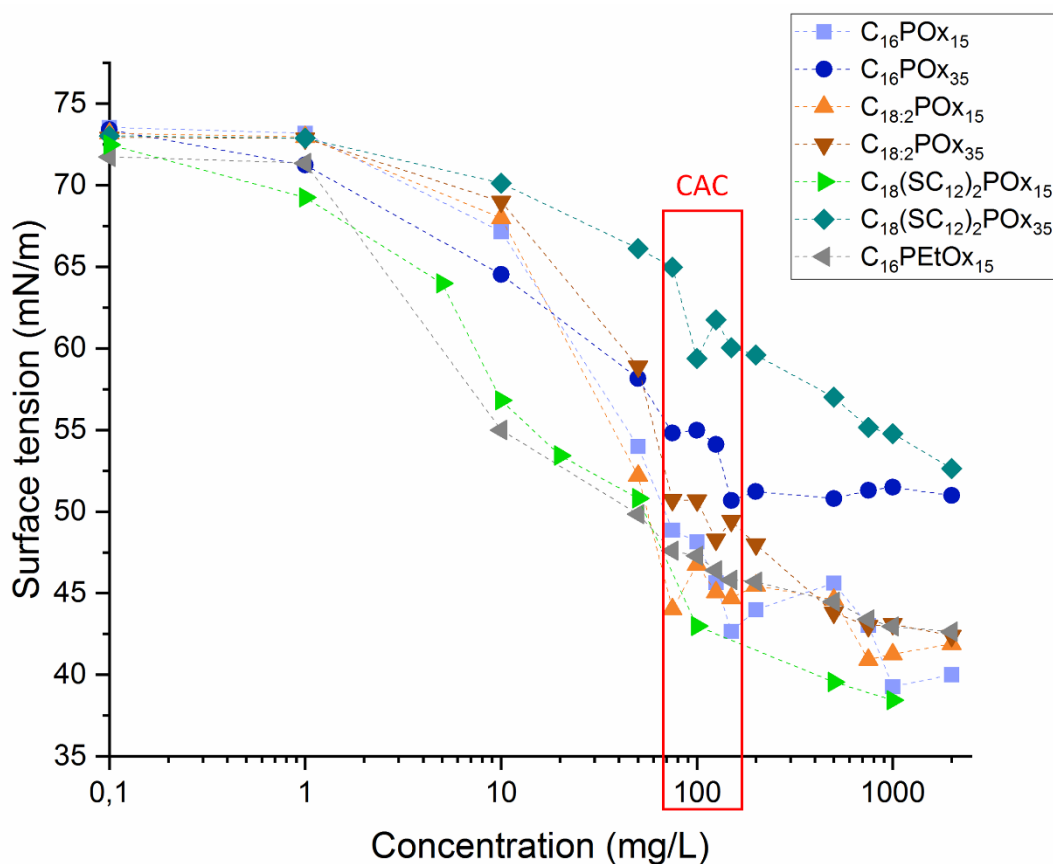


Figure 41 : Tension de surface de l'ensemble des POx synthétisés en fonction de leur concentration

On observe toutefois des différences en terme d'abaissement de la tension de surface (effectivité) et de taille des agrégats formés au-delà de la CAC à 500 mg/L (Tableau 8). En effet, le POx ramifié ($C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$) présente une effectivité de 34,2 mN/m alors que son homologue $C_{18}(SC_{12})_2POx_{35}$ possédant un DP_n plus élevé a une effectivité de seulement 20,7 mN/m : une chaîne POx plus longue rend le tensioactif très hydrophile modifiant son comportement. Le POx linéaire saturé ($C_{16}POx_{15}$) quant à lui a une effectivité de 33,8 mN/m quasiment identique au POx ramifié ($C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$). Par contre, si on compare l'effectivité pour la même chaîne alkyle principale du $C_{18:2}POx_{15}$ (31,8 mN/m) et celle du $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ (34,2 mN/m), il semble que la présence des ramifications augmente très peu l'effectivité du TA par rapport à l'effet décrit dans la littérature. Toutefois, les chaînes thiols linéaires $C_{12}H_{25}$ ajoutées *via* les ramifications sont faiblement hyper-encombrées ce qui explique la différence observée avec les travaux de Eastoe et al.. Ainsi, de nouveaux POx ramifiés avec des chaînes thiols plus encombrées sont en cours d'élaboration. Néanmoins, au regard de l'effectivité on peut dire que les POx de DP_n 15 possède un **caractère tensioactif**.

La mesure de la taille des agrégats en DLS peut fournir une explication à ces résultats (Tableau 8). Compte tenu des PDI, il semble que les agrégats formés spontanément par les POx de DP_n 15 présentent une distribution plus homogène et mieux définis ($PDI < 0,3$) que ceux formés par les POx de DP_n 35 ($PDI > 0,3$).

Tableau 8 : Valeurs d'effectivité et taille d'agrégats observés en DLS

POx	Effectivité (mN/m)	DLS : diamètre hydrodynamique moyen en nombre (nm), PDI	
C ₁₆ POx ₁₅	33,8	178	0,33
C ₁₆ POx ₃₅	21,6	9	0,38
C _{18:2} POx ₁₅	31,8	95	0,29
C _{18:2} POx ₃₅	31,4	8	0,7
C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ POx ₁₅	34,2	33	0,24
C ₁₈ (SC ₁₂) ₂ POx ₃₅	20,7	12	0,4

V. Etude de viabilité cellulaire des POx

Bien que les POx soient connus pour leur excellente cytocompatibilité, nous avons vu dans la revue LipoPOx (chapitre 1, partie IV.3) qu'il était nécessaire d'évaluer la viabilité cellulaire de chaque nouvelle architecture macromoléculaire. Nous avons donc effectué des tests sur les cellules de la peau : fibroblastes (NIH3T3) et kératinocytes (HaCaT) et comparé avec un équivalent PEG. Il existe plusieurs façons d'évaluer l'impact de matériaux sur le comportement cellulaire. Les tests s'appuient généralement sur trois mécanismes possibles soit en regardant l'intégrité membranaire (et aussi la capacité de la cellule vivante à effluer des molécules), le fonctionnement de l'activité mitochondriale de la cellule (viabilité cellulaire), ou en observant le mécanisme de mort cellulaire (apoptose, nécrose). Il existe également des tests qui évaluent l'activité clonogénique des cellules, c'est-à-dire leur capacité à former des colonies après un traitement toxique [23].

Nous avons choisi un test de colorimétrie MTT, basé sur le fonctionnement de l'activité cellulaire. Son principe repose sur la réduction enzymatique du sel de tétrazolium en formazan par les cellules produisant ainsi des cristaux insolubles violets pouvant être mesuré par spectroscopie UV-visible. Ce test est connu pour être simple, rapide, précis, robuste, peu cher et adapté à nos types cellulaires [23]. Dans un premier temps, nous avons travaillé sur des fibroblastes murins (NIH3T3), issus du derme, car ces cellules sont faciles à manipuler, peu sensibles et ont une confluence rapide. Ensuite, nous avons confirmé les résultats sur des cellules de l'épiderme correspondant à notre couche cible de la peau avec des kératinocytes humains immortalisés (HaCaT). La Figure 42 révèle les résultats obtenus pour les 3 types de POx synthétisés sur les fibroblastes et la Figure 44 ceux sur les kératinocytes afin de comparer l'impact de la chaîne alkyle sur deux types cellulaires de la peau.

Le POx saturé (C₁₆POx₁₅) n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire jusqu'à 0,1 g/L, le POx insaturé (C_{18:2}POx₁₅) jusqu'à 10 g/L et le POx ramifié (C₁₈(SC₁₂)₂POx₁₅) jusqu'à environ 5 g/L (Figure 42). **L'IC₅₀ obtenu pour le C₁₆POx₁₅ est 0,47 g/L, de 16,30 g/L pour C₁₈(SC₁₂)₂POx₁₅ et 20,42 g/L pour C_{18:2}POx₁₅.** L'impact de la chaîne alkyle sur la viabilité cellulaire est donc C₁₆ >> C₁₈(SC₁₂)₂ > C_{18:2}. Le facteur 100 de différence avec C₁₆ peut s'expliquer par **la capacité d'interaction de la chaîne alkyle** avec la membrane lipidique des cellules. Le POx saturé interagit rapidement et s'insère dans les membranes alors que le POx ramifié et insaturé préfèrent favoriser les interactions entre ses chaînes hydrophobes ou n'a pas la même capacité à s'insérer dans les membranes. On peut aussi supposer que le **POx ramifié a un**

encombrement stérique important gênant les interactions avec les cellules et **le POx insaturé est moins flexible** dû à la présence des deux doubles liaisons sur une même chaîne.

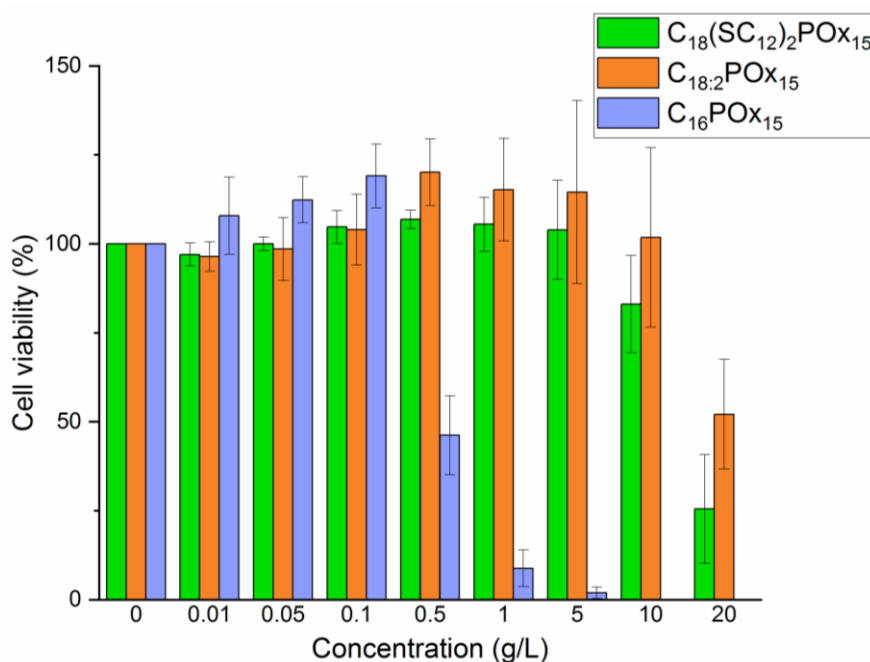


Figure 42 : Comparaison des 3 types de POx sur les fibroblastes murins (NIH3T3), après 24h d'incubation (n=3)

Nous avons également évalué la différence de viabilité cellulaire sur les fibroblastes murins pour un même POx : $C_{18:2}POx_n$ comportant des DP_n différents (15 vs 35) (Figure 43). **Plus le DP_n du POx est élevé, plus l'impact sur la viabilité cellulaire est prononcé.** En effet, l' IC_{50} de $C_{18:2}POx_{15}$ est de 20,42 g/L alors que celui de $C_{18:2}POx_{35}$ est de 3,4 g/L soit un facteur 6. Cette différence de viabilité cellulaire peut être liée à la distribution de taille de l'ordre de 10 nm des objets formés avec le DP 35 comparativement au DP 15 qui forme des objets de 100 nm. Une taille plus petite pourrait induire une meilleure pénétration dans les cellules et donc une plus grande toxicité.

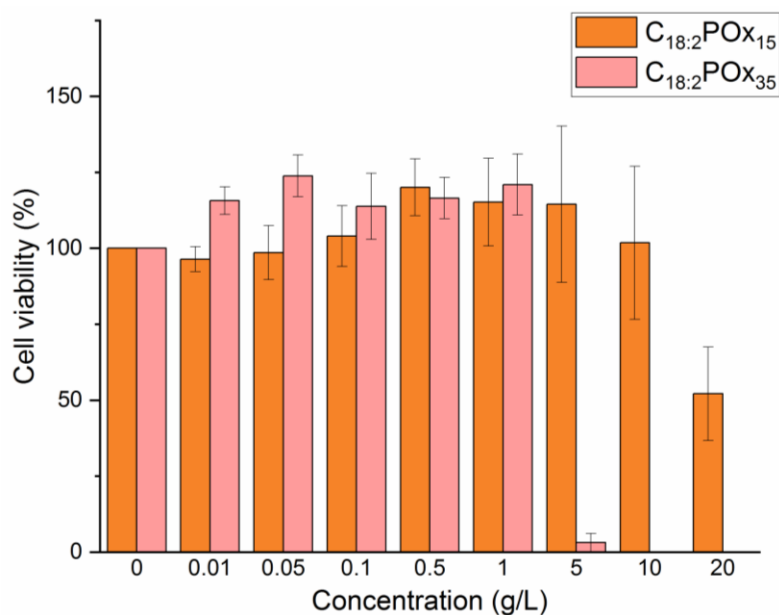


Figure 43 : Evaluation de l'impact du DP_n sur $C_{18:2}POx_n$ sur la viabilité cellulaire sur les fibroblastes murins (NIH3T3) ($n=3$)

Puisque la peau est composée de deux types cellulaires majoritaires : les fibroblastes et les kératinocytes, nous avons également déterminé la viabilité cellulaire sur les kératinocytes de type humain immortalisés : les HaCaT [24]. La viabilité cellulaire des 3 POx a été testée sur ce nouveau type cellulaire et il semble que l'impact des POx soit plus marqué mais que l'ordre de toxicité entre les trois reste inchangé (Figure 44). **L'IC₅₀ est respectivement de 0,13 g/L pour le C₁₆POx₁₅, de 0,77 g/L pour le C_{18:2}POx₁₅ et de 0,64 g/L pour le C₁₈(SC₁₂)₂POx₁₅.** Cette toxicité peut s'expliquer par la différence de type cellulaire. Les fibroblastes sont d'origine mésenchymateuse se divisant rapidement et facilement alors que les kératinocytes sont des cellules épithéliales, plus sensibles à leur environnement et proliférant moins rapidement. Cette différence de sensibilité a également été observée dans la littérature pour une application topique de plusieurs produits testés [25]. De plus, les cellules HaCaT sont une lignée d'origine humaine obtenues par transformation spontanément (non tumorigène) pouvant expliquer également leur sensibilité [24]. Ces données de viabilité cellulaire seront utilisées pour déterminer les conditions expérimentales des tests de pénétration (Chapitre V).

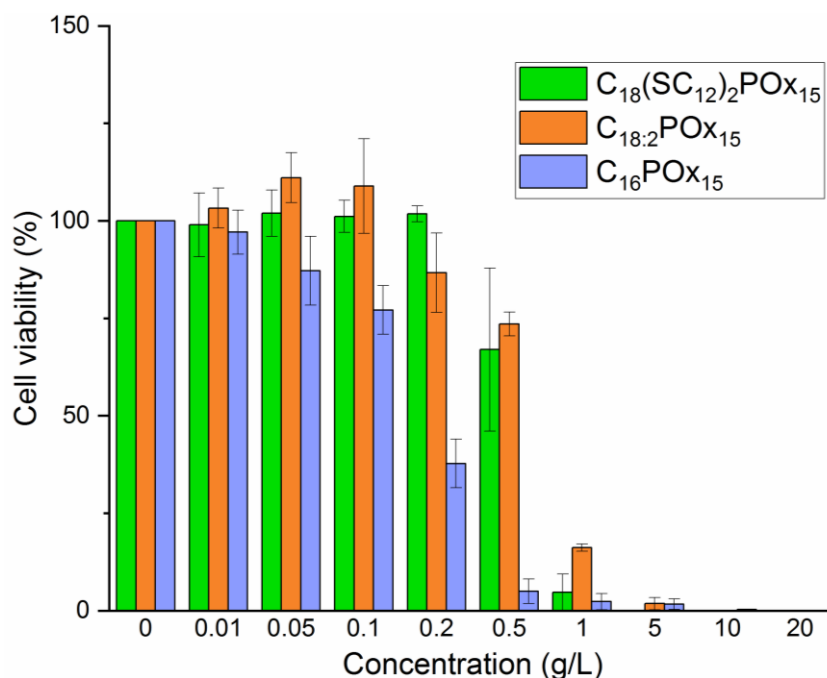


Figure 44 : Comparaison des 3 types de POx sur les kératinocytes (HaCaT), après 24h d'incubation (n=3)

Dans le chapitre 1 partie IV.1, nous avons présenté la problématique des PEG et proposé les POx comme alternative. De ce fait, nous avons donc comparé la viabilité cellulaire entre les PEG et POx mais puisqu'il n'existe pas de PEG commerciaux avec des chaînes alkyle insaturées ou ramifiées, nous avons donc comparé avec une chaîne alkyle saturé $C_{16}POx_{15}$ et $C_{16}POE_{20}$ (référence Brij 58) sur les fibroblastes. Avec un IC_{50} pour le $C_{16}PEG_{20}$ de 0,09 g/L et de 0,47 g/L pour le $C_{16}POx_{15}$, les résultats, montrent bien que le **POx a significativement moins d'impact sur la viabilité cellulaire que les PEG** (Figure 45). Cependant, Il est difficile de comparer ces données avec la littérature car les conditions d'analyse (type cellulaire, temps d'incubation, type de test, analyse des résultats) varient beaucoup. La même évaluation de la viabilité du PEG sur les HaCaT n'a pas pu être conduite à cause de la crise sanitaire liée au COVID-19.

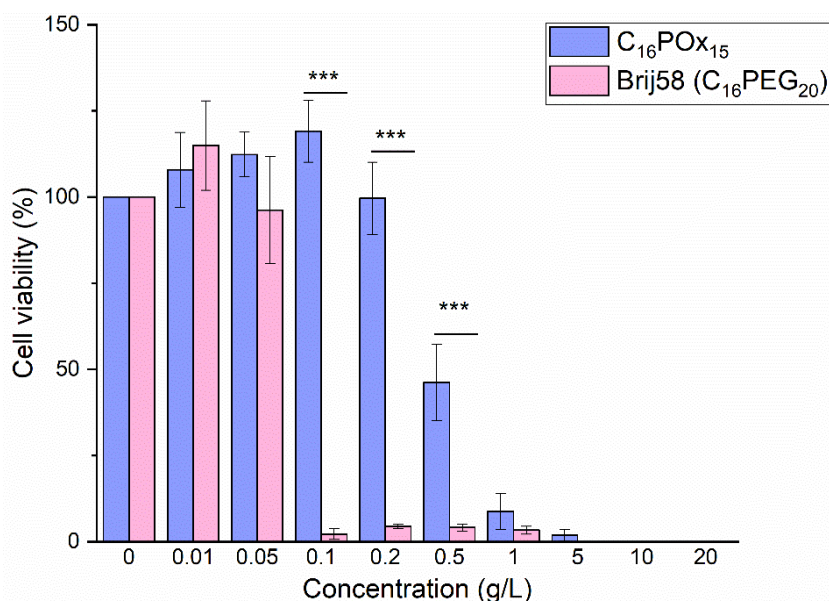


Figure 45 : Comparaison de viabilité cellulaire entre POx et PEG sur NiH3T3, après 24h d'incubation (n=3), analyse statistique t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

VI. Capacité antioxydante des POx amphiphiles

Nous avons enfin voulu évaluer la capacité des groupements thioéther présents sur le $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$ à neutraliser les radicaux libres soit par transfert d'hydrogène avec un test chimique (DPPH), soit par réaction d'oxydation avec des peroxydes *via* un test cellulaire.

VI.1 Piégeage des radicaux libres par $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$ selon le test chimique DPPH

Nous avons réalisé le test DPPH afin de comparer l'activité antioxydante du POx $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$ avec son homologue $C_{18:2}POx_n$ ne contenant pas de groupement thioéther. Le test DPPH est classiquement mis en place pour évaluer le pouvoir antioxydant [26], le signal d'adsorption UV-vis du radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) permet de suivre sa stabilisation en DPPH (protocole chapitre Matériels et Méthodes).

Les résultats montrent que les groupements thioéther sont capables d'inhiber les radicaux ce qui n'est pas le cas pour les POx linéaires insaturés (Tableau 9). A partir de 0,1 g/L, $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ inhibe une partie des radicaux présents (6 %) alors que $C_{18:2}POx_{15}$ n'a aucun effet, même à 2,5 g/L.

Tableau 9 : Inhibition des radicaux DPPH par les POx en fonction de leur concentration

Concentration en POx (g/L)	0,001	0,01	0,1	0,5	1	2,5
Inhibition en radicaux avec $C_{18:2}POx_{15}$ (%)	0	0	0	0	0	0
Inhibition en radicaux $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$	0	0	6 ± 2	10 ± 3	13 ± 7	19 ± 6

Toutefois, il est difficile de comparer ce résultat avec ceux de la littérature car ce test est plutôt utilisé pour évaluer les antioxydants. L'activité anti radicalaire des fonctions dites « *ROS responsables* » sont généralement évaluées par des tests d'oxydation (cf chapitre 1 partie II.1). En conclusion, **l'activité de neutralisation des radicaux est présente mais faible.**

VI.2 Piégeage des radicaux libres par $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$ selon le test cellulaire

Pour ce test cellulaire, nous avons choisi de travailler avec les fibroblastes murins (NiH3T3) car les kératinocytes humains (HaCaT) sont trop sensibles aux changements de milieu et l'ajout de molécules actives nécessaires pour ce test induirait un biais. Suivant le protocole (chapitre Matériels et Méthodes), l'ajout de peroxydes en présence des cellules permet d'observer la réponse des groupements thioéther vis-à-vis de l'oxydation et de la protection des cellules aux ROS (Figure 46). Les concentrations de 5 et 10 g/L ont été choisies en fonction des résultats de viabilité (partie IV). Nous avons sélectionné les concentrations les plus élevées tout en respectant la viabilité cellulaire minimum requise (généralement minimum 75 % de viabilité cellulaire). Plus l'intensité relative des radicaux libres est faible, plus le nombre de radicaux piégés est élevé. A 5 g/L, l'activité est similaire aux cellules seules sans traitement (contrôle négatif) mais à 10 g/L le $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ est capable de diminuer quasiment de moitié (55 ± 12 %) les radicaux présents. **Ainsi, à 10 g/L, le $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ n'impacte pas la viabilité cellulaire et protège les cellules des radicaux.** Cette concentration semble toutefois élevée si on compare par exemple aux microsphères à base poly(sulfures) dont l'activité anti radicalaire sur macrophage est testée à une concentration de 2,5 mg/L. Cependant, il est difficile de comparer les

deux tests car les conditions expérimentales n'étaient pas les mêmes (type cellulaire, protocole, peroxydes) [27]. Dans le but d'obtenir un pouvoir anti radicalaire plus intense, il faudrait plus de groupements thioéther par chaîne POx, par exemple en greffant des thiols eux-mêmes ramifiés comme le 2-éthylhexanethiol.

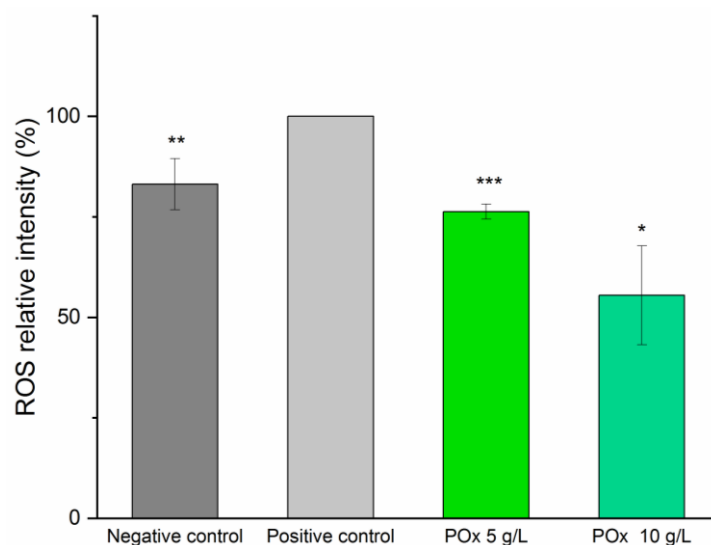
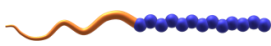
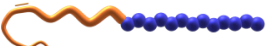
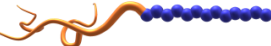


Figure 46 : Test cellulaire de l'effet antioxydant sur NiH3T3 du $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ à 5 et 10 g/L, après 24h d'incubation (n=3), analyse statistique one sample t-test (* $P < 0,05$, ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$)

Pour la suite des travaux de thèse, **les POx DP_n 15** seront principalement utilisés car **leur comportement à l'interface air/eau semble mieux défini et leur impact sur la viabilité cellulaire plus faible**. Le Tableau 10 regroupe les données principales sur ces 3 POx qui seront utiles dans les prochains chapitres.

Tableau 10 : Récapitulatif des données principales des 3 différents POx au DP_n 15

	$C_{16}POx_{15}$	$C_{18:2}POx_{15}$	$C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$
Représentation			
M _n (g/mol)	1 500	1 500	2 000
CAC approximative (g/L)	0,15	0,10	0,10
Effectivité (mN/m)	34	32	34
Taille agrégats (nm) / PDI	178 / 0,33	95 / 0,29	33 / 0,24
IC ₅₀ NiH3T3 (g/L)	0,47	20,42	16,30
IC ₅₀ NiH3T3 (mmol/L)	0,3	13,3	8,4
IC ₅₀ HaCaT (g/L)	0,13	0,77	0,64
IC ₅₀ HaCaT (mmol/L)	0,09	0,5	0,33

Conclusion du chapitre

Au cours des travaux présentés dans ce chapitre, deux amorceurs lipidiques issus de l'huile de lin ont été mis au point. La polymérisation CROP à partir de ces deux amorceurs et d'un autre d'origine commerciale a permis d'élaborer trois POx d'architecture contrôlée différente : linéaire saturé, insaturé et ramifié avec une masse molaire définie. L'impact de ces variations macromoléculaires sur la tension interfaciale est très faible car tous présentent une CAC autour de 100 mg/L avec une large zone d'instabilité. Les valeurs d'effectivité des POx valident leur potentiel en tant que tensioactif ce qui semble prometteur pour la conception de formulations stables. La bonne viabilité cellulaire de chaque POx a été confirmée sur des cellules de l'épiderme et du derme avec toutefois une toxicité plus prononcée sur les kératinocytes. Nous avons également prouvé, dans le cas du POx linéaire saturé, une viabilité cellulaire significativement meilleure avec le POx qu'avec son équivalent PEG. Enfin, l'introduction de groupements thioéther sur le POx ramifié a montré une activité anti-radicalaire faible mais réelle. Celle-ci pourrait être améliorée par une architecture comprenant plus de groupements thioéther. Ces nouvelles données permettent d'enrichir les connaissances sur les POx amphiphiles et notamment sur l'impact de l'architecture sur la tension de surface et la viabilité cellulaire cutanée.

Nous allons maintenant développer des nanoformulations pour la voie topique chargées en quercétine avec les POx synthétisés.

Références

1. Dragicevic, N., J.P. Atkinson, and H.I. Maibach, *Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action*, in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, N. Dragicevic and H.I. Maibach, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 11-27.
2. Wiesbrock, F., R. Hoogenboom, and U.S. Schubert, *Microwave-Assisted Polymer Synthesis: State-of-the-Art and Future Perspectives*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2004. 25(20): p. 1739-1764.
3. Aoi, K. and M. Okada, *Polymerization of oxazolines*. *Progress in Polymer Science*, 1996. 21(1): p. 151-208.
4. Philippe Dubois, O.C., Jean-Marie Raquez, *Polyethers and Polyoxazolines*, in *Handbook of Ring-Opening Polymerization*, Wiley, Editor. 2009. p. 141-164.
5. Hespel, L., et al., *Synthesis of lipid-b-poly(2-isopropyl-2-oxazoline) and successive study of pH- and thermo-sensitive mixed micelles by combination with lipid-b-poly(acrylic acid)*. *Polymer Chemistry*, 2014. 5(13): p. 4009-4015.
6. Guillerm, B., et al., *How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012. 33(19): p. 1600-1612.
7. Glassner, M., M. Vergaelen, and R. Hoogenboom, *Poly(2-oxazoline)s: A comprehensive overview of polymer structures and their physical properties*. *Polymer International*, 2018. 67(1): p. 32-45.
8. Chantal, L., *Tensioactifs*. Techniques de l'ingénieur Constantes chimiques des solvants et produits, 1995. base documentaire : TIB337DUO(ref. article : k342).
9. Peng, K.-Y., S.-W. Wang, and R.-S. Lee, *Amphiphilic diblock copolymers based on poly(2-ethyl-2-oxazoline) and poly(4-substituted- ϵ -caprolactone): Synthesis, characterization, and cellular uptake*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013. 51(13): p. 2769-2781.
10. Guillerm, B., et al., *Well-defined poly(oxazoline)-b-poly(acrylate) amphiphilic copolymers: From synthesis by polymer-polymer coupling to self-organization in water*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2013. 51(5): p. 1118-1128.
11. Hsiue, G.-H., et al., *Environmental-sensitive micelles based on poly(2-ethyl-2-oxazoline)-b-poly(l-lactide) diblock copolymer for application in drug delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. 317(1): p. 69-75.
12. Mohamed, N., *Effet de la longueur de la chaîne sur les propriétés physico-chimiques d'un système mixte de tensioactifs*. 2010.
13. Milonaki, Y., et al., *Amphiphilic gradient copolymers of 2-methyl- and 2-phenyl-2-oxazoline: self-organization in aqueous media and drug encapsulation*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2012. 50(6): p. 1226-1237.
14. Czajka, A., G. Hazell, and J. Eastoe, *Surfactants at the Design Limit*. *Langmuir*, 2015. 31(30): p. 8205-17.
15. Desroches, M., et al., *Synthesis of Biobased Polyols by Thiol-Ene Coupling from Vegetable Oils*. *Macromolecules*, 2011. 44(8): p. 2489-2500.
16. Pham, P.D., et al., *Lipidic polyols using thiol-ene/yne strategy for crosslinked polyurethanes*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2014. 52(11): p. 1597-1606.
17. Stemmelen, M., et al., *Plant oil-based epoxy resins from fatty diamines and epoxidized vegetable oil*. *European Polymer Journal*, 2015. 68: p. 536-545.
18. Lomège, J., et al., *Synthesis of Alkyl Sulfur-Functionalized Oleic Acid-Based Polymethacrylates and Their Application as Viscosity Index Improvers in a Mineral Paraffinic Lube Oil*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2020. 97(3): p. 309-318.
19. Volet, G., A.-C.L. Deschamps, and C. Amiel, *Association of hydrophobically α,ω -end-capped poly(2-methyl-2-oxazoline) in water*. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2010. 48(11): p. 2477-2485.
20. Hill, K., *Fats and oils as oleochemical raw materials*. 2000. 72(7): p. 1255.
21. El Asmar, A., *Synthesis and characterisation of stimuli-responsives micellar systems from linseed oil*. 2017, Normandie Université.
22. *Surfactant Micellization*, in *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. p. 39-66.
23. Shokrzade, M. and M. Kordi, *An overview of the most common methods for assessing cell viability*. *Journal of Research in Medical and Dental Science*, 2017. 5: p. 33.
24. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line*. *J Cell Biol*, 1988. 106(3): p. 761-71.
25. Ponec, M., et al., *Use of human keratinocyte and fibroblast cultures for toxicity studies of topically applied compounds*. *J Pharm Sci*, 1990. 79(4): p. 312-6.
26. Blois, M.S., *Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical*. *Nature*, 1958. 181(4617): p. 1199-1200.
27. Poole, K.M., et al., *ROS-responsive microspheres for on demand antioxidant therapy in a model of diabetic peripheral arterial disease*. *Biomaterials*, 2015. 41: p. 166-175.

Chapitre 3 : Elaboration de nanoformulations à base de POx chargées en quercétine

L'objectif de notre étude est de développer **des nanoformulations pour traverser la barrière du *stratum corneum* et délivrer des antioxydants dans l'épiderme** afin de neutraliser les radicaux libres présents en excès. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (chapitre 1 partie III.2), parmi les stratégies développées par différentes équipes de recherche, les nanoformulations semblent les plus prometteuses et plus particulièrement, les nanoformulations lipidiques qui ont montré une bonne efficacité de chargement et une pénétration optimale compte tenu de la composition lipidique du *stratum corneum*. Ainsi, nous avons choisi de développer des nanoformulations lipidiques à base de POx chargées en actif pour une application topique.

Les POx n'ayant jamais été utilisés dans ce type de formulation et encore moins pour des applications topiques, nous avons tout d'abord développé des formulations simples pour étudier leurs propriétés notamment en terme de stabilisation des interfaces. Ainsi, des nanoémulsions (NE) et des liposomes ont été mis au point. Ensuite, pour optimiser le taux de chargement en actif, d'autres formulations ont été développées : des micelles mixtes (MM) et des nanocapsules lipidiques (LNC). Les LNC ont montré, lors d'une étude précédente développée au laboratoire (thèse du Dr T. Hatahet, 2015), un fort potentiel de pénétration au travers de la peau ainsi qu'un taux d'encapsulation élevé et une grande stabilité. L'encapsulation de l'antioxydant quercétine a permis d'évaluer les propriétés des formulations sélectionnées (Figure 47), telles que leur capacité de chargement, la protection du principe actif et le maintien de l'efficacité antioxydante.

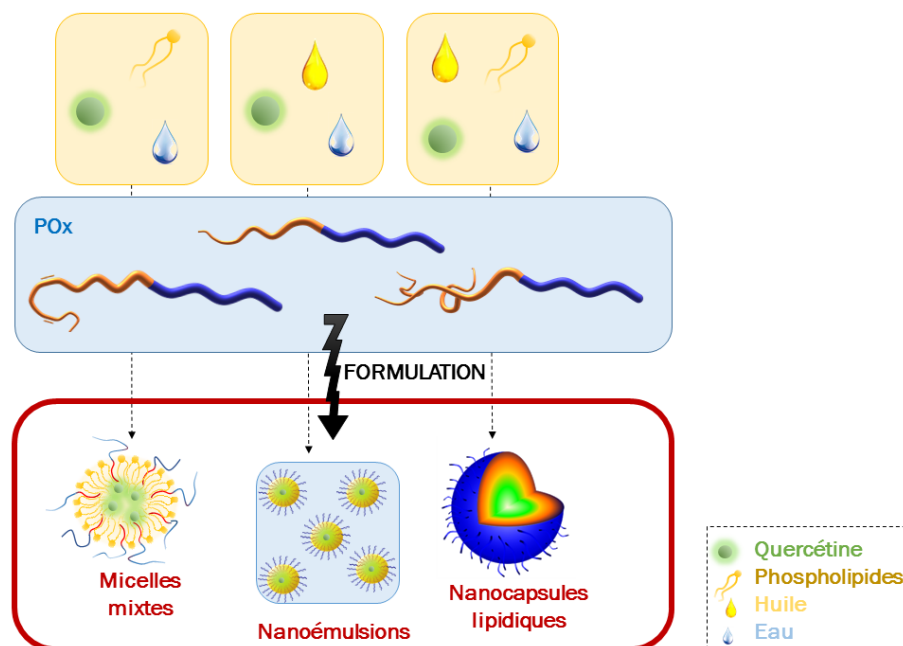


Figure 47 : Représentation des trois nanoformulations à base de POx mises au point

Les nanoémulsions ont été notre premier modèle d'étude mais, comme nous allons le voir, elles ont été rapidement abandonnées à cause d'un taux de chargement trop faible, contrairement aux micelles mixtes et nanocapsules lipidiques qui ont fait l'objet de deux publications dans *International Journal of Pharmaceutics* (2019 et 2020). Elles seront présentées sous cette forme dans ce chapitre. Après optimisation et chargement des formulations, l'efficacité de la quercétine formulée a été évaluée avec un test radicalaire chimique et cellulaire.

I. Les nanoémulsions

Notre premier choix s'est porté sur les nanoémulsions (NE) pour permettre d'évaluer les propriétés émulsionnantes des POx tout en chargeant la quercétine (molécule hydrophobe) à des doses efficaces pour évaluer ensuite le pouvoir antioxydant de la formulation. Afin de diminuer l'utilisation de tensioactif à base de PEG, nous avons substitué le PEG par le POx. Le POx permet à la fois de stabiliser l'interface eau/huile de l'émulsion et aussi de réduire les phénomènes de déstabilisation tels que la coalescence, le mûrissement d'Ostwald ou la floculation grâce à la partie hydrophile. Comme dans la plupart des émulsions, un co-tensioactif (CoTA) est ajouté pour réduire efficacement la tension interfaciale ainsi le couple de tensioactifs formé contient un hydrophobe (HLB bas) et un hydrophile (HLB élevé). Pour optimiser au mieux la NE en terme de stabilité et taux de chargement, nous avons défini deux objectifs : (i) **un pourcentage d'huile le plus élevé possible** et (ii) **un pourcentage de tensioactif (POx + CoTA) le plus faible possible**. Pour cela, nous avons tout d'abord réalisé un *screening* de solubilité de la quercétine dans différents types d'huile. L'huile choisie présentait le pouvoir émulsionnant le plus élevé et la meilleure solubilité de la quercétine. Ensuite, grâce à la méthode du diagramme ternaire nous avons défini la composition la plus stable avec le ratio POx/CoTA le plus faible.

Détermination de la composition des NE

Un *screening* d'huiles végétales : soja, ricin, maïs ou synthétiques minérales : isopropyl myristate (MIP), monooléate de glycérol (Peceol™), triglycérides d'acide caprylique (Miglyol® 812), vaseline, propylène glycol monocaprylate (Capryol®90) a été réalisé pour évaluer la solubilité de la quercétine mais aussi sa stabilité dans l'huile à 37 °C dans le temps (Tableau 11). En effet, la quercétine est connue pour être une molécule instable et sensible à l'oxydation [1]. Le phénomène d'oxydation de la quercétine s'est par exemple produit pour l'huile Capryol®90 qui a donc été retirée de l'étude. La quercétine ne s'est pas solubilisée dans les huiles de maïs, miglyol et paraffine qui ont donc aussi été retirées.

Parmi les huiles saturées, également moins sensibles à l'oxydation, **nous avons retenu l'huile végétale de ricin** qui permet de solubiliser la quercétine à 14,5 g/L après 72 heures d'agitation et qui est stable pendant 5 jours à 37 °C, ainsi que **l'huile minérale MIP** qui solubilise la quercétine à 2,8 g/L. Les huiles synthétiques s'émulsionnant plus facilement que les huiles végétales, nous avons aussi choisi de faire un compromis entre solubilité et stabilité en étudiant également **une formulation mixte d'huile de ricin et le MIP** dans un mélange 50/50 en masse.

Tableau 11 : Concentration en quercétine solubilisée dans les huiles après 48h et 72h d'agitation

Huile	Nature	Saturation	Concentration après 48h (g/L)	Concentration après 72h (g/L)
Soja	Végétale	Insaturée	11,5	2,33
Ricin	Végétale	Insaturée	8,7	14,5
MIP	Synthétique	Saturée	/	2,8
Peceol™	Synthétique	Insaturée	1,8	/

Nous avons choisi un co-tensioactif lipophile sans PEG couramment utilisé dans des formulations topiques : le Plurol® isostérique (polyglyceryl-6 isostearate) HLB = 3 pour former le couple C₁₆POx₃₅/Plurol®. Nous avons déterminé la composition : POx/Plurol®/huile de sorte à avoir la plus faible quantité de tensioactif avec le meilleur taux de chargement en quercétine grâce à un diagramme ternaire.

Mise en place du procédé

La contrainte principale des études de formulations à base de POx a été de travailler sur des petits volumes de 2 mL (ayant une quantité limitée en POx). Les NE sont obtenues en chauffant sous agitation à 60 °C d'un côté la phase aqueuse avec le POx, et d'un autre la phase huileuse avec le Plurol® et la quercétine. Après mélange des deux phases et dispersion à l'aide d'un mini disperseur, cinq cycles d'homogénéisation à haute pression (HHP) permettent de réduire la taille de l'émulsion (Figure 48). Les NE présentent une distribution granulométrique centrée à 100 nm (PDI 0.1).

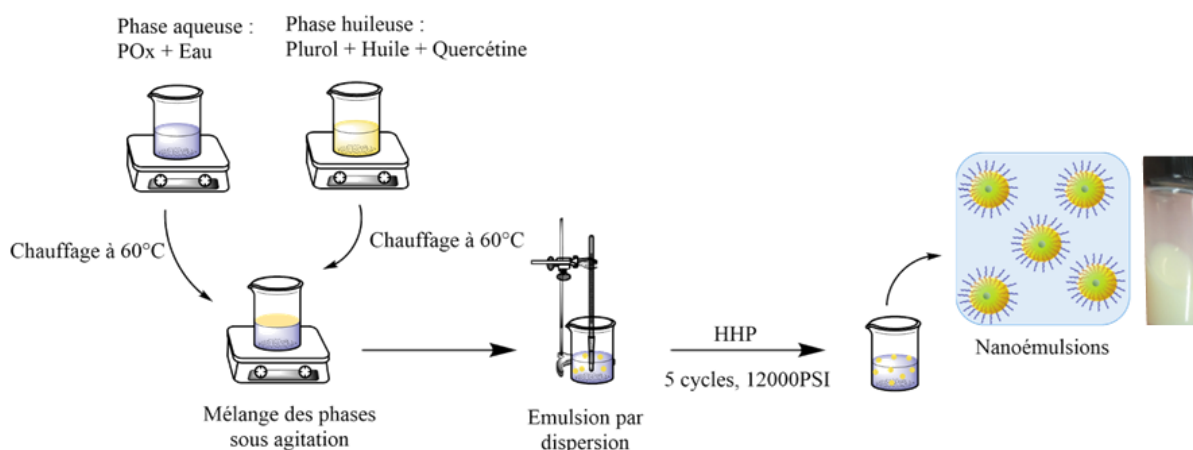


Figure 48 : Procédé de fabrication des NE POx

Une étude en vieillissement accéléré d'un mois à 50 °C et à 4 °C sur les huiles préalablement choisies ricin, MIP et ricin/MIP (50/50), nous a permis de sélectionner deux compositions différentes en huile et couple de tensioactifs :

- 15% d'huile avec 5% en couple TA (2% en POx et 3% en Plurol®)
- 25% d'huile avec 10% en couple TA (4% en POx et 6% en Plurol®)

Pour ces deux compositions, la taille des NE est d'environ 100 nm, stable au cours du temps avec un PDI toujours inférieur à 0,3.

Taux d'encapsulation de la quercétine

Le taux d'encapsulation de la quercétine a été déterminé par HPLC comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes. Les taux de chargement obtenus sont faibles avec un maximum d'efficacité d'encapsulation à 48% avec l'huile de ricin (Tableau 12). **La meilleure NE alliant une stabilité sur un mois à 4, 25 et 37 °C et une population monodisperse à 130 nm est celle avec 5% de TA/Co-TA et 15 % d'huile de ricin** (encadré en rouge dans le Tableau 12). L'huile MIP permet d'obtenir des NE stables de taille plus petite (inférieure à 100 nm) mais n'a pas permis de solubiliser la quercétine avec des taux de chargement extrêmement faible. Le mélange d'huile Ricin et MIP combine les apports des deux huiles avec une taille inférieure à 100 nm grâce au MIP et une efficacité d'encapsulation d'environ 15% avec l'apport de l'huile de ricin.

Tableau 12 : Résultat de l'encapsulation de la quercétine des NE

Type d'huile	POx (%)	Plurol® (%)	Huile (%)	Taux de chargement (%)	Efficacité d'encapsulation (%)	Taille (nm) (PDI)
Ricin	2	3	15	0,27	45	130 (0,09)
Ricin	4	6	25	0,17	48	124 (0,12)
Ricin +MIP	2	3	15	0,09	14	95 (0,12)
Ricin +MIP	4	6	25	0,06	18	97 (0,13)
MIP	2	3	15	0,007	1	100 (0,1)
MIP	4	6	25	0,005	1	95 (0,08)

Il est donc possible de réaliser des NE stables et chargées avec des POx. Cependant, le taux de chargement étant faible, nous avons choisi de développer de nouveaux types de formulation.

II. Les liposomes

Nous avons également commencé à évaluer la capacité des POx à stabiliser des liposomes chargés en quercétine. Les liposomes à base de phosphatidylcholine (Lipoid® S75) et POx ont été formulés par injection éthanolique [2]. Nous obtenons une distribution de taille centrée à 104 nm lorsque les formulations sont vides et 113 nm lorsqu'elles sont chargées (PDI 0,2). La quercétine a été encapsulée mais ce travail n'a pas pu être poursuivi à cause de la situation sanitaire liée au COVID-19.

III. Les micelles mixtes

Nous avons ensuite développé une nanoformulation de type micelles mixtes (MM) composées de phospholipides et de POx (C₁₆POx₁₅). Cette formulation est un système hybride entre les liposomes et les polymersomes (comme présentée Chapitre 1 partie III.2). L'enchevêtrement des chaînes alkyles POx et des phospholipides crée un cœur hydrophobe où la quercétine pourra être encapsulée. La viabilité cellulaire des MM et l'activité antioxydante de la quercétine formulée ont été évaluée sur des cellules de fibroblastes murins (NIH3T3).

Cette formulation a fait l'objet d'un article dans le journal *International Journal of Pharmaceutics* publié en juillet 2019 (DOI : 10.1016/j.ijpharm.2019.118516) [3]. Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme de l'article.

Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery

L. Simon, M. Vincent, S. Le Saux, V. Lapinte, N. Marcotte, M. Morille, C. Dorandeu, J.M. Devoisselle, S. Bégu*

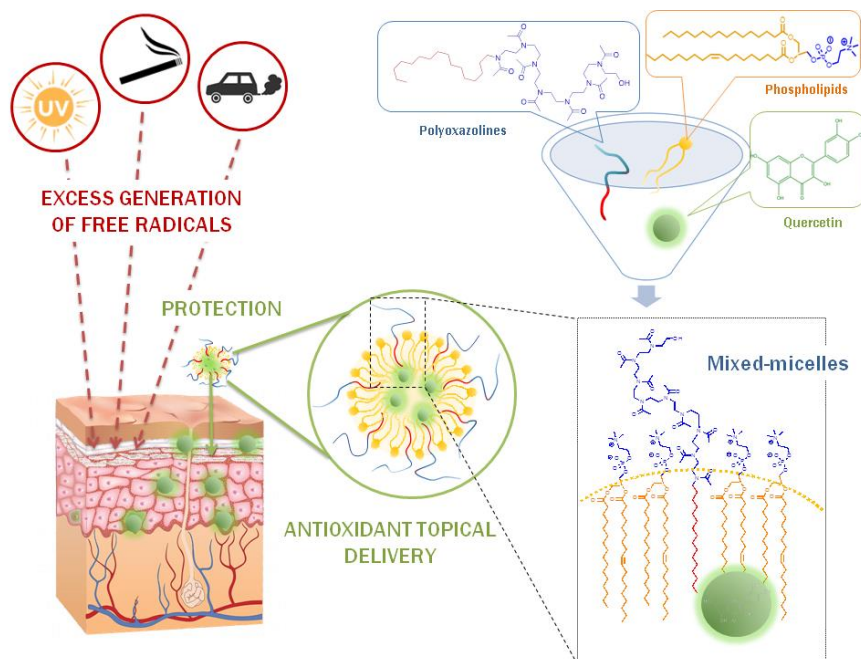
ICGM, Montpellier University, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

Abstract

This study aims to prove the value of the polyoxazolines polymer family as surfactant in formulations for topical application and as an alternative to PEG overuse. The amphiphilic polyoxazolines (POx) were demonstrated to have less impact on cell viability of mice fibroblasts (NIH3T3) than their PEG counterparts. Mixed micelles, made of POx and phosphatidylcholine, were manufactured using thin film and high pressure homogenizer process. The mixed micelles were optimized to produce nanosized vesicles of about 20 nm with a spherical shape and stable over 28 days. The natural lipophilic antioxidant, quercetin, was successfully encapsulated (encapsulation efficiency 94 ± 4 % and drug loading 3.6 ± 0.17 %) in the mixed micelles with no morphological variation. Once loaded in the formulation, the quercetin impact on cell viability of NIH3T3 was decreased while its antioxidant activity remained unchanged. This work highlights the capacity of amphiphilic POx to create, in association with phospholipids, stable nanoformulations which show promise for topical delivery of antioxidant and ensuring skin protection against oxidative stress.

Key words: Antioxidant, Hybrid vesicle, PEG Free, Polyoxazolines, Skin Protection, Topical delivery

Graphical abstract



III.1 Introduction

With a surface of 2 m², the skin is the most extended organ of the human body acting as barrier to mechanical and chemical aggressions [4]. It plays a key role in protecting the body from daily toxic aggressions due to environmental pollutants by generating reactive oxygen species (ROS) [5]. This overproduction of ROS unbalances the antioxidant defense system of the human body [6] leading to oxidative stress that can create skin damage like premature skin aging [7] but also skin cancer risks [8]. Among the environmental sources responsible for skin damage [9], UV radiations were unambiguously shown to cause skin cancers [5]. UVAs were more especially identified to induce DNA mutations *in fine* generating skin carcinogenesis. Other environmental pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, cigarette smoke constituents and ozone, are also considered today as accountable for skin pathologies and cutaneous cancers [8]. For instance, ozone, which is not able to penetrate through skin cells, can act directly on the epidermis barrier by lipid peroxidation inducing a toxic response.

To avoid the deleterious excess of ROS, antioxidant can be administrated through the skin thanks to fluidization or disturbance of the upper epidermis layers facilitating the permeation. This topical delivery strategy uses natural or synthetic exogenous molecules, with low or high molecular weight, as antioxidants [10]. Among all the natural compounds to be delivered, the highly lipophilic polyphenolic molecules belonging to the flavonoids family are often preferred for their powerful antioxidant properties and multiple pathways of activities [11]. Quercetin is one of the flavonols of interest for topical delivery since it gathers the properties of antioxidant and anti-inflammatory activities, wound healing and skin aging retardation. However, its low water solubility, instability to light and poor skin permeability [12] require its formulation for an efficient activity. Therefore, various formulations such as smart crystals [13], lipid nanocapsules [14], liposomes [15], solid lipid nanosystems [16], vesicles [17], nanostructured lipid carriers [18], nanoparticles [19], microemulsions [20] and lipid-based nanosystems [21] have been developed to enhanced the topical delivery of quercetin. It should be noted that most of these formulations use poly(ethylene glycol) (PEG) as stabilizer or thickener because of its very interesting properties including biocompatibility, low toxicity, high solubility in aqueous media and stealth behavior. This explains the PEG overuse for cosmetic and

pharmaceutical applications [22] and its success as the “gold standard” for drug delivery. Recently, clinical awareness on PEG overuse for oral and parenteral delivery pointed out safety issues associated with an increase of PEG antibodies [23] and the possible accumulation of the polymer in body tissues [24], [25].

Therefore, researchers as well as companies are trying to find a polymer alternative to PEG. In this context, the poly(2-R-2-oxazoline)s (POx)s are investigated as one of the most suitable candidates. This polyamide family can be regarded as analogous of poly(amino acid)s with pseudo-peptidic structure. The biomedical properties of POx have been largely described in recent publications [26], [27] or Lorson [28]. Its biocompatibility [29], excellent cytocompatibility [30] and hemocompatibility [31] as well as the absence of accumulation in tissues and the rapid clearance from the bloodstream [32] have been emphasized. Moreover, the stealth behavior with suppression of the interactions with proteins and the immune system was proved [33] allowing an immunocamouflage [34]. This furtivity takes advantage in POxylation [35] systems in reference to PEGylation [35]. The most significant advance in biomedical POx concerns the recent results of Serina Therapeutics Inc. against Parkinson’s disease [36]. They validated phase I clinical trials on POx based rotigotine conjugates whereas multi-dose trials are currently in progress to phase II.

Moreover, the versatility of POx can be noted with an easy additional functionalization when compared to PEG regarding the R pendent groups along the backbone [37], [38], [39], [40]. Consequently, hydrophilic POx can be designed with methyl or ethyl R groups by contrast to hydrophobic POx with longer alkyl chains. Concerning poly(2-methyl-2-oxazoline), its more hydrophilic character than PEG and poly(2-ethyl-2-oxazoline) [41] offers an opportunity to elaborate amphiphilic (co)polymers contrasting with the hydrophobic block. In this way, to generate amphiphilic polymers, POx were associated with various hydrophobic blocks such as saturated or unsaturated lipids including fatty alcohols [42], fatty acids, triacyl glycerols [43], [44] or phospholipids [45].

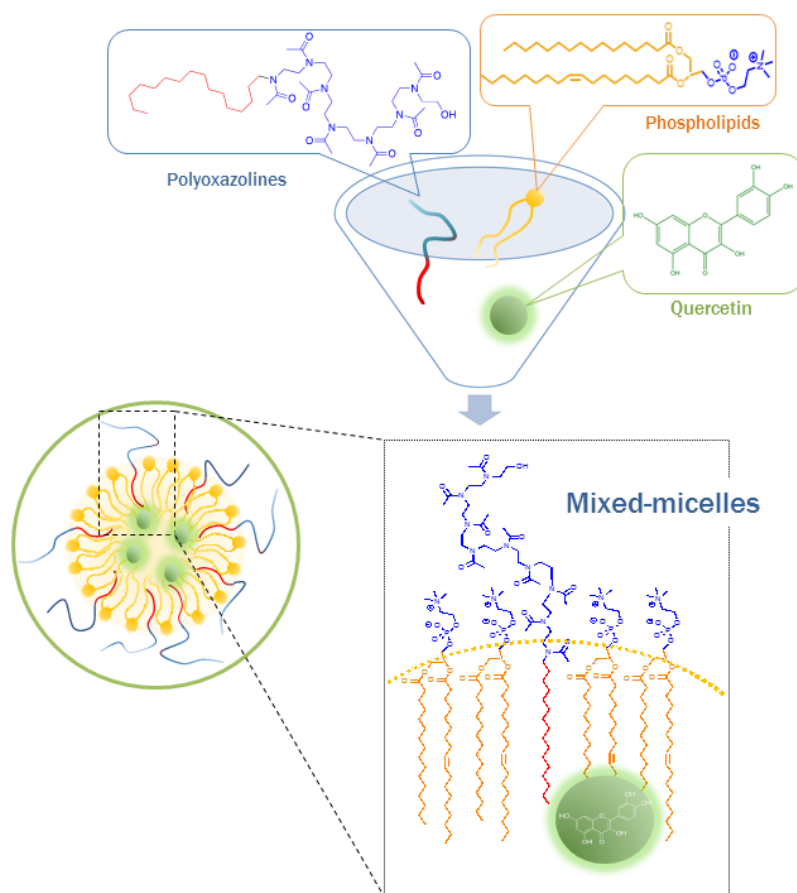
With the aim of protecting active pharmaceutical ingredients (API)s, several types of nanocarriers based on POx physically incorporating an API have been described. These formulations include solid dispersions, nanoparticles and micelles in which various APIs (paclitaxel, curcumin, doxorubicine) have been solubilized [28]. They were shown to be particularly interesting due to the limited number of steps required to synthesize the POx and the absence of necessity to tune the polymer towards the API as it is required for polymer-drug conjugates.

Regarding the association of POx and antioxidant API, little is reported in the literature. One can mention the conjugation of superoxide dismutase (SOD1) enzyme with POx to increase the release through the blood brain barrier and destroy superoxides [46]. A radical fullerene-POx trap making use of the hydrophilicity of POx to disperse the anti-radical C60 molecules was also reported [47]. A tribloc copolymer (PMeOx-*b*-PDMS-*b*-PMeOx) in polymersomes was shown to entrap a photosensitizer (rose bengal dye conjugated to bovine serum albumin) generating increased level of ROS by photodynamic therapy [48], [28].

To our knowledge, no POx topical formulation of flavonoids has been developed yet. In this context, a mixed nanosystem of POx and phospholipids for topical delivery was considered in this paper. Indeed, this hybrid system combines the features of liposomes and polymersomes by mixing the two components, i.e. the lipids and the amphiphilic copolymers, in a single vesicle. Either called hybrid polymer/lipid vesicle [49] or mixed micelles [50], these systems have been studied over the past years

and attracted attention for their versatile structure. It is notable that this mixture of lipid and polymer can lead to different nanostructures [51], such as core-shell of polymers and lipids [52]. Pippa *et al* have already worked on such hybrid nanosystems with POx and phospholipids for drug delivery systems and proved their efficacy as nanocontainers for the incorporation of therapeutic molecules [53].

Herein, the investigated mixed-micelles were created based on phosphatidylcholine stabilized by an amphiphilic poly(2-methyl-2-oxazoline) bearing a long alkyl chain (Scheme 1). The stability and cell viability of these formulations were studied before and after being loaded with quercetin antioxidant. Then, the antioxidant activity of the loaded mixed micelles was measured. This work also aims to evaluate the potency of POx as an alternative to PEG in formulations.



Scheme 1: Schematic representation of the mixed-micelles loaded with quercetin.

III.2 Materials

2-Methyl-2-oxazoline (MOx, Sigma Aldrich, 99.0%) was dried over CaH₂, distilled at reduced pressure and stored under nitrogen atmosphere. Iodo-hexadecane (95.0 %), potassium hydroxide (KOH), quercetin (95% HPLC), phosphatidylcholine (L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk \approx 60%), Brij®58, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), phenazine methosulfate (PMS), *tert*-Butyl hydroperoxide solution (TBHP) 70 % in water, acetonitrile, diethyl ether, methanol, acetone, phosphoric acid and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Germany). Tween 80 (polysorbate 80) was purchased from BASF (BASF, Germany) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-

yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, (MTS) from Promega (Promega, USA). MilliQ water was obtained from Milli-Q Gradient A10 (Merck Millipore, Germany) apparatus.

Chloroform (for HPLC stabilized with ethanol) was bought from Carlo-Erba (Carlo Erba Reagent, Spain). All the reagents were used without further purification.

Spectra/Por 6 dialysis membranes pre-wetted RC tubing with 0.5-1 kDa MWCO were purchased from Spectrum Labs (Spectrum Labs, USA).

III.3 Methods

III.3.1 Amphiphilic polyoxazolines synthesis (POx)

POx synthesis was performed by cationic ring-opening polymerization of MOx. The polymerization was achieved under a nitrogen atmosphere after dissolving iodo-hexadecane (3.564 g, 10.1 mmol) and MOx (15 eq, 151.7 mmol) in dry acetonitrile (0.5 M). The solution was vigorously stirred at 80 °C for 8 hours and then quenched by addition of potassium hydroxide dissolved in methanol (5 eq, 50.5 mmol, 5 M). The solution was stirred at 40 °C for additional 8 hours. The resulting polymer was isolated by precipitation by dropwise addition in cold diethyl ether and then filtration. The POx was then dialyzed with the dialysis membrane to eliminate residual diethyl ether and salts.

III.3.2 Chemical characterization of POx

Proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra were recorded in CDCl₃ a Bruker 400 MHz spectrometer. The POx exhibited the following shifts (δ) in reference to residual CHCl₃ (δ=7.26 ppm), where (s) stands for singlet, (d) doublet, (t) triplet, (m) multiplet: δ = 3.7–3.2 (m, (4n + 2)H, CH₂ POx and CH₂Nalkyl chain), 2.4–2.1 (m, 3n, CH₃ POx), 1.3 (m, 20H, CH₂ aliphatic), 0.9 (t, 3H, CH₃ aliphatic).

III.3.3 Critical aggregation concentration determination

The critical aggregation concentration (CAC) of the POx was determined by surface tension measurements using the Wilhelmy plate method on K100 Krüss Processor Tensiometer from Krüss GmbH. A concentration range of polymer from 0.001 to 400 mg/L was prepared in MilliQ water. Prior to measurements, the solutions were kept under gentle stirring for 24 hours. Data were collected at 25 °C, a detection speed of 6 mm/min, detection sensitivity of 0.01 g and immersion depth of 2 mm using the Kruss software. A blank measurement was first performed using MilliQ water to ensure goodness of measure (γ= 69-73 mN).

III.3.4 Preparation of quercetin loaded mixed micelles (Q-MM)

The mixed micelles (MM) were obtained by the thin film method developed by Bangham [54]. First phosphatidylcholine (PC), Polyoxazolines (POx) and quercetin (Q) were dissolved in a mixture of chloroform:acetone in 1:1 ratio, followed by the formation of thin film by evaporation of the solvent under vacuum. The film of mixed PC, POx and Q was hydrated by addition of filtered phosphate buffered saline (PBS, 150 mM, pH 7.4). Nanosized MM were obtained following a high pressure homogenizer process of 5 cycles at 10 000 PSI. Blank mixed micelles (B-MM) were prepared by the same method, except that quercetin was removed from the process.

After various molar ratios of Q: POx: PC investigated from 5:1:10 to 5:1:50 and higher quercetin loading from 3 to 7, the molar ratio 5:1:40 was selected. It was optimized to ensure the smallest and most stable MM, with the lowest POx amount and the highest drug loading of quercetin.

III.3.5 Photon correlation spectroscopy and electrophoretic mobility measurement

Hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) were measured using a Zetasizer NanoZS apparatus (Malvern Instruments, UK) equipped with a He-Ne laser (wavelength: 632.8 nm) at a temperature of 20 °C and a scattering angle of 173 ° for detection. Zeta potential was measured with 1000 µL of mixed micelles in disposable capillary cell (Malvern Instruments, UK). All the results are the average of three independent measurements.

MM were also analyzed on a NanoSight NS300 instrument (Malvern Instruments, UK). The MM solutions were diluted 200 times in filtered PBS before analysis. Measurements were performed at 20 °C following excitation at 405 nm.

III.3.6 Stability of Q-MM

Blank and loaded MM samples were prepared and stored up to a month for stability study either at 4, 25 and 37 °C for B-MM and at 4 °C only for Q-MM. The stability was evaluated from particle size and PDI measurements (see section 2.5) at day 0, 7, 14, 21, 28 for each temperature. The measurements were performed without filtration before measurements.

The stability of loaded mixed micelles was also evaluated using the concept of *in vitro* release by studying the concentration of quercetin diffusing through a nitrocellulose dialysis membrane from Q-MM to a receptor medium. The dialysis membrane was a 12 – 14 MWFC Spectra/Pore dialysis membrane (Spectrum laboratories, INC USA) and the receptor medium was composed of 40 mL PBS at pH 7.4 with 2 mass percentage of Tween 80. The Q-MM were pre-filtered through 0.2 µm syringe filter (Whatman) to remove aggregated quercetin and then 3 mL were incorporated into the membrane. The stability was determined at 25 °C after 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 hours. Quercetin concentration was determined by HPLC (section 2.9).

III.3.7 Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was performed on TEM Jeol 1400 PLUS (Jeol. Ltbd, Tokyo, Japan) associated with a camera Jeol 2K/2K. The samples previously diluted 10 times were deposited on grids type Cu formvar carbon and negatively colored with an aqueous uranyl acetate solution.

III.3.8 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

The crude quercetin powder and lyophilized Q-MM were analyzed by DSC using a Perkin Elmer DSC400 apparatus (Perkin Elmer, USA).

The thermograms were recorded from 0 to 360 °C with a heating rate of 5 °C.min⁻¹.

III.3.9 HPLC analysis

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) analysis of quercetin was performed on LC6-2012HT apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) using a Prontosil C18 column (120-5-C18 H5.0 µm, 250x4.0 mm) as stationary phase. The mobile phase was composed by a 40/60 volume ratio of acetonitrile to phosphoric acid solution at 0.2 mass percentage at pH=1.9. The injection volume was set at 10 µL and the flow rate was kept constant at 1 mL.min⁻¹ during the 10 minutes of analysis. The detection was achieved using a UV-vis detector, (Shimadzu, Kyoto, Japan) at 368 nm [55]. The calibration curve was performed with solutions of quercetin in methanol from 1 µg/mL to 100 µg/mL with a good linearity ($r^2 = 0.9999$).

The stability of quercetin in aqueous medium receptor (section 2.6) was established using a calibration curve of quercetin made in PBS buffer at pH 7.4 and Tween 80 (2% mass percentage) from 0.1 to 4 µg/mL ($r^2 = 0.9996$). The mobile phase, flow rate and detection wavelength remained unchanged.

III.3.10 Encapsulation efficacy (EE) and drug loading capacity (DL)

Quercetin loading capacity (DL) and encapsulation efficacy (EE) were determined by HPLC analysis as previously described (section 2.9) using 50 µL of the Q-MM sample solubilized in 950 µL methanol.

The amount of quercetin loaded (Eq.1) and the encapsulation efficacy (Eq.2) were calculated using the following equations:

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{[\text{mass of quercetin}]}{[\text{total mass}]} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

$$\text{Encapsulation efficacy (\%)} = \frac{[\text{amount of encapsulated quercetin}]}{[\text{amount of quercetin initially loaded}]} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

III.3.11 In vitro radical scavenging ability by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH°)

The antioxidant activity of Q-MM loaded with quercetin was investigated by looking at the reactivity of quercetin with the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) [56]. The antioxidant activity was determined by UV-visible spectroscopy from the decrease of the DPPH° radical absorbance at 517 nm using the following DPPH° scavenging equation (Eq.3):

$$\text{DPPH}^\circ \text{ scavenging (\%)} = \frac{\text{Absorption of control} - \text{Absorption of sample}}{\text{Absorption of control}} \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

In which *absorption control* corresponds to the absorbance of 100 µM DPPH° solution. For the antioxidant activity test, the concentration of quercetin in Q-MM was set well below that of DPPH° at 2,5 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 µM.

III.3.12 Cell culture

Mice fibroblasts cell line (NIH3T3) was purchased from American Type Cell Culture organization (USA). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10 % fetal bovine serum (Life Technologies), 1 % L-glutamine and 1 % penicillin/streptomycin equivalent to final concentration of 2 nM for glutamine, 100 U.mL⁻¹ for penicillin and 100 µg.mL⁻¹ for streptomycin and incubated at 37 °C in humidified 5 % CO₂.

III.3.13 Cell viability

NIH3T3 cells were seeded at 20,000 cells/cm² in 96 well plate and incubated for 24 hours at 37 °C, 5 % CO₂ to allow cell adhesion. POx and Brij®58 at 40 g/L were solubilized in DMEM supplemented medium and filtered through 0.2 µm (no mass was lost through filtration).

Cells were treated or not (control) with POx or with the PEG reference (Brij®58) solutions at a concentration range from 0.01 to 20 g/L. After 24 hours of exposure, a CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA), was used to evaluate the cell viability following the manufacturer's instructions. The absorbance was then recorded at 490 nm using Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) and the

background corresponding to wells free of cells (mean of 3) was subtracted from each triplicate mean. Values of treated cells were normalized to non-treated cells (representing the 100 % cell viability).

Influence of a 24 hours treatment with B-MM, crude quercetin, or Q-MM solutions was also performed following the same protocol with quercetin concentrations of 1, 5, 10, 25, 50 µg/mL. The absorbance background of the formulations without cells was subtracted to the cellular tests.

III.3.14 Antioxidant effect of quercetin on NIH3T3 cells

NIH3T3 cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96 well black plate with clear bottom (Corning® Massachusetts, USA) and incubated 24 hours at 37 °C, 5 % CO₂ to allow cell adhesion. Then B-MM, crude quercetin, or Q-MM at a quercetin concentration of 5 µg/mL were added and incubated for another 24 hours in supplemented DMEM. Cells were washed twice with PBS before addition of 200 µL of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) reagent (20 µM in DMEM without phenol red). A serum free media was used to avoid deacetylated the DCFDA from serum esterases into a non fluorescent compound, which can later be oxidized by ROS into DCF resulting in erroneous data.

After 30 minutes incubation at 37 °C, 5 % CO₂, cells were washed with PBS and placed in 200 µL DMEM without phenol red. A solution of *tert*-Butyl hydroperoxide (TBHP) (500 µM in PBS) was then added and the cells were incubated for 30 additional minutes. The fluorescent signal of dichlorofluorescein (DCF) generated by the reaction of DCFDA reagent with ROS was then measured (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 535 nm) using Tristar LB941 Spectrofluorimeter (Berthold Technologies, Germany). Values of treated cells were normalized to non-treated cells (representing the cells with 100 % ROS intensity).

III.3.15 Statistical analysis

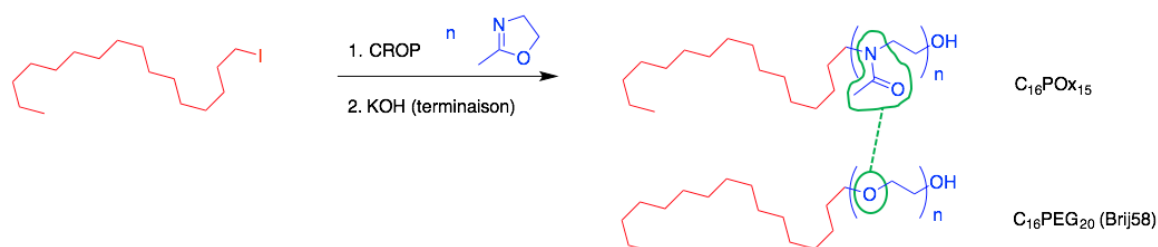
The statistical analysis of the data resulting from the cell viability and the antioxidant effect on cells was conducted with OriginPro software 8.1 (OriginLab, USA). A one-sample t-test with equal variance was performed to compare cell viability or antioxidant effect with formulations to viability of untreated cells (100 %). A two-sample t-test with unequal variances was carried out to compare cell viability of formulations two by two. The P value reflects the significance with * =P <0.05, ** =P <0.01 and *** =P < 0.001.

III.4 Results

III.4.1 Synthesis of amphiphilic POx

Amphiphilic POx considered as nonionic surfactants were synthesized from iodide initiators and potassium hydroxide as terminating agent (Scheme 2). The hydrophilic lipophilic balance (HLB) of the polymers depends on the length of the POx block predefined by the initial monomer/initiator molar ratio. In our case, 1-iodohexadecane was employed to elaborate $C_{16}POx_{15}$ with narrow dispersity. The nonionic surfactant was well characterized by 1H NMR spectroscopy with typical signals related to terminal CH_3 unit of hydrophobic block at 0.85 ppm and the CH_2 of POx block at 3.2-3.7 ppm. The integration of these signals corresponds to the average degree of polymerization representing the length of the POx block, in our case 15. The molecular mass of the amphiphilic POx synthesized is 1520 g/mol and the measured critical aggregation concentration (CAC) is at ~ 100 mg/L.

The chemistry of POx platform looks like the one of PEG using a ring-opening process of polymerization from cyclic monomer, 2-R-2-oxazoline for POx and ethylene oxide for PEG. However, the polymerization process differs for oxazolines with a cationic ring-opening polymerization (CROP) whereas for ethylene oxide an anionic one occurs. It should be noted that the high toxicity of ethylene oxide, gaseous at room temperature, required specific equipments and cautious handling which is not the case for oxazolines. To evaluate some of the POx surfactant properties, PEG surfactant named Brij[®]58 (reference) was selected based on its similar length alkyl chain as it is the driving force of the self-assembly. Its molar mass of 1125 g/mol and CAC of 90 mg/L are also quite similar from the POx surfactant one.



Scheme 2: Synthetic route of $C_{16}POx_{15}$ and structure of the Brij[®]58 used as a reference

The surfactant properties of amphiphilic polymers in water were estimated by tensiometry measurements using the Wilhelmy plate method [57]. It allows determining the critical aggregation concentration (CAC) value of surfactive molecules from the inflexion point occurring between a rapid decrease of surface tension at low concentrations and an almost constant value of the surface tension at higher concentrations. The CAC of $C_{16}POx_{15}$ was thus estimated at 100 mg/L (65.9 μ mol/L) (data not shown) at 25 °C.

III.4.2 POx toxicity on NIH3T3 cells in comparison with PEG reference

The influence of POx ($C_{16}POx_{15}$) versus PEG reference (Brij[®]58) for a 24 hours treatment on NIH3T3 cell viability was conducted by treating cells with increasing concentrations from 0.01 to 20 g/L (Figure 1). Results were normalized to non treated cells (representing 100 %).

For concentrations ranging from 0.01 to 0.05 g/L no significant cell viability decrease was observed for both POx ($C_{16}POx_{15}$) and PEG reference ($C_{16}PEG_{20}$). By contrast, following a 0.1 g/L Brij[®]58 ($C_{16}PEG_{20}$) treatment, cell viability fell to 2 ± 2 % versus 120 ± 9 % for POx ($C_{16}POx_{15}$). A decrease of cell viability

was observed for POx ($C_{16}POx_{15}$) to 46 ± 11 % only at 0.5 g/L. To summarize, following treatment from 0.1 to 0.2 g/L, POx has significantly ($P < 0.001$) less impact on cell viability than PEG reference. Interestingly, IC_{50} (cellular viability) of the PEG amphiphilic reference was estimated at 0.09 g/L versus 0.47 g/L for amphiphilic POx.

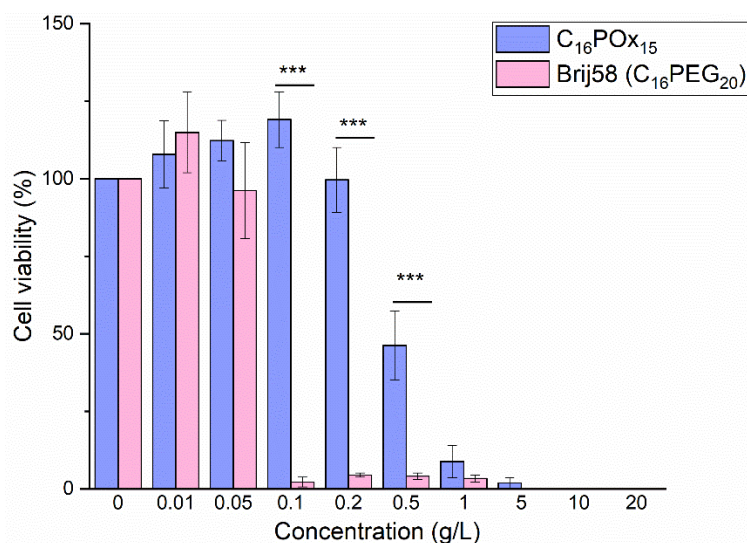


Figure 1: Cell viability of mice fibroblast NIH3T3 co-incubated with increasing concentration of amphiphilic POx ($C_{16}POx_{15}$) compared to amphiphilic PEG surfactant Brij® 58 ($C_{16}PEG_{20}$) for 24 h ($n=3$). Statistical analysis was performed by a two-sample t-test between POx and PEG values (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

III.4.3 Particle size and surface charge of mixed micelles

MM composed of PC and POx, with or without quercetin, were produced by thin film method and a high pressure homogenizer process (HPH) [58]. Table 1 summarized the average particle size and zeta potential of B-MM and Q-MM. The loading of the MM with quercetin did not influence their diameter with a particle diameter of 19 ± 2 nm (Q-MM) instead of 18 ± 2 nm without quercetin (B-MM). It can be noted that, no light scattering from crude quercetin, which tends to aggregate from $2.5 \mu\text{g/mL}$ in PBS, was observed in Q-MM solutions. NTA measurements were in agreement with DLS data. The zeta potential for both blank and loaded MM was measured at 0 mV, indicating that the formulations had no charge at the surface.

Table 1: Mixed micelles structure characteristics

Formulations	B-MM	Q-MM
Particle diameter (nm)	18 ± 2	19 ± 2
PDI	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.01
Zeta potentiel (mV)	0.05 ± 0.08	0.03 ± 0.05

III.4.4 Morphology of mixed micelles

The morphology of MM was investigated by transmission electron microscopy. Figure 2 shows typical images for Q-MM. Both B-MM and Q-MM exhibit a spherical shape and a similar size of about 20-30 nm. This is in agreement with the diameter of particles obtained from DLS analysis (Table 1).

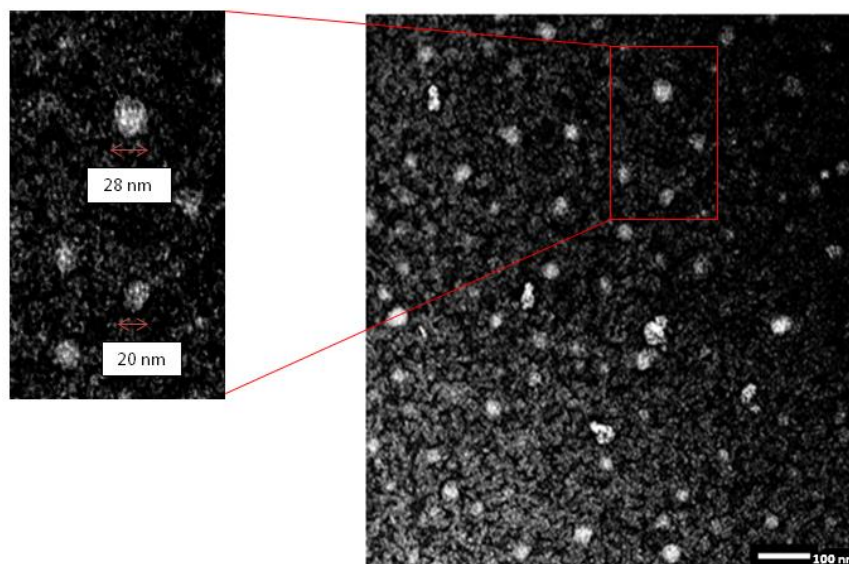


Figure 2: TEM images for Q-MM

III.4.5 DSC analysis of Q-MM

The crystallinity of quercetin as powder and once formulated in Q-MM was evaluated by differential scanning calorimetry, as illustrated in Figure 3. Before the Q-MM measurement, the formulation was concentrated twice and lyophilized. The crude quercetin exhibited two peaks, one at 155 °C and 323 °C, which are consistent with the literature. The first one is due to water evaporation [59] and the second one results from melting of the quercetin [60]. The glass transition of POx only appears at 37 °C (Figure 1S). It is interesting to note that this glass transition was not observed on the Q-MM thermogram. More importantly, no peak for the quercetin crystallization could be observed. This indicates that nano-objects possess amorphous character, probably resulting from an homogeneous distribution of quercetin in the mixed micelle core.

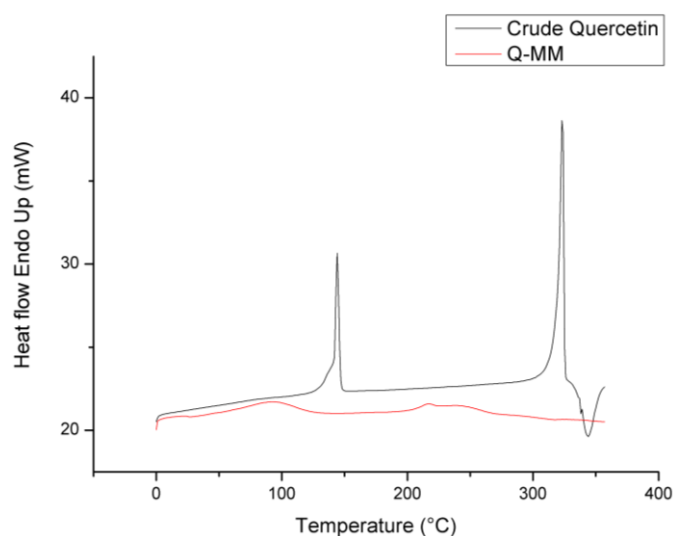
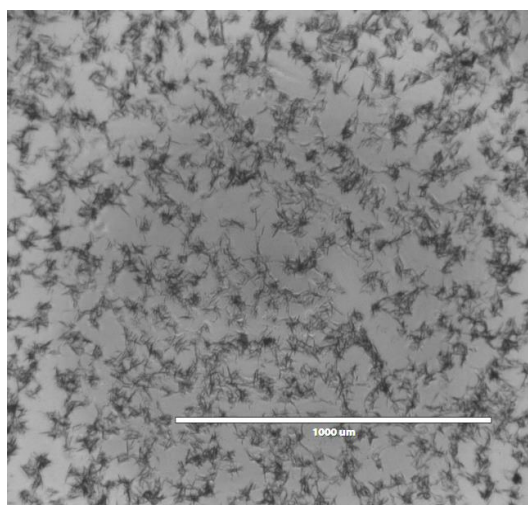


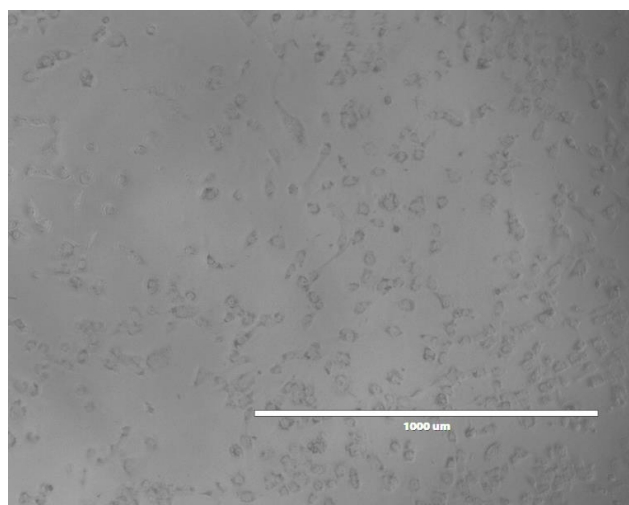
Figure 3: Thermograms properties of crude quercetin and Q-MM

The difference of quercetin structure revealed by DSC was also observed on NIH3T3 mice fibroblasts cells 24 hours after addition of the Q-MM and the crude quercetin to the cells. The quercetin concentration was equivalent in both experiments (50 µg/mL). Optical microscopy clearly revealed the presence of needles on NIH3T3 with quercetin only (Figure 4). Those were missing with Q-MM, i.e.

once quercetin has been loaded in mixed micelles (Figure 4). This argues in favor of an homogenous distribution of quercetin in MM.



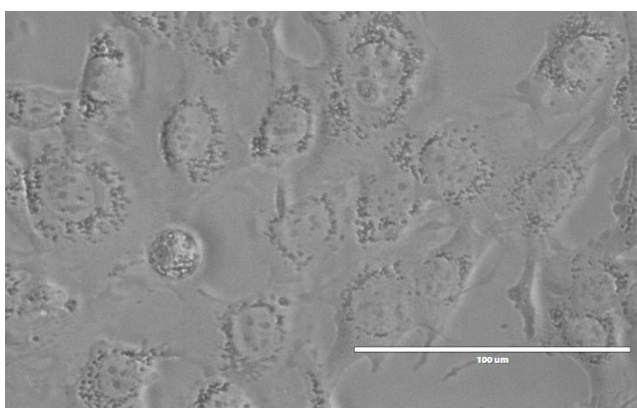
Crude quercetin at 50 µg/mL x4



Q-MM at 50 µg/mL x4



Crude quercetin at 50 µg/mL x40



Q-MM at 50 µg/mL x40

Figure 4: Optical microscopy images of crude quercetin and Q-MM on NIH3T3 cells.

III.4.6 Formulation stability studies of B-MM and Q-MM

The formulation stability of the B-MM was assessed over a month and evaluated every week at 4, 25 and 37 °C by analyzing the hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of MM using DLS experiments as shown in Figure 5. The B-MM remained stable over a month at each temperature, for example at 37 °C only a slight size increase from 24 nm to 31 nm with a PDI ≤ 0.3 was observed, thus indicating the good stability of the nano-formulations upon time and temperature.

As quercetin is very sensitive to thermal degradation, the Q-MM stability study was conducted at 4°C. The particles were also stable over the month with a slight variation of the particle size from 26 nm on day 0 to 22 nm on day 28 with a slight increase of PDI.

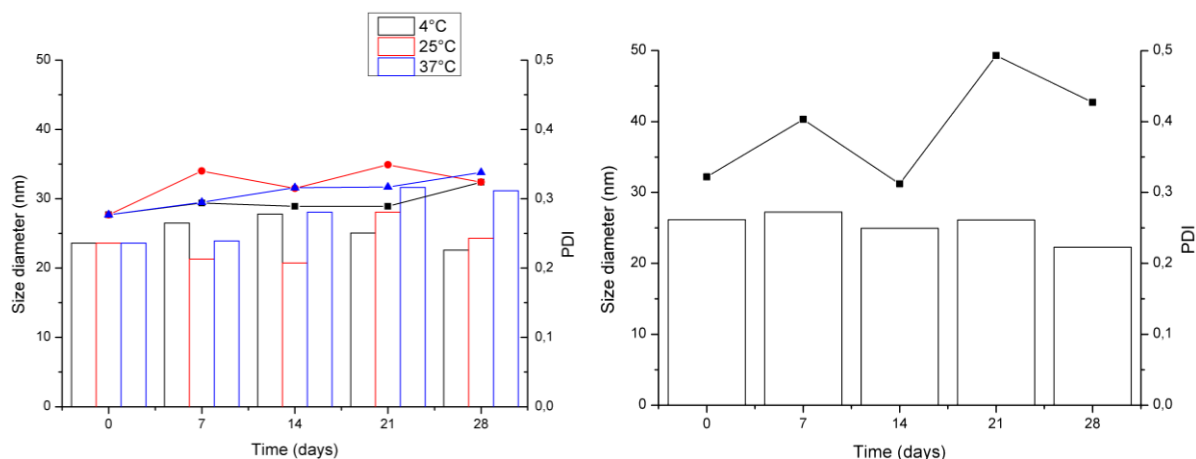


Figure 5: Particle size (column) and PDI (symbols) of B-MM at 4, 25, 37 °C (left) and Q-MM at 4 °C (right) over a month (n=3).

The stability of the Q-MM has also been evaluated through the release of quercetin over time, which should happen after decomposition on skin before the formulation had penetrated in the epidermis. To this end, a suspension of Q-MM was dialyzed in PBS buffer and in presence of Tween 20 (2 mass percentage) for 7 hours. A slight release of quercetin of only 6 % was observed after 7 hours of dialysis (Figure 2S), confirming the above mentioned stability of the quercetin encapsulated MM formulations.

III.4.7 Drug loading (DL) and encapsulation efficacy (EE) of Q-MM

The drug loading (DL) and encapsulation efficiency (EE) for quercetin in Q-MM were calculated from HPLC analysis using the equations 1 and 2 described in section 2.10. DL reflects the amount of loaded quercetin relative to the total lipid excipients of the MM formulation, whereas EE represents the amount of quercetin experimentally encapsulated by comparison with the amount of quercetin added in solution. DL for this dermal delivery system was evaluated to 3.6 ± 0.2 % corresponding to an EE of 94 ± 4 %.

III.4.8 Mixed micelles cellular viability on NIH3T3

The cell viability test was performed on mice fibroblasts (NIH3T3) co-incubated with crude quercetin, B-MM and Q-MM at concentrations ranging from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figure 6). Results were normalized to non-treated cells (representing 100 %). After 24 hours, crude quercetin treatment induced a decrease in cell viability reaching 72 ± 9 % at quercetin concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. By contrast no significant decrease in cell viability was observed when cells were treated with B-MM, at all concentrations. Interestingly, the quercetin encapsulated in MM showed less toxicity than the crude antioxidant at equivalent concentration of quercetin. For example at 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the crude quercetin cell viability was determined at 33 ± 17 % and the one for Q-MM was twice higher at 65 ± 8 %. The IC_{50} (cellular viability), was determined at 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for crude quercetin and 37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for Q-MM evidencing a lower impact of quercetin on cell viability once encapsulated in Q-MM.

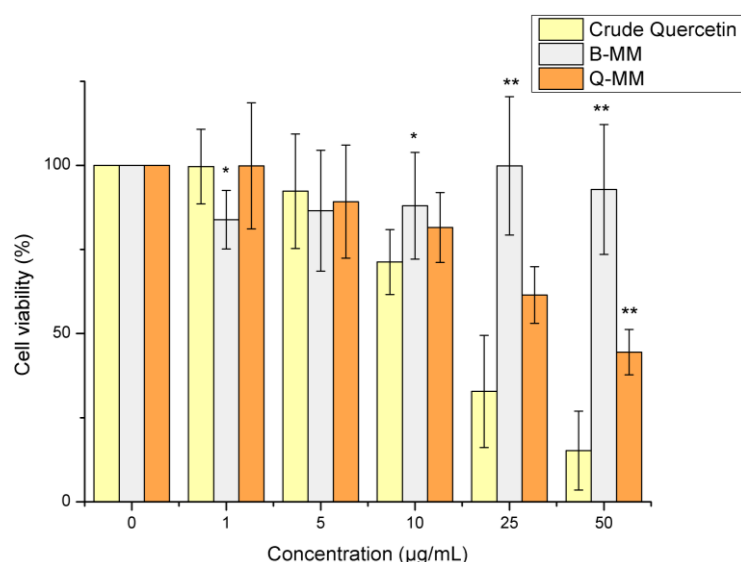


Figure 6: Cell viability of mice fibroblasts (NIH3T3) co-incubated with crude quercetin, B-MM and Q-MM for 24 h ($n=3$). Statistical analysis was performed by a two-sample *t*-test between crude quercetin and B-MM, Q-MM (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$).

III.4.9 Antioxidant effect

III.4.9.1 *In vitro* radical scavenging ability of Q-MM

The radical scavenging ability of the crude quercetin and Q-MM was investigated with *in vitro* test using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) as a radical source. The quercetin antioxidant reacts with the free radical located at the hydrazine position of the DPPH°, thus leading to the reduced form: hydrazine (DPPHH) and decreasing the radicals. The DPPH test allowed to determine the IC_{50} (DPPH° inhibition) value: the concentration of quercetin for which 50 % of the DPPH° reacted. Figure 7 illustrates the DPPH° inhibition with quercetin concentration ranging from 2,5 to 15 µM for the free quercetin and encapsulated in MM (Q-MM). The IC_{50} (DPPH° inhibition) values deduced from those measurements were 9 µM (3.6 µg/mL) for the free quercetin and 6.5 µM (2.6 µg/mL) for Q-MM. This indicates that the radical scavenging activity of quercetin was preserved upon encapsulation and even enhanced with respect to crude quercetin since its IC_{50} value was lower.

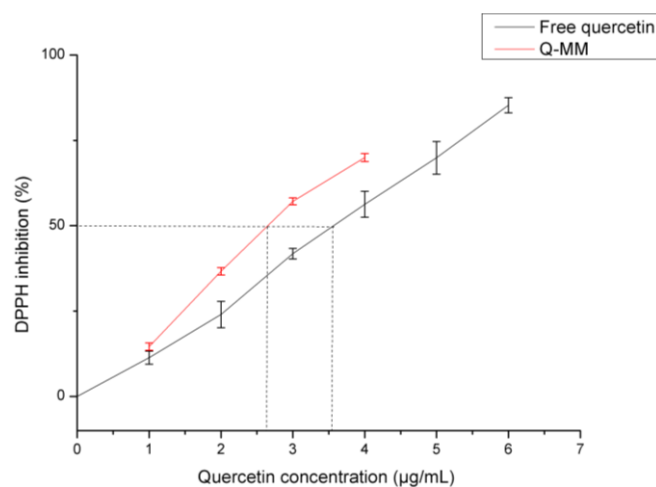


Figure 7: DPPH° inhibition of free quercetin and Q-MM with quercetin concentration

III.4.9.2 Cellular testing on NIH3T3 with TBHP

The antioxidant activity of the Q-MM was tested on mice fibroblasts (NIH3T3) in comparison with crude quercetin and B-MM (Figure 8). A quercetin concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was selected as no decrease in cell viability was observed regardless of the formulation.

Cells were first treated with formulations for 24 hours before being washed and labeled with 2,7-dichlorofluorescein (DCFDA). The oxidative stress was then induced by tert-butyl hydroperoxide (TBHP) for 30 minutes before measuring the fluorescence intensity signal. A serum free medium was used to avoid deacetylated the DCFDA from serum esterases into a non fluorescent compound, which can later be oxidized by ROS into DCF resulting in erroneous data.

The results were normalized to TBHP treated cells (positive control) and the untreated cells were set as negative control. The addition of TBHP increased the ROS generated by $25 \pm 2 \%$ ($P < 0.001$) compared to negative control. The crude quercetin and Q-MM formulation significantly reduced generated ROS by $36 \pm 3 \%$ and by $42 \pm 2 \%$ respectively compared to cells treated with TBHP. The antioxidant activity of the quercetin was maintained once formulated in MM. No significant difference in the antioxidant activity of crude quercetin versus Q-MM was evidenced.

Therefore Q-MM was able to scavenge the excess of ROS allowing a recovery to basal ROS concentration values. The antioxidant effect of the Q-MM seems to be only due to the quercetin encapsulated in the formulation as the ability of B-MM to reduce ROS was very low.

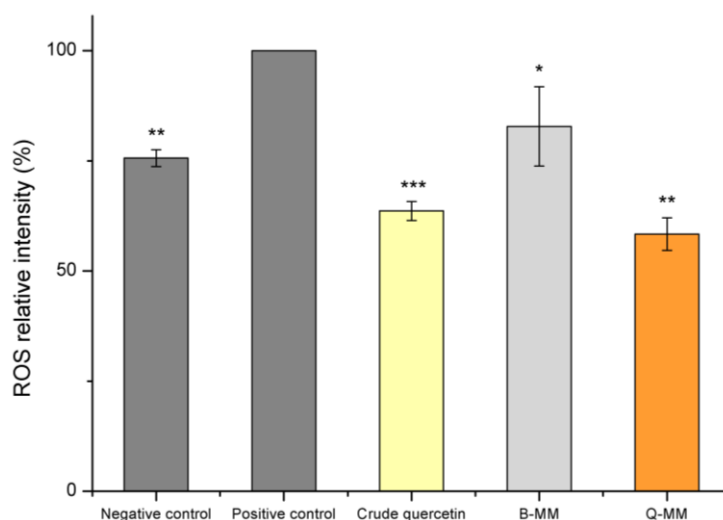


Figure 8: ROS relative intensity for crude quercetin, B-MM and Q-MM (quercetin concentration 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($n=3$). Negative control was untreated cells (without TBHP or formulations) and positive control was cells treated with TBHP without formulation. Fluorescent intensity was normalized to TBHP treated cells (positive control). A one sample t-test relative to positive control cells was performed (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$).

III.5 Discussion

Two aspects were investigated in this study: (i) the stability of mixed micelles formulated with POx as alternative to PEG and (ii) quercetin loading and quercetin antioxidant efficiency in these POx-formulations (Q-MM). Among all the previously developed formulations for topical delivery of quercetin [15], mixed micelles were selected as the first proof of concept for antioxidant POx-formulations. These formulations were constituted of phosphatidylcholine and an amphiphilic poly(2-methyl-2-oxazoline) molecule bearing a long alkyl chain (POx, C₁₆POx₁₅).

The surfactant property of POx itself was first evaluated. It presents a critical aggregation concentration (CAC) of ~ 100 mg/L, which is similar to structural analogue Brij®58 used as a reference. In contrast, the impact of the two amphiphilic molecules on cell viability was very different. A better cell viability in presence of POx (Figure 1) was highlighted with a IC₅₀ (cellular viability) of 0.47 g/L compared to 0.09 g/L for Brij®58. The POx concentration for formulation of mixed micelles was about 50 times under the IC₅₀ (cellular viability) of POx, ensuring non toxic working conditions. Therefore, POx was proved to have significantly ($P < 0.001$) less impact on cell viability than its PEG equivalent. These results are consistent with the literature since the polyoxazolines polymer family is known to have an excellent cytocompatibility and hemocompatibility [28]. However, it is the first time that an amphiphilic POx with such architecture (C₁₆POx₁₅) was investigated. Then, this amphiphilic POx was associated with phospholipids to increase the solubility of hydrophobic antioxidant within the micelles. The mixed micelles of phosphatidylcholine stabilized by C₁₆POx₁₅ (B-MM) were produced using thin film process. After a high pressure homogenization, the formulation presented a reduced homogeneous particle size of 18 ± 2 nm (Figure 2). These DLS and CAC results confirmed that nanosized mixed-micelles were created and not POx micelles and liposomes coexisting.

The same process was used in the presence of quercetin, leading to an excellent encapsulation efficiency that reached up to 94 ± 4 %. This allowed a particularly high concentration of antioxidant in the formulations to be loaded (3.6 ± 0.17 %), which reached 188 µg/ml in Q-MM instead of 2.48 µg/ml in PBS. It was shown that neither the spherical shape nor the particle size of MM were modified upon loading with quercetin (Q-MM) (Table 1). This contrasts with the existing hybrid nanosystems DPPC : MPOx [53] for which the incorporation of indomethacin (with the same molar mass as quercetin and the same nature of polycyclic aromatic ring) induced a significant size increase. The incorporation efficiency was also significantly lower with a maximum of 17 %. Looking at some others lipid formulations for topical delivery of quercetin the encapsulation efficiency, drug loading and particle size reached with the Q-MM (94 %, 3.6 %, 19 nm), are more satisfactory than nanostructured lipid carriers (89.95 %, 3.05 %, 215.2 nm) [18], phospholipids based vesicles (48-75 %, NV (no value), 80-220 nm) [17], lecithin-chitosan nanoparticles (48.5 %, 2.45 %, 100 nm) [19], and nanovesicles (81-91 %, NV, 80-110 nm) [61]. Moreover, the nanometric size obtained for the MM formulation is particularly interesting since it is known to ensure enhanced penetration into skin [62].

Concerning the quercetin dispersion in Q-MM, a thermal analysis performed by DSC corroborated by microscopy (Figure 4) indicated that quercetin was well dispersed in the core of Q-MM, losing its crystalline character in favor of an amorphous phase [59], [60]. This feature also indicates that once the Q-MM has penetrated into skin, quercetin should be easily released out of the formulation.

To evaluate POx formulation stability, the size and PDI of B-MM and Q-MM were measured every week at various temperatures (4, 25 and 37 °C) for 28 days. B-MM remained stable at all 3 temperatures reflecting the high stabilizing capacity of POx. Regarding Q-MM, since quercetin is very sensitive to

thermal degradation [63] even at 25 and 37 °C leading overtime to antioxidant degradation into intermediate products, the stability study was only conducted at storage condition 4 °C, as also performed by Bose et al [16]. The size of Q-MM remained around 26 nm over the month thus validating the stability of the loaded MM. MM thus represents a stable quercetin formulation as a low quantity of quercetin (less than 6 %) was released *in vitro* from the formulation over 7 hours. All the results demonstrated the efficiency of POx to stabilize MM formulation and its ability to load a large amount of antioxidants such as quercetin, indicating this formulation is promising for topical application. Indeed, the lipid composition of the MM along with the presence of POx could facilitate the delivery of quercetin in the skin epidermis [64], [65].

The cellular viability of crude quercetin, B-MM and Q-MM was evaluated on mice fibroblasts after 24 hours of exposure. With a quercetin concentration from 10 to 25 µg/mL, cell viability dropped from 72 ± 9 % to 33 ± 17 % for crude quercetin whereas a slighter decrease for Q-MM (from 82 ± 10 % to 62 ± 8 %) was observed (Figure 6). This evidenced the interest of quercetin in association with MM. This statement is also highlighted by difference in IC₅₀ (cellular viability) values, as crude quercetin has a value twice higher than Q-MM (17.5 µg/mL versus 37.5 µg/mL respectively). Moreover, it has been confirmed that the effect of Q-MM was only due to the quercetin itself as B-MM had no impact on cell viability. These results confirmed the cell viability study of polyoxazolines (Figure 1) in which POx had no impact on cell viability over a broad concentration range including the one used for MM formulation (about 15 mg/L). MM formulations were concentrated enough in quercetin so their antioxidant efficacy could be evaluated.

The antioxidant activity of Q-MM related to crude quercetin was first evaluated *in vitro* using DPPH assay, to ensure that the radical scavenging activity of quercetin was preserved and was even enhanced once encapsulated. The IC₅₀ (DPPH[•] inhibition) value of Q-MM compared to crude quercetin decreased from 9 to 6.5 µM (equivalent to 3.6 to 2.6 µg/mL). The Q-MM antioxidant capacity also relies on POx being more stable regarding oxidative degradation compared to PEG: the polyether backbone is more prone to oxidative degradation [66]. To evaluate the ability of quercetin to counteract the oxidative stress induced by ROS, mice fibroblasts were used as a cellular model with an oxidative stress induced by TBHP. The antioxidant efficacy of the quercetin was maintained once encapsulated in Q-MM. By comparison, crude quercetin was able to reduce the ROS generated by TBHP by 36 % whereas Q-MM decreased them by 42 % (Figure 8). Moreover, Q-MM was able to scavenge the excess of ROS allowing a recovery to basal ROS concentration values (about 75 % as measured with untreated cells). Since the toxicity of Q-MM was lower than crude quercetin, the concentration for the antioxidant test could be increased for a potentially even higher efficacy on cells.

III.6 Conclusion

This study on amphiphilic polyoxazolines ($C_{16}POx_{15}$) provides insight into the great promise this polymer family holds for the development of pharmaceutical and cosmetic formulations. The higher cell viability (at a similar CAC value) compared to Brij®58, a worldwide used industrial nonionic surfactant, demonstrates the potential of this POx family in the formulation of API. The ability of the amphiphilic POx to produce stable formulations was investigated for the first time with mixed micelles of POx and phosphatidylcholine using thin film and HPH process. DLS and TEM measurements showed spherical vesicles of around 18 nm without API (B-MM) and no size increase once loaded in a natural antioxidant quercetin (Q-MM). These mixed-micelles were stable over 28 days and present a long-lasting encapsulation with less than 6 % release over 7 hours. Moreover, a good quercetin encapsulation (94 ± 4 %) efficiency was measured with these nanosystems allowing its homogeneous solubilization in the core under amorphous character. Therefore, Q-MM can be used as a reservoir of quercetin. Once loaded in the MM, the quercetin impact on cell viability was twice reduced while the quercetin antioxidant efficacy was preserved. Q-MM was able to reduce by 42 % of the ROS generated by TBHP allowing a recovery to basal ROS concentration values.

Optimal features such as composition, size, stability, encapsulation efficiency, preservation of antioxidant activity are brought together in the mixed micelles, a very promising formulation for an effective topical delivery to the deepest layer of the epidermis. Future studies will focus on the evaluation of the penetration capacity of amphiphilic polyoxazolines and Q-MM and the topical delivery of quercetin in *in vivo* testing.

III.7 Supplementary information

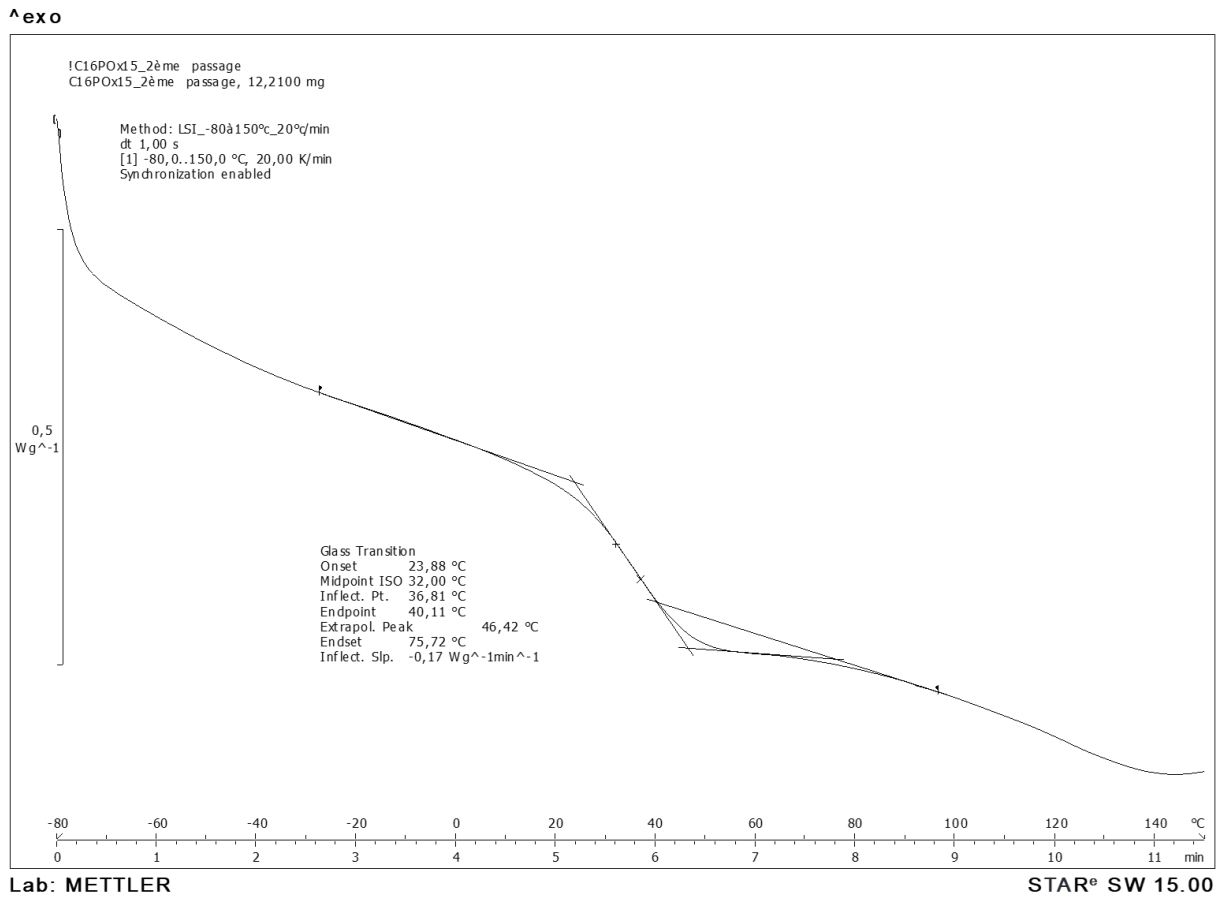


Figure 1S: DSC curve of C₁₆POx₁₅ at 20 °C.min⁻¹

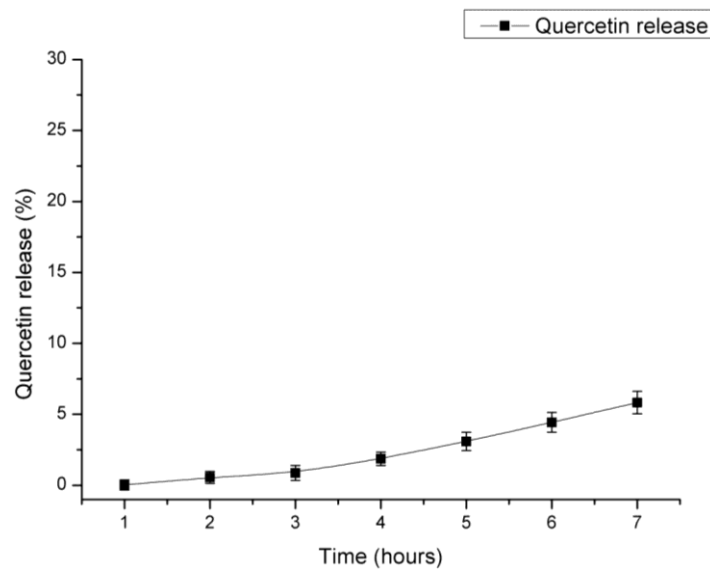


Figure 2S: Quercetin release of loaded MM related to time.

IV. Les nanocapsules lipidiques

Enfin, nous avons voulu développer une formulation plus originale connue pour présenter un taux d'encapsulation élevé et qui permet d'optimiser la pénétration topique : les nanocapsules lipidiques (LNC) (travaux de thèse Dr T. Hatahet). Nous avons ainsi démontré qu'il était possible d'adapter la formulation des LNC en substituant les PEG par des POx *via* la modification de nombreux paramètres du procédé. Les LNC chargées en quercétine présentent un cœur huileux, une coque rigide de phospholipides et une couronne stabilisante de POx. La viabilité cellulaire des LNC chargées en quercétine et leur activité antioxydante ont été évaluées sur des cellules de fibroblastes murins (NIH3T3). Grâce à une collaboration avec le laboratoire de ISEM (Montpellier), nous avons pu comparer et démontrer leur efficacité sur des cellules kératinocytes humaines par rapport aux LNC originelles de PEG.

Les travaux réalisés autour de cette formulation ont fait l'objet d'un article dans le journal *International Journal of Pharmaceutics* publié en février 2020 (DOI : 10.1016/j.ijpharm.2020.119126) [67], qui est présenté ci-dessous.

Polyoxazolines Based Lipid Nanocapsules for Topical Delivery of Antioxidants

L. Simon¹, V. Lapinte¹, L. Lionnard², N. Marcotte¹, M. Morille¹, A. Aouacheria², K. Kissa³, J.M. Devoisselle¹, S. Bégu^{1*}

1: ICGM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

2: ISEM, Univ Montpellier, CNRS, EPHE, IRD, Montpellier, France

3 : DIMNP, Univ Montpellier, CNRS, Montpellier, France

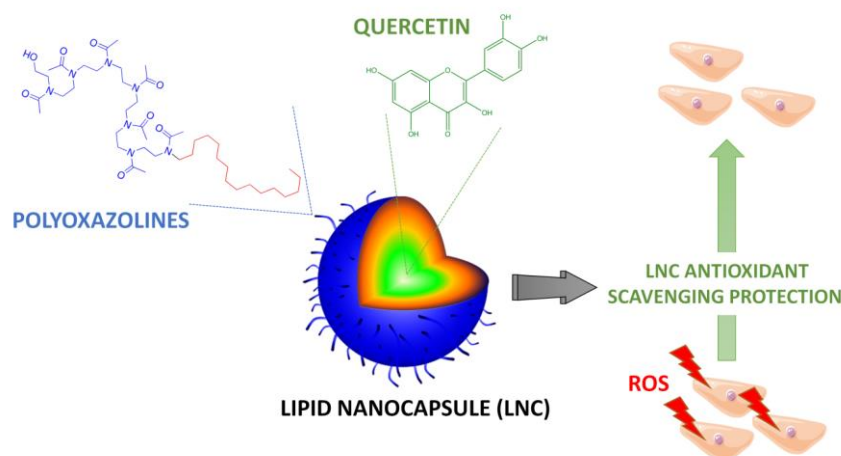
Abstract

Nano-sized lipid formulations offer a great potential for topical delivery of active compounds to treat and prevent human skin damages. Of particular importance is the high loading of hydrophobic molecules, the long-term stability and the auspicious penetration capacity especially reached when using lipid nanocapsules (LNC). Unfortunately, their formation currently relies on a phase inversion process that only operates when using a poly(ethylene glycol) (PEG) based surfactant belonging to the controversial PEG family that was subject of clinical awareness. The present study proposes an alternative to this overused polymer in formulations by designing LNC made of harmless amphiphilic polyoxazolines (POx). Implementing a short sonication step in the process allowed well-defined spherical nanoparticles of ~30 nm to be obtained. The structure of the so called LNC POx was composed of an oily core surrounded by a rigid shell of phospholipids and POx, which ensures a high stability over time, temperature, centrifugation and freezing. Encapsulation of the natural quercetin antioxidant led to a drug loading three times higher than for LNC constituted of PEG (LNC PEG). The antioxidant activity of loaded LNC POx was tested on mice fibroblasts and human keratinocytes after exposure to free radicals from peroxides and UVB irradiation, respectively. The radical scavenging

capacity of quercetin loaded in the LNC POx was preserved and even slightly enhanced compared to LNC PEG, highlighting the POx value in nanoformulations.

Key words: Antioxidant, Lipid nanocapsules, PEG free, Polyoxazolines, Skin protection, Topical delivery

Graphical abstract:



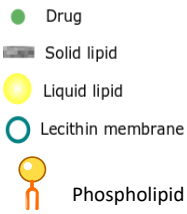
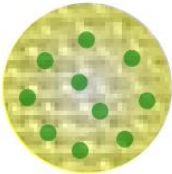
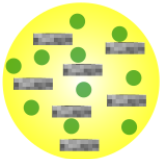
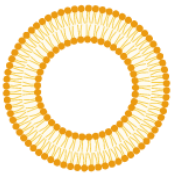

IV.1 Introduction

Environmental factors such as UV radiations, pollution or tobacco have a negative impact on human skin by accelerating skin aging and potentially leading to skin cancer [9]. Human skin acts as a barrier against this hostile environment thanks to its unique structure and composition. The main protective layer, *stratum corneum* (SC), ensures stiffness and permeability to the skin due to corneocyte cells embedded in a lipid matrix [68]. The vital barrier function of the SC then becomes a hurdle to overcome when delivery of active compound (AC) to the deepest layer of the skin is concerned (e.g. the imiquimod with antimitotics properties). Indeed, only small (less than 500 Da) uncharged lipophilic (logP 1-3) molecules are able to go through the SC [69], whereas the largest or charged ones need to be formulated for a successful delivery through the skin. Topical formulations of lipid nano-sized vectors are one of the preferred solutions since their size allows for enhanced penetration [12]. As a matter of fact, solid or polymeric nanoparticles and colloidal lipid nanocarriers loaded with AC were shown to induce therapeutic effect, crossing through the SC to reach their site of action [69]. Formulating the nanovector with lipid-based colloids increases the epidermis penetration thanks to a fluidization mechanism of the SC lipid barrier. Among the colloidal formulations developed, solid lipid nanoparticle (SLN), nanostructured lipid carrier (NLC), liposome and lipid nanocapsule (LNC) are increasingly exploited due to their enhanced efficiency [69]. It has to be mentioned that adding chemical penetration enhancers (CPE) to the topical formulations facilitates the passive diffusion of the AC once into the deepest layer of the skin [70].

The structure of the main lipid-based formulations used for topical delivery of AC is schematically depicted in Table 1. Also listed are the composition of the lipid formulations, some physical parameters and the advantages and drawbacks of the corresponding nanovector. Liposomes, the oldest known lipid-based formulation systems, consist of a lipid bilayer of phospholipids delimiting an inner aqueous core. Such structure allows liposomes to encapsulate either hydrophilic or hydrophobic active pharmaceutical ingredients that can diffuse through the skin layers, after the liposomes have adsorbed on the skin surface and merged with the lipid matrix [71]. Contrary to

liposomes, SLN, NLC and LNC possess an oily core. SLN are composed of a solid lipid core at room temperature that is stabilized by a polymer shell, whereas the NLC core is made of a mixture of liquid and solid lipids surrounded by a surfactant layer [62]. SLN and NLC interact with the SC and create a lipid rearrangement facilitating drug penetration [72]. Only LNC possesses an oily liquid core surrounded by a rigid surfactant and phospholipid membrane [73].

Table 1: Properties and features of NLC, SLN, LNC and liposome formulations

Type of lipid formulation	Solid lipid nanoparticles (SLN)	Nanostructured lipid carriers (NLC)	Liposomes	Lipid nanocapsules (LNC)
				
Composition	Solid lipid core with polymer shell [62]	Mixture of solid and liquid lipid core and surfactant layer [62]	Lipid bilayer enclosing an aqueous core [74]	Liquid lipid core surrounded by a solid membrane from lecithin and surfactant [73]
Size	40- 1000 nm [71]	40- 1000 nm [71]	20-3000 nm [71]	20-100 nm [73]
Preparation method	Hot or cold HPH [62] or microemulsion technique [75]	Hot or cold HPH [62] or microemulsion technique [75]	-Bangham method -Detergent depletion method -Injection method...[76]	PIT [77]
Advantages	Biocompatibility, drug protection against degradation [71]; low toxicity and feasible scaling up [74]	Higher stability and DL than SLN [75]	Flexibility and deformability; high DL of hydrophilic AC [71]	Better encapsulation and greater stability [73] than SLN and NLC; excellent tolerability for dermal application [74]

Disavantages	High degree of order leading to low DL [74]	Lower skin permeation than LNC [74]	Low capacity to encapsulate lipophilic drug; presence of traces of organic solvent; unstable in biological fluid [73]	Low DL of hydrophilic AC [73]
---------------------	---	-------------------------------------	---	-------------------------------

Abbreviations: HPH: High pressure homogenizer, PIT: Phase inversion process, DL: Drug loading

Among all those lipid based nanoformulations, LNC demonstrates higher performances for topical delivery of a model compound as AC. Indeed, they allow similar permeation as SLN and NLC with a reduced intradermal drug accumulation and exhibit a better stability and a higher loading efficiency [78]. LNC are usually formed by a low energy process using the phase inversion method, which was initially developed by Heurtault et al. [77]. It relies on the properties of the nonionic surfactant polyethylene glycol (15)-hydroxystearate, which possesses a temperature-dependent hydrophilic-lipophilic balance (HLB) allowing emulsions to switch from oil in water to water in oil [79]. After three heating and cooling cycles, the induced phase inversion is cooled down and diluted leading to LNC with a size of 20-100 nm [73]. The *in vitro* and *in vivo* skin penetration study of the LNC prepared with ropivacaine as an AC showed an apparent morphology change of the SC, proving the transdermal delivery potency of this type of formulations [80]. Moreover, studies for the topical delivery of quercetin showed superior penetration capacity of LNC compared to liposomes and smart crystals formulations, and the possibility to deliver the antioxidant to the viable epidermis upon application to human skin *in vivo* [15]. This makes LNC the most promising lipid formulation for skin penetration and delivery to the epidermis.

Despite all the advantages of LNC for topical delivery, this lipid-based formulation suffers from its exclusive reliance on polyethylene glycol (PEG) surfactant. Indeed, PEG was proved to generate an immune response [81], [23] and accumulate in body tissues [24], [25]. This represents a major drawback in the development of LNC for many applications ranging from nanomedicine to cosmetics. The clinical awareness on PEG overuse makes it particularly important to design new biocompatible surfactants as an alternative to the controversial PEG. In that context, we aimed at developing LNC devoid of PEG.

We proposed to use poly(2-R-2-oxazoline) (POx), a class of polymers with a peptidomimetic structure belonging to the polyamide family, as a surfactant for LNC formation. Indeed POx offers interesting properties such as its cytocompatibility and hemocompatibility [28], in addition, it possesses a stealth behavior [33] and its HLB is easily tunable through synthesis [38]. It also holds great promise as a platform polymer for drug delivery [36]. As recently reviewed by Luxenhofer [28], POx-based formulations with solid dispersions (Paclitaxel, curcumin, Doxorubicin) and drug formulations have already been described as well as theranostic drug delivery systems incorporating proteins and gene complexes and using partially hydrolyzed POx [82]. Recently, we also demonstrated the ability of POx to formulate stable mixed-micelles loaded with quercetin while maintaining its antioxidant activity [83].

In the present work, we evaluated the potency of POx to stabilize lipid nanocapsules, called LNC POx, for topical delivery. A new process allowing stable LNC POx to be obtained was developed. LNC POx

was loaded with a natural flavonoid antioxidant, the quercetin (Q), which was previously studied for topical delivery in various formulations [11]. The model compound was chosen due to its readily assessable, reported antioxidant activities [12] and used to prove LNC POx efficacy as a topical platform to protect and maintain bioactivity. The physico-chemical and mechanical properties of LNC POx were evaluated, and their effect on the cell viability of mice fibroblasts was assessed. The antioxidant activity of quercetin loaded in LNC POx was evaluated. Finally, a comparison study of the radical scavenging capacity of Q-LNC POx and Q-LNC PEG on mice fibroblasts and human keratinocytes was performed to evaluate the ability of Q-LNC POx to protect cells from an excess of radical species.

IV.2 Materials and methods

Materials

Quercetin (95% HPLC), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), phenazine methosulfate (PMS), *tert*-butyl hydroperoxide solution (TBHP) 70% in water, acetonitrile, diethyl ether, methanol, acetone, phosphoric acid and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) were purchased from Sigma Aldrich (Germany). Tween 80[®] (polysorbate 80) was purchased from BASF (Germany) and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) was from Promega (USA). Lipophilic Labrafac[®] (caprylic acid triglycerides) was brought from Gattefossé (Saint-Priest, France) and Lipoid S75[®] (fatfree soybean phospholipids with 70% phosphatidylcholine) was kindly provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride (NaCl) was bought from VWR. MilliQ water was obtained from Milli-Q Gradient A10 (Merck Millipore, Germany) apparatus. Chloroform (for HPLC, stabilized with ethanol) was bought from Carlo-Erba (Carlo Erba Reagent, Spain). All the reagents were used without further purification. Spectra/Por 6 dialysis membranes pre-wetted RC tubing with 0.5-1 kDa MWCO were purchased from Spectrum Labs (USA).

Methods

IV.2.1 LNC POx formulation

The lipid nanocapsule (LNC POx) were obtained by mixing Labrafac[®], Lipoid[®] S75, Milli-Q water, NaCl and amphiphilic polyoxazoline (POx, C₁₆POx₁₅). C₁₆POx₁₅ was synthesized as described in [83]. Three heating and cooling cycles (85 – 30°C) of the mixture were performed under magnetic stirring. The solution was placed in an ice bath and sonicated for 4 minutes at 30% amplitude with a Digital Sonifier 250 sonication probe (Branson Ultrasonics Corporation, USA) using a Microtip 64-247A. Then quercetin was added as a powder to the solution and additional heating and cooling cycle was carried out. A last heating to 80 °C was then performed before addition of 2.5 mL of MilliQ water at 4 °C. The quercetin loaded LNC (Q-LNC POx) obtained was cooled down under magnetic stirring. The unloaded quercetin was separated by filtration through 0.2 µm syringe filter (Whatman). Blank-LNC (B-LNC POx) was prepared by the same method, except that quercetin was removed from the process.

The composition was optimized after doing a ternary phase diagram (POx, Labrafac[®] oil, water) for which the concentration of Lipoid[®] S75 and NaCl were fixed at 1.5% and 3% (w/w) respectively. The composition (w/w) containing 20% of POx, 15% Labrafac[®], 65% water (w/w) and 3% of quercetin was selected for its stability and high drug loading (section 2.6).

All the analyses described bellow were performed on freshly prepared LNC POx preparations. The LNC stabilized by PEG, called LNC PEG, were prepared according to the protocol for quercetin LNC 20 nm developed by Hatahet et al. [14].

IV.2.2 Dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility measurement

Zetasizer NanoZS apparatus (Malvern Instruments, UK) equipped with a He-Ne laser (632.8 nm) was used to evaluate the hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) of LNC POx (20 µL in 1980 µL of MilliQ water) at 20°C at scattering angle of 173°. Zeta potential was measured on 1000 µL of diluted LNC solutions in disposable capillary cell (Malvern Instruments, UK). All the results were average of three independent measurements.

IV.2.3 Stability of LNC

After preparation, the stability study was conducted at 4, 25 and 37°C for the B-LNC POx and at 4°C for the Q-LNC. The stability of the LNCs was assessed by measurements of the hydrodynamic diameter and PDI (see section 2.2). Side studies of LNC stability were conducted using centrifugation at 15000 rpm for 15 minutes and freezing at -22°C in a freezer. The hydrodynamic diameter and PDI were measured at described in section 2.2.

The stability of Q-LNC POx at 25°C was also evaluated by studying the *in vitro* release of quercetin diffusing through a nitrocellulose dialysis membrane (12 – 14 MWFC Spectra/Pore dialysis membrane from Spectrum laboratories, INC USA). The receptor medium was composed of 40 mL PBS at pH 7.4 with 2 wt% Tween® 80. The quercetin concentration released after 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 hours was measured by HPLC (section 2.7).

IV.2.4 Transmission electron microscopy (TEM)

Transmission electron microscopy was performed on a TEM Jeol 1400 PLUS apparatus (Jeol. Ltbd, Tokyo, Japan) equipped with a Jeol 2K/2K camera. The samples were preliminarily diluted 1000 times before deposition on grids (type Cu formvar carbon) and were negatively colored with an aqueous uranyl acetate solution at 1.5 wt% and pH 5.

IV.2.5 Atomic force microscopy (AFM)

Atomic force microscopy was performed on Nanoman (Bruker Instrument) and monitored by Nanoscope V software. The LNC samples were diluted 100 times in MilliQ water and 5 µL of the solution was deposited on a silicon wafer. The tapping mode and harmonix mode were used after drying of the drop at 37°C. For the tapping mode, PPP NCL tips (Nanosensors) were used at the resonance frequency of 157 kHz. Various amplitude setpoints were tested (from 500 to 250 mV) to modify the resulting force applied onto the sample. The harmonix mode was carried out using HMX-S tips (Bruker Instruments) by applying a force of 10 to 20 nN with a vertical resonance frequency of 48 kHz and horizontal of 791 kHz. No morphology modification of the LNC was observed.

IV.2.6 Encapsulation efficacy (EE) and drug loading capacity (DL)

Drug loading (DL) and encapsulation efficacy (EE) were respectively calculated using the following equations:

$$\text{Drug loading (\%)} = \frac{[\text{mass of quercetin}]}{[\text{total mass}]} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Where total mass represents the mass of POx, Labrafac and quercetin.

$$\text{Encapsulation efficacy (\%)} = \frac{[\text{amount of encapsulated quercetin}]}{[\text{amount of quercetin initially loaded}]} \times 100 \quad (\text{Eq.2})$$

The quercetin loaded in Q-LNC POx was quantified by HPLC (section 2.7) after filtration of the solution through a 0.2 µm filter (Whatman) to remove the residual unloaded quercetin.

IV.2.7 HPLC analysis

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) analysis of quercetin was performed on LC6-2012HT apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) using a Prontosil C18 column (120-5-C18 H5.0 µm, 250x4.0 mm). The detection was achieved using a UV-vis detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) at 368 nm [55]. Acetonitrile/phosphoric acid at 0.2 wt% and pH=1.9 (40/60 %v) was used as mobile phase. The calibration curve was performed with solutions of quercetin in methanol from 1 to 100 µg/mL with a good linearity ($r^2 = 0.9999$). The flow rate was 1 mL.min⁻¹. To determine the concentration of quercetin released to the aqueous medium receptor (see stability study of LNC, section 2.3) a calibration curve realized in PBS buffer at pH 7.4 and Tween[®] 80 (2% wt) from 0.1 to 4 µg/mL ($r^2 = 0.9996$) was used.

IV.2.8 In vitro antioxidant activity

The antioxidant activity of Q-LNC POx was determined from the reactivity of quercetin towards the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH[°]) [56]. It was calculated from the decrease of the DPPH[°] radical absorbance at 517 nm using the following equation (Eq.3):

$$\text{DPPH}^{\circ} \text{ scavenging (\%)} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100 \quad (\text{Eq.3})$$

where *Absorbance of control* corresponds to the absorbance of a 100 µM DPPH[°] solution. Note that the concentration of quercetin loaded in Q-LNC POx (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 µM) was lower than that of DPPH[°].

IV.2.9 Cell culture

Mice fibroblasts cell lines (NIH3T3) were purchased from American Type Cell Culture organization (USA). Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies), 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin equivalent to a final concentration of 2 nM for glutamine, 100 U.mL⁻¹ for penicillin and 100 µg.mL⁻¹ for streptomycin. They were incubated at 37°C in humidified 5% CO₂ atmosphere.

Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEK) were purchased from Promocell (C-123003) and cultured at 37°C in keratinocyte basal medium (C-20216 Promocell) supplemented with the supplement mix keratinocyte from Promocell (C-39016) under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Cells were seeded to reach approximately 80% confluency at the time of treatment or irradiation. UVB irradiation was performed using a BS-02 UV irradiation chamber (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen, Germany). The lamp emits UVB irradiation with a peak at 311–312 nm and partially excludes shorter wavelengths, such as UVA.

IV.2.10 Cell viability

NIH3T3 cells were seeded at 20,000 cells/cm² in 96 well plate and incubated for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ to allow cell adhesion. Cells were treated or not (control) with quercetin, POx (B-LNC POx, Q-LNC POx) and PEG (B-LNC PEG, Q-LNC PEG) preparation. After 24 hours of exposure, a CellTiter 96[®] Aqueous

Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA) was used to evaluate the cell viability following the manufacturer's instructions. The absorbance was recorded at 490 nm using Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA). Absorbance of the basal media (with no cells and no treatment) was subtracted to the recorded absorbance for all conditions. Values of treated cells were normalized to non-treated cells (100% intensity).

IV.2.11 Antioxidant effect of quercetin on TBHP treated NIH3T3 cells

NIH3T3 cells were seeded at 20,000 cells/cm² in a 96 well black plate with clear bottom (Corning® Massachusetts, USA) and incubated 24 hours at 37°C, 5% CO₂ to allow cell adhesion. Then B-LNC (POx and PEG), crude quercetin, or Q-LNC (POx and PEG) possessing an equivalent quercetin concentration of 5 µg/mL were added and incubated for another 24 hours in supplemented DMEM. Cells were washed twice with PBS before addition of 200 µL of 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) reagent (20 µM in DMEM without phenol red). The serum free medium used provides reliable data by avoiding deacetylation of the DCFDA into non fluorescent compound that could later be oxidized by reactive oxygen species (ROS) into dichlorofluorescein (DCF). After 30 minutes of incubation at 37°C, 5% CO₂, cells were rinsed with PBS and placed in 200 µL DMEM without phenol red. A solution of *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP) (500 µM in PBS) was then added and the cells were incubated for additional 30 minutes. The fluorescence signal of DCF produced by the reaction of DCFDA reagent with ROS was then measured (λ_{exc} 485 nm, λ_{em} 535 nm) using a Tristar LB941 Spectrofluorimeter (Berthold Technologies, Germany). Values of treated cells were normalized to non-treated cells (100% intensity).

IV.2.12 Antioxidant effect of quercetin on UVB irradiated NHEK cells

NHEK cells were seeded at 30,000 cells per well in a 24-well plate. They were allowed to settle for 24 hours before treatment for 2 more hours with 5 µg/ml of the crude quercetin, Q-LNC POx or Q-LNC PEG preparations. Cells were then incubated with 20 µM DCFDA in a serum free medium for 30 minutes before a 100 mJ/cm² UVB irradiation was triggered. The cells were harvested and cellular fluorescence was assessed by flow cytometry (Canto, Becton Dickinson) directly after irradiation [84]. Data were processed using FlowJo software. Values of treated cells were normalized to non-treated cells (representing the cells with 100% ROS intensity).

IV.2.13 Statistical analysis

The statistical analysis of the data resulting from the cell viability and the antioxidant effect on cells was conducted with Origin Pro software 8.1 (OriginLab, USA). A one-sample t-test with equal variance was performed to compare cell viability and antioxidant effect with formulations to viability of untreated cells (100%). A two-sample t-test with unequal variance was carried out to compare cell viability of formulations two by two. The P value reflects the significance with * =P <0.05, ** =P <0.01 and *** =P < 0.001.

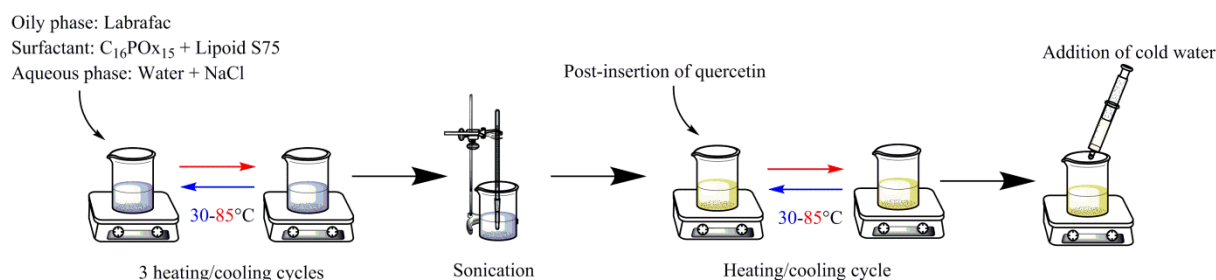
IV.3 Results and discussion

IV.3.1 LNC formulation and characterization

The amphiphilic nonionic POx polymer (C₁₆POx₁₅) used in this study is highly soluble in water and has a molecular weight of 1520 g/mol. It possesses a low viscosity (e.g. PEtOx 50 kDa [η] = 0.23 dL/g) and a high stability towards degradation [28]. Its solubility in water remains constant with temperature (no LCST characteristic for this poly(-2-methyl-2-oxazoline) POx derivative) [85]), impeding the use of the

phase inversion process developed by Heurtault et al [77] to produce LNC. As a consequence, the protocol to form POx based LNC was redefined as represented in Scheme 1. Heating and cooling cycles were first performed to solubilize and homogenize the system by melting and mixing the solid lipids (Lipoid® S75) with the liquid lipids (Labrafac®). Then, a short sonication step supplied the energy necessary to disperse the preparation [86] and reduce its size from 300 nm to 30 nm. Quercetin was added to the mixture to produce antioxidant LNC after this stage, thus avoiding its degradation from ultrasonic energy [87]. One of the advantages of this process is thus to preserve active compound (AC) sensitive to many temperature cycles and ultrasound treatments by post-insertion into the LNC. One last heating and cooling cycle was performed to favor quercetin loading. Then, the mixture was heated at 85°C and cold water (4°C) was rapidly introduced to anchor the system and generate LNC stabilized by polyoxazoline (LNC POx).

Using this process, a pre-formulation work was conducted to determine the suitable composition leading to the most stable nanosized LNC, with the lowest amount of POx and resulting in the highest drug loading. The POx concentration range explored varied from 10 to 20 mass percent, the Labrafac® oily phase from 10 to 25 mass percent and water from 55 to 80 mass percent, whereas the phospholipids Lipoid® S75 and NaCl were respectively fixed at 1.5 mass percent and 3 mass percent. The stability was evaluated from DLS measurement (data not shown).



Scheme 1: Process of lipid nanocapsules formulation

As a result, POx was introduced at 20 mass percent, Labrafac® oil at 15 mass percent and water 65 mass percent. Other components such as NaCl and Lipoid® S75 were added at 3 mass percent and 1.5 mass percent. The physicochemical and morphological properties of blank LNC (B-LNC POx) and LNC loaded with quercetin (Q-LNC POx) were fully characterized; their main properties are gathered in Table 2. The hydrodynamic diameter of B-LNC was measured by DLS at 30.5 ± 1.5 nm with a polydispersity index (PDI) of 0.16. Loading with quercetin (Q-LNC POx) resulted in almost similar hydrodynamic diameter (26.4 ± 0.6 nm with a PDI of 0.18 ± 0.01 , Table 2). The zeta potential for both LNC was close to neutral, indicating that POx chains at the surface of the LNC stabilize the formulation by steric repulsions. LNC PEG, free and loaded with quercetin were prepared using Hatahet et al. protocol [14] for comparative purposes. The hydrodynamic diameter of B-LNC PEG and Q-LNC PEG were measured at 34.7 nm and 33.5 nm with a PDI of 0.03 and 0.05, respectively. As for LNC POx, the presence of quercetin did not change the LNC size.

Table 2: Characteristics of LNC POx

	B-LNC POx	Q-LNC POx
Hydrodynamic diameter (nm)	30.5 ± 1.5	26.4 ± 0.6
PDI	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01
Hydrodynamic diameter after centrifugation (nm)	30.0 ± 3	27.0 ± 2
PDI after centrifugation	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.01
Hydrodynamic diameter after freezing (nm)	33.6	25.8
PDI after freezing	0.16	0.17
Zeta potentiel (mV)	5.1 ± 18.4	7.9 ± 12.5
Drug loading (%)		7.9 ± 0.1
Encapsulation efficiency (%)		93 ± 1

The morphology of LNC was observed by TEM after coloration with uranyl acetate solution. Well-defined spherical particles of similar size (< 70 nm) were observed for both B-LNC POx and Q-LNC POx. A typical image obtained with Q-LNC POx is presented on Figure S1. The spherical shape was confirmed by AFM (Figure 1). It also allowed determination of the nanoparticle stiffness using the tapping mode to evaluate the contact force and more especially the repulsive force of the nanoparticle by decreasing the amplitude (setpoint). The topography of the LNC POx showed a positive phase indicating a repulsive force and mechanical properties. The latter were quantified using the harmoniX mode for determination of the indentation modulus (DMT). The DMT profile of Q-LNC POx was measured at 1-2 GPa (Figure S2) and the associated topography profiles resulted in no permanent morphology deformation (Figures S3 and S4) up to a constraint of about 10-20 nN. This evidences the mechanical properties of the LNC POx composed of a rigid capsule embedding on oily core just like the ones designed by Heurtault et al. [77] for which a contact force > 10nN was applied.

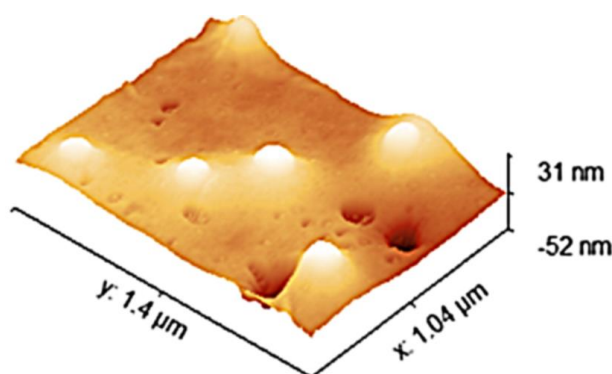
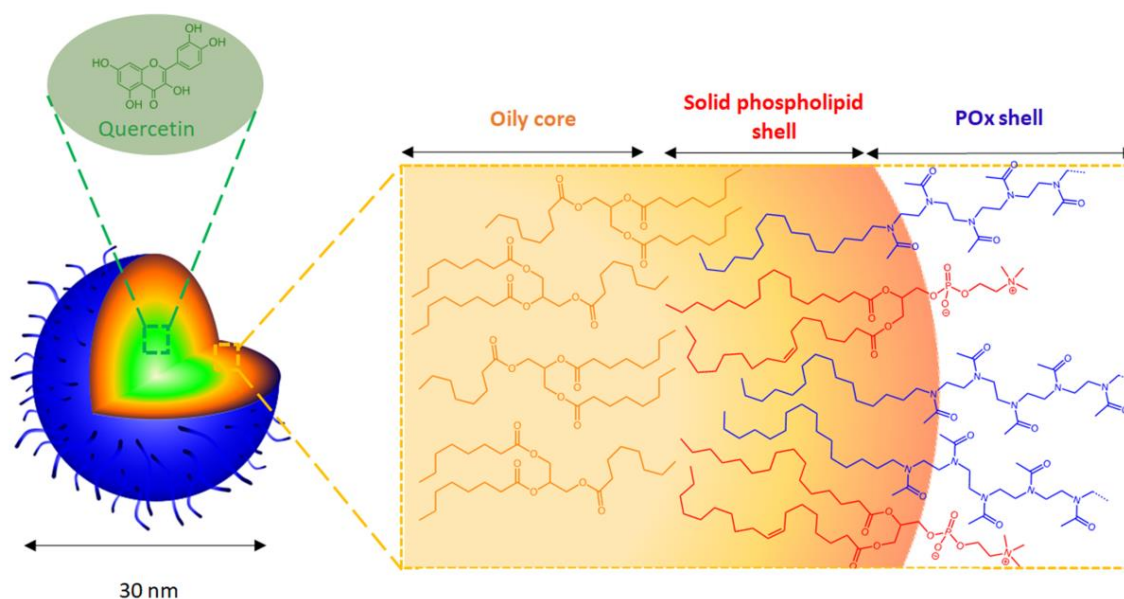


Figure 1: LNC POx topography from AFM measurement

It is reasonable to assume that the stiffness of the POx-based nanoparticles results from the rigid capsule made of phospholipids from the Lipoid® S75 and POx surrounding the oily core of Labrafac® as for the LNC produced with polyethylene glycol (15)-hydroxystearate as a surfactant [77]. For LNC

POx, the amphiphilic non ionic POx stabilized the hydrophobic part of the formulation into spherical nano-objects covered with the POx chains as previously described for similar amphiphilic POx [40]. An illustrative representation of the assembly is depicted in Scheme 2.



Scheme 2: Inner assembly of LNC POx

LNC formulations are well known for their high stability to dilution, centrifugation and over the long term [73]. These properties were also investigated for the newly developed POx based LNC. The LNC POx stability to dilution by 1000 (data not shown) and to high speed centrifugation at 15 000 rpm for 15 minutes at 25°C was evaluated. The size and the PDI remained the same as reported in Table 2. Interestingly, after 5 days at -22°C the LNC POx hydrodynamic diameter did not change. The long term stability of B-LNC POx was assessed at 4, 25 and 37°C by measuring the hydrodynamic diameter and PDI over a period of one month (Figure 2). At each temperature, the size of the particles slightly increased in the first 7 days (from 30 to 38 nm at 4°C, 42 nm at 25°C and 49 nm at 37°C), after 7 days the PDI remained almost identical at a low value of ~ 0.1, indicating stable monodisperse preparations. In any case, after a month, the size of the B-LNC POx remained well below 100 nm, which is fully compatible for topical delivery applications. It is noteworthy to mention that after 2 months at 25°C, the size of the B-LNC POx had only marginally increased; it reached 57 nm whereas it was 52 nm one month before (PDI < 0.1).

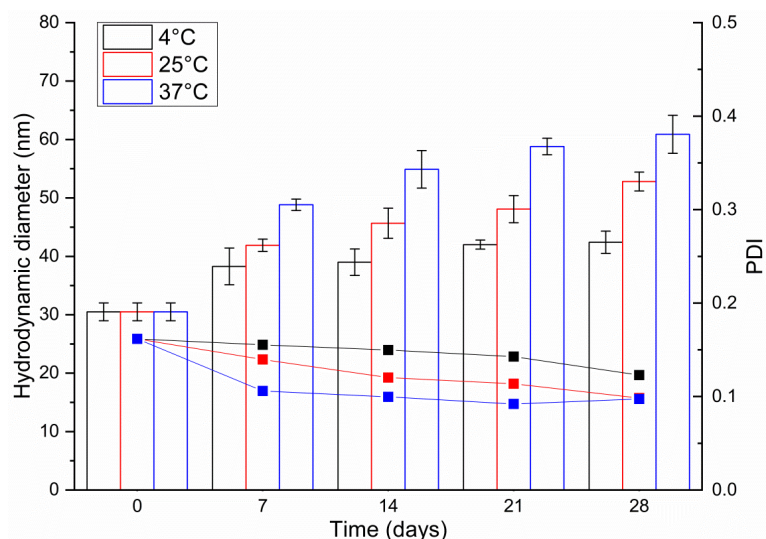


Figure 2: Hydrodynamic diameter (column) and PDI (symbol) of B-LNC POx at 4, 25 and 37 °C over time (n=3)

A cell viability test was first conducted on mice fibroblasts (NIH3T3) to ensure that the platform was non toxic by itself. B-LNC POx and B-LNC PEG were both tested from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to evaluate the IC_{50} (cell viability) (Figure S5). The IC_{50} (cell viability) value was $43 \pm 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ for B-LNC PEG and $45 \pm 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ for B-LNC POx and the statistical analysis did not reveal any difference in term of cell viability. Thus, the cell viability in presence of B-LNC POx seems to be well-suited for topical delivery of AC as it is similar to that of B-LNC PEG.

IV.3.2 Quercetin loaded LNC and scavenging capacity

The LNC POx was then loaded with an AC model to evaluate the encapsulation capacity and protection of bioactivity. The natural antioxidant quercetin was chosen for its hydrophobic nature, poor solubility and sensitivity to oxidation. The post-insertion method successfully led to a high encapsulation efficiency (EE) of $93 \pm 1\%$ corresponding to a drug loading (DL) of $7.9 \pm 0.1\%$. Addition of ethanol (from 100 μL to 500 μL) had no impact on DL and rather tended to destabilize the LNC by creating two phases, contrary to Q-LNC PEG synthesized by Hatahet et al. adapted from Heurtault protocol [14]. Compared to others LNC [88] and NLC [18, 89] developed to encapsulate quercetin, it has to be mentioned that Q-LNC POx exhibits the highest drug loading, which exceed that obtained with Q-LNC PEG [14] using Cremophor and ethanol to reach a drug loading of $2.6 \pm 0.1\%$ with an encapsulation efficiency of $96.4 \pm 1.2\%$. Moreover, Q-LNC POx preparation also improved quercetin loading compared to the POx stabilized mixed-micelles we recently developed [83] (from 3.6 to 7.9 %).

The stability of Q-LNC POx with time was investigated at 4 °C, a temperature relevant in the presence of quercetin that is sensitive to thermal degradation [63]. As for the blank LNC POx, the size of quercetin loaded nanocapsules slightly evolved over one month, from 26 nm to 40 nm with a PDI staying under 0.2 (Figure 3). As for B-LNC POx, Q-LNC POx was also stable to dilution and centrifugation (Table 2).

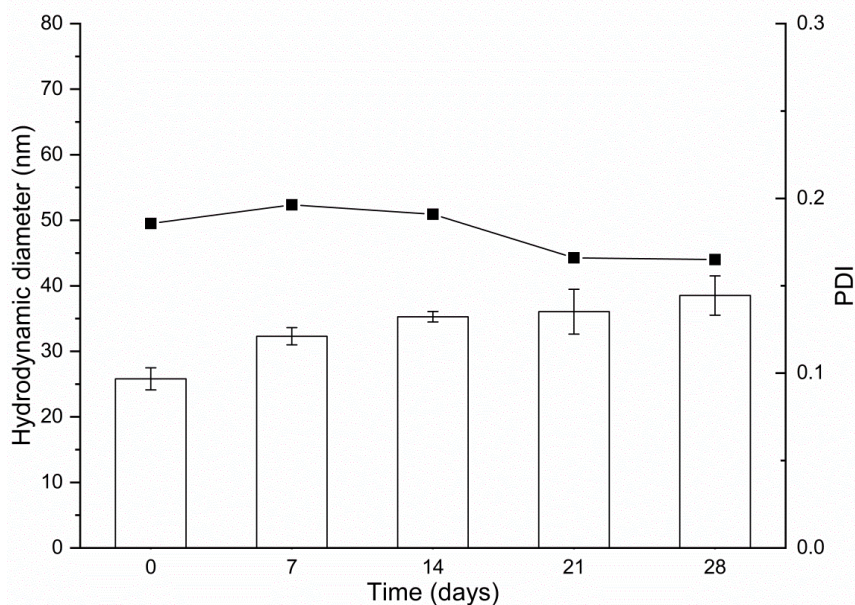


Figure 3: Hydrodynamic diameter (column) and PDI (symbol) of Q-LNC POx at 4 °C with time (n=3)

The stability study of Q-LNC POx was completed by evaluating the quercetin leakage from the nanocapsules in aqueous media (Figure S6). After 7 hours, only 1.5% of quercetin was released from Q-LNC POx and it reached a low value of 5% after 48 hours. This result confirmed that quercetin is localized within the core of the LNC. Interestingly, the LNC POx formulation reduced by four times the quercetin leakage in aqueous media compared to the mixed-micelles formulation [83]. The Q-LNC POx also seemed to better retain quercetin than Q-LNC PEG that showed a leakage of quercetin of almost 15% after 24 hours using the same experimental conditions [14]. This result might be due to the rigid capsule surrounding the oily core acting as a sealed reservoir and ensuring a high stability for the particles.

Antioxidant tests were performed in order to evaluate the ability of the LNC POx platform to protect and maintain the bioactivity of the encapsulated compound. The radical scavenging capacity was assessed *in vitro* using a chemical assay (DPPH). It was also evaluated on mice fibroblasts and human keratinocytes by generating reactive oxygen species (ROS) respectively using organic peroxide and UVB irradiation.

The quercetin antioxidant is able to react with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH°) molecule by its free radical on the hydrazine position leading to DPPHH. The radical scavenging capacity of quercetin encapsulated in the Q-LNC POx was assessed by looking at its inhibitive interaction with DPPH°. The IC_{50} (DPPH° inhibition) value deduced from the DPPH° decrease shows higher antioxidant activity for Q-LNC POx (IC_{50} (DPPH° inhibition) = 2 µg/mL) than for crude quercetin, which exhibited a twice higher IC_{50} (Figure S7). The higher antioxidant activity of Q-LNC POx can be due to a better protection of the antioxidant to oxidation, a greater conformation or organization in the nanocapsule compared to crude quercetin.

IV.3.3 Quercetin loaded antioxidant activity

To go further in the evaluation of the antioxidant effect of Q-LNC POx with respect to classical PEG based LNC, both POx and PEG based Q-LNC were loaded at the same quercetin concentration and tested on mice fibroblasts and human keratinocytes. A cell viability test was performed on NIH3T3 to

determine the maximum non toxic quercetin concentration to be used for the antioxidant tests. The IC_{50} (cell viability) values were determined for crude quercetin (17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Q-LNC POx (23 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and Q-LNC PEG (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure S8). The cell viability of blank LNCs was also evaluated B-LNC POx (43 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and B-LNC PEG (45 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

As for the uncharged POx and PEG-based LNC, the IC_{50} (cell viability) value is not affected by the nature of the stabilizing polymer.

To perform the antioxidant study, the concentration of quercetin was selected such as to avoid formulation toxicity from the cell viability results; it was set at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The radical scavenging capacity of Q-LNC POx was first tested on NIH3T3 and compared to Q-LNC PEG and crude quercetin (Figure 4). Cells were treated with the formulations for 24 hours, then an oxidative stress was induced by *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP). The quantity of ROS generated was determined by fluorescence spectroscopy using the DCFDA probe. The results were normalized to untreated cells with TBHP exposure (non treated). The crude quercetin was able to reduce excess ROS generation to $69 \pm 6\%$ ($P < 0.01$) and similarly Q-LNC POx decreased surplus ROS to $70 \pm 6\%$ ($P < 0.01$). Q-LNC PEG was less able to counter ROS generation with a reduction to $81 \pm 9\%$ ($P < 0.01$). The antioxidant activity of quercetin once loaded in LNC POx was thus maintained and even slightly enhanced compared to Q-LNC PEG. B-LNC POx was also tested and the cells resisted to the peroxides generated reflecting the innocuousness of POx upon oxidation.

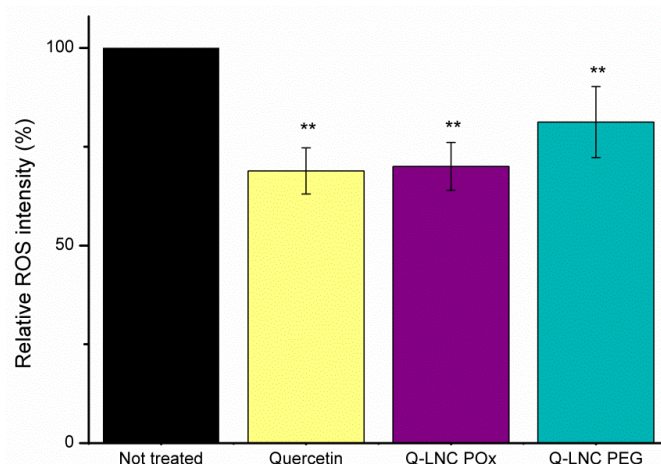


Figure 4: ROS relative intensity for crude quercetin, Q-LNC POx and Q-LNC PEG at a quercetin concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n=3$) on NIH3T3 cells. Fluorescence intensity was normalized to TBHP treated cells without formulation.

A one sample t-test relative to untreated cells was performed (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$)

Another antioxidant test was performed on human keratinocytes with UV irradiation as a source of ROS. Therefore, the antioxidant effect observed on mice fibroblasts can be transposed to human cells with ROS simulated from an environmental factor.

We first evaluated the scavenging activity of ROS naturally generated by the cells (Table 3, “No UV irradiation”). The fluorescence intensity was normalized to untreated cells (no formulation and no UV irradiation). UV irradiation was then carried out to evaluate the antioxidant capacity on overproduction of ROS (Table 3, “UV irradiation” column). The results were normalized to untreated cells. As shown in Table 3, the crude quercetin significantly reduced the ROS naturally produced by the

cells to $59 \pm 19 \%$ ($P < 0.01$) which is not the case for Q-LNC POx and Q-LNC PEG maintaining a quantity of ROS of $91 \pm 16 \%$ and $94 \pm 13 \%$ respectively. On the contrary, once the cells irradiated, the crude quercetin was the one reducing most of the ROS over generated to $65 \pm 6 \%$ ($P < 0.01$) whereas Q-LNC POx was able to reduce ROS at $83 \pm 4 \%$ ($P < 0.01$) and Q-LNC PEG at $91 \pm 15 \%$. The statistical analysis revealed that crude quercetin and Q-LNC POx significantly decreased the ROS over generated. Therefore, Q-LNC POx was able to maintain the antioxidant activity of quercetin alike Q-LNC PEG. It has to be noticed that, even if the crude quercetin reduced most of the ROS, its too powerful activity could scavenge the ROS essential for cell survival.

Table 3: ROS relative intensity for crude quercetin, Q-LNC POx and Q-LNC PEG at a quercetin concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$) on human keratinocytes. Fluorescence intensity was normalized to irradiated cells (not treated with formulation). A one sample t-test relative to untreated cells was performed (: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ and ***: $P < 0.001$)*

Conditions	No UV irradiation	UV irradiation
	ROS relative intensity (%)	ROS relative intensity (%)
Untreated	100	100
Crude quercetin	59 ± 19 **	65 ± 6 **
Q-LNC POx	91 ± 16	83 ± 4 **
Q-LNC PEG	94 ± 13	91 ± 15

IV.4 Conclusion

This work demonstrates the ability of amphiphilic non ionic polyoxazolines (POx) to act as a surfactant to form lipid based nanoformulation suitable for topical delivery of quercetin. The optimized nanoformulation allows to shape well-defined monodisperse spherical lipid nanocapsules (LNC) of 30 nm diameter size. They are composed of a Labrafac[®] oily core stabilized by a solid phospholipid and POx surfactant shell, whose stiffness ensured a high stability over time, centrifugation, freezing and dilution. Most importantly, LNC POx are free from the PEG-dependant inversion process universally used to date to design LNC. The process developed here associates a sonication step to heating/cooling cycles allowing loading the natural antioxidant quercetin at a high drug loading of $7.9 \pm 0.1 \%$ without inducing any morphological change in the particles nor altering their stability. Interestingly, the LNC POx leads to a higher encapsulation and a slightly better radical scavenging capacity on mice fibroblasts and human keratinocytes than LNC PEG. This evidences the crucial role amphiphilic polyoxazolines might take in the future as PEG free topical delivery platform for topical and intravenous administration for applications in nanomedecine, dermatology and cosmetics.

Acknowledgements

The authors thank Michel Ramonda (CTM, Univ Montpellier, France) for help on AFM measurements, Christophe Dorandeu (ICGM, Univ Montpellier, France) for assistance on HPLC analysis and Thomas Cacciaguerra (ICGM, Univ Montpellier, France) for assistance on TEM experiments. We acknowledge the imaging facility MRI, member of the national infrastructure France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04, «Investments for the future») for Cytometry Analysis.

IV.5 Supplementary information

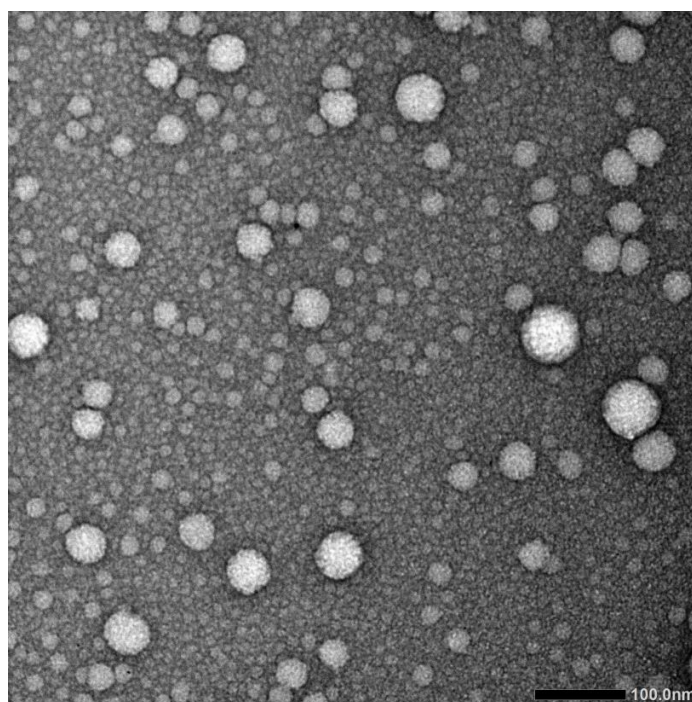


Figure S1: TEM image of Q-LNC POx

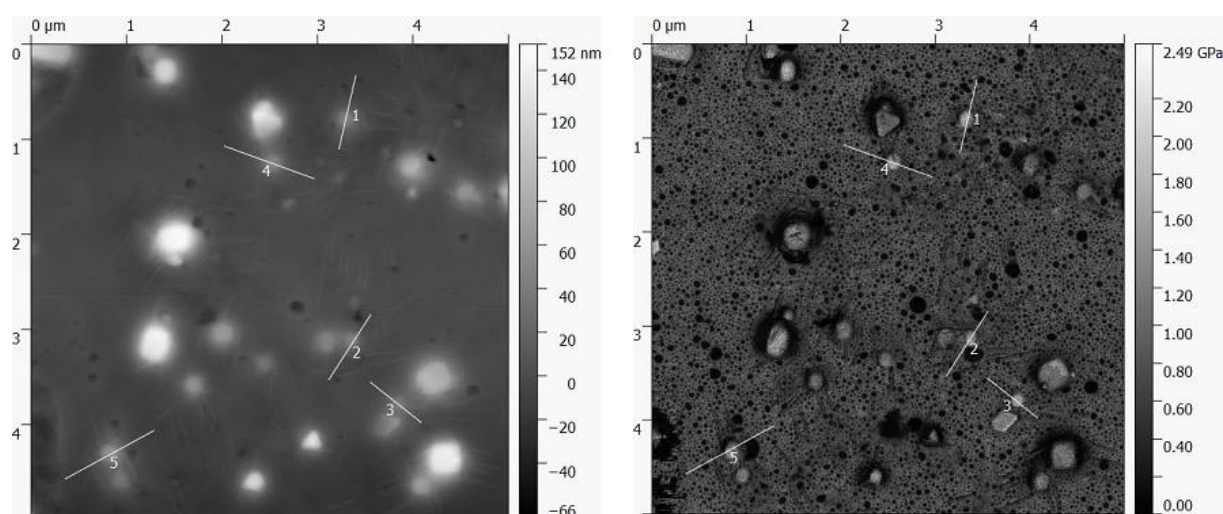


Figure S2: AFM modulus for Q-LNC POx

AFM microscopy was performed on the Q-LNC POx with topography on the left and the modulus on the right. Five LNC were measured to determine their topography and modulus profiles

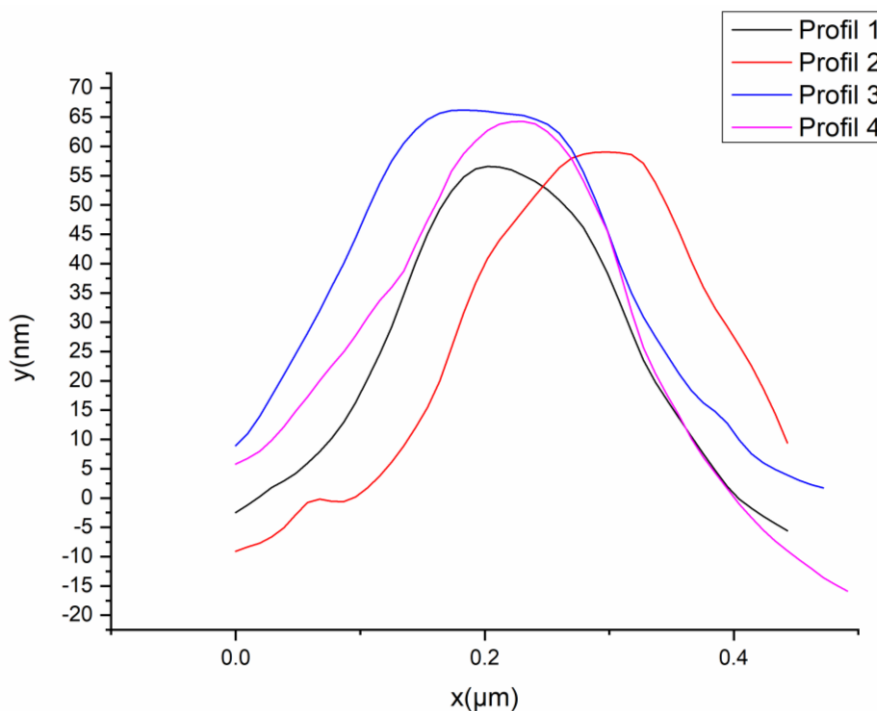


Figure S3: Topography profile Harmonix mode of AFM image for Q-LNC POx

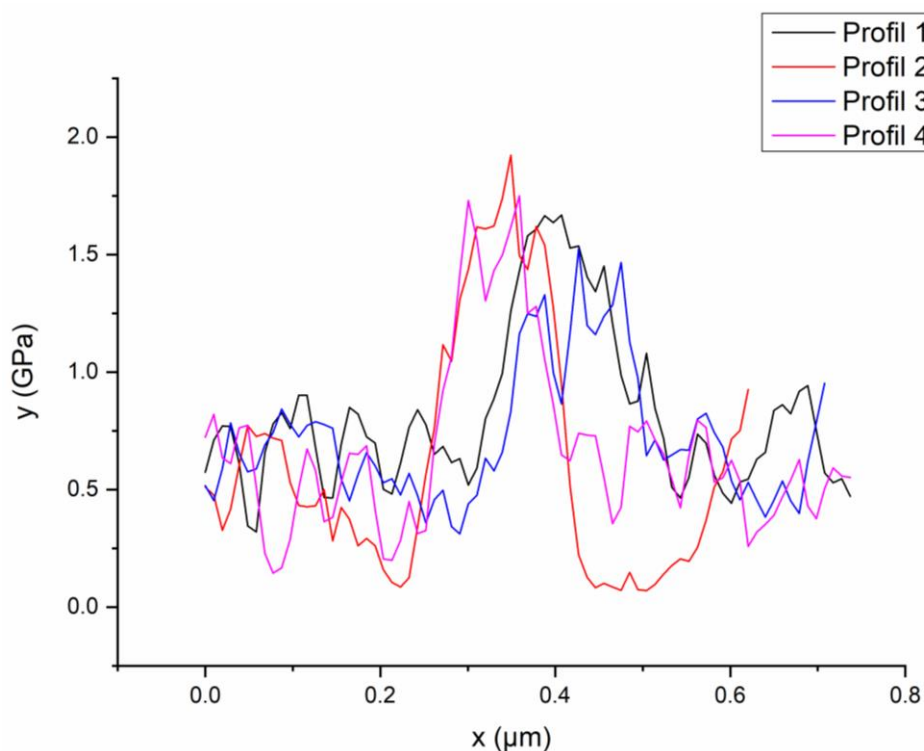


Figure S4: Modulus profile Harmonix mode of AFM image for Q-LNC POx

The shape of the LNC was observed with the topography profile (Figure S3), indicating that the nanoparticles remained spherical with no deformation. The modulus profile (Figure S4) showed that the constraint applied on the LNC was about 1-2 GPa.

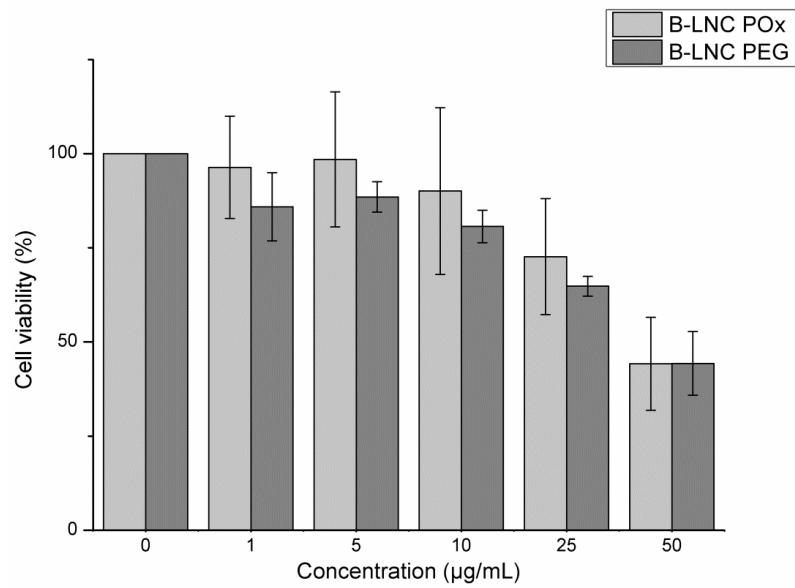


Figure S5: Cell viability of mice fibroblasts (NIH3T3) co-incubated with B-LNC POx and B-LNC PEG for 24 h (n=3)

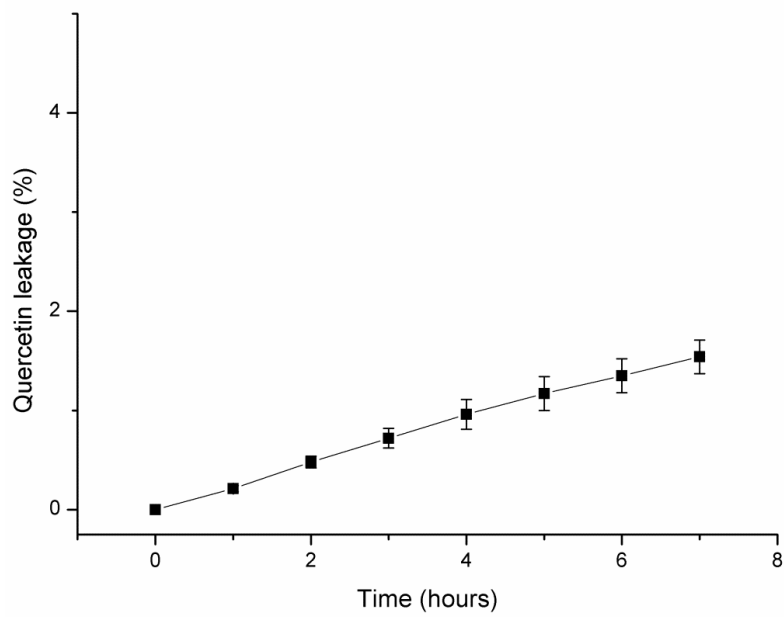


Figure S6: Quercetin leakage from Q-LNC POx in aqueous media

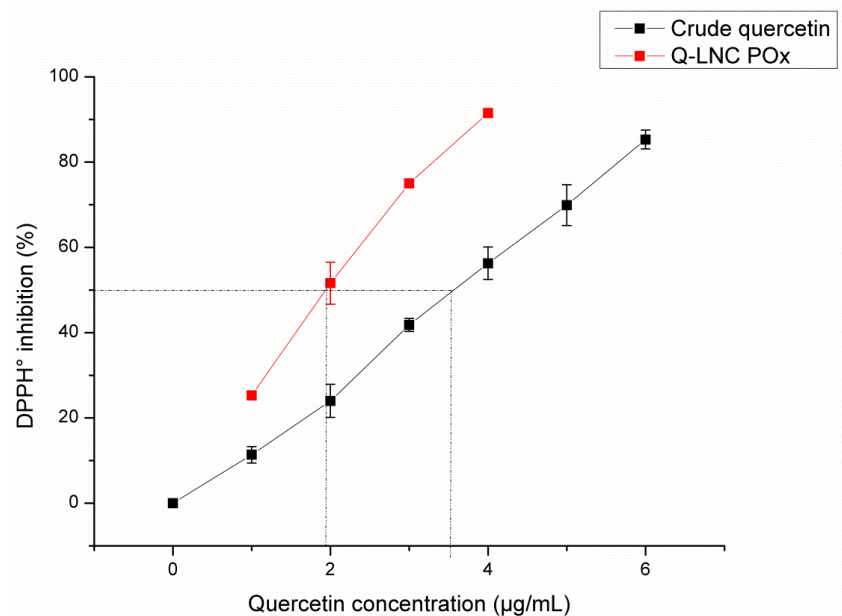


Figure S7: DPPH• scavenging activity of crude quercetin and Q-LNC POx

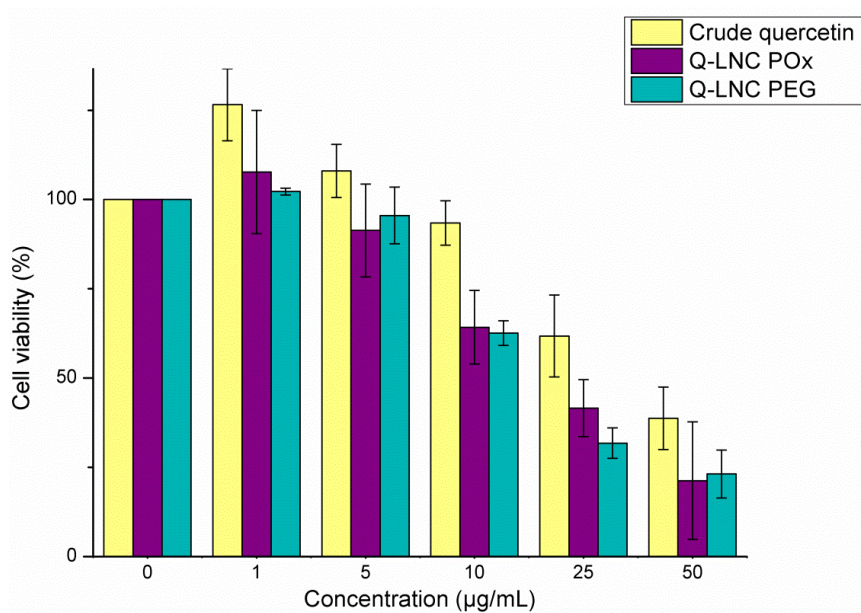
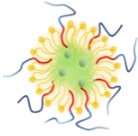
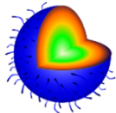


Figure S8: Cell viability of mice fibroblasts (NIH3T3) co-incubated with crude quercetin, Q-LNC POx and Q-LNC PEG for 24 h (n=3)

Conclusion du chapitre

Nous avons réussi à développer diverses nanoformulations lipidiques sans PEG : des nanoémulsions, des liposomes, des micelles mixtes et des nanocapsules lipidiques après avoir adapté le protocole aux propriétés des POx. Les MM et les LNC présentent des caractéristiques similaires en terme de distribution de taille et de stabilité, permettent un taux de chargement en antioxydant compatible avec une utilisation thérapeutique (Tableau 13). Toutefois, la différence de composition et de morphologie des MM présentant un enchevêtrement de phospholipides et des LNC possédant une capsule rigide de phospholipides contenant un cœur huileux devrait influencer les propriétés de surface et donc de pénétration au travers de la peau. Celles-ci ont été évaluées et seront présentées dans les chapitres suivants. L'évaluation cellulaire de l'activité antioxydante de la quercétine une fois encapsulée dans les MM ou LNC a montré que les MM induisent une meilleure libération de la quercétine permettant une meilleure protection des cellules aux radicaux (42 % de diminution). Il est impossible de définir à ce stade si une formulation est meilleure qu'une autre car les deux présentent des propriétés intéressantes (stabilité, encapsulation, morphologie) ; elles doivent donc être testées sur peau humaine pour évaluer leur capacité de pénétration.

Tableau 13 : Comparaison des deux nanoformulations lipidiques à base de POx développées

	Micelles mixtes	Nanocapsules lipidiques
Structure		
Composition	POx (0,5 g/L) Phospholipides (10 g/L)	POx (62,5 g/L) Huile Labrafac (48 g/L) Phospholipides (5 g/L)
Procédé	Hydratation de film lipidique	Cycles de chauffage et refroidissement et sonication
Taille, PDI	20 nm PDI 0,3	30 nm PDI 0,15
Morphologie	Cœur hydrophobe formé par l'enchevêtrement de chaînes hydrophobes	Capsule rigide de phospholipides avec une couronne de POx contenant un cœur huileux
Encapsulation de la quercétine	94 ± 4 %	93 ± 1 %
Taux de chargement	3.6 ± 0.2 %	7.93 ± 0.09 %
IC ₅₀ (DPPH)	3,6 µg/mL	2 µg/mL
Diminution des ROS (NiH3T3) à 5 µg/mL en quercétine chargée	42 ± 2 %	30 ± 6 %

Les formulations reposant sur les liposomes et les NE nécessitent, quant à elles, d'être encore améliorées pour pouvoir envisager une application topique. Ainsi, nous avons démontré le potentiel des POx comme tensioactif pour élaborer et stabiliser des nanoformulations pour la voie topique. Pour la suite des travaux, notamment l'étude des interactions physico-chimiques de surface (chapitre 4) et l'évaluation de la pénétration à travers des membranes modèles (chapitre 5), les formulations MM et LNC ont été retenues.

Références

1. Ramešová, Š., et al., *On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. 402(2): p. 975-982.
2. Batzri, S. and E.D. Korn, *Single bilayer liposomes prepared without sonication*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1973. 298(4): p. 1015-1019.
3. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2019. 570: p. 118516.
4. Marks, J.G. and J.J. Miller, 2 - *Structure and Function of the Skin*, in *Lookingbill and Marks' Principles of Dermatology (Sixth Edition)*, J.G. Marks and J.J. Miller, Editors. 2019, Content Repository Only!: London. p. 2-10.
5. Valacchi, G., et al., *Cutaneous responses to environmental stressors*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. 1271(1): p. 75-81.
6. Poljšak, B., U. Glavan, and R. Dahmane, *Skin Cancer, Free Radicals and Antioxidants*. Vol. 4. 2011. 1554-1134.
7. Rinnerthaler, M., et al., *Oxidative stress in aging human skin*. Biomolecules, 2015. 5(2): p. 545-589.
8. Baudouin, C., et al., *Environmental pollutants and skin cancer*. Cell Biology and Toxicology, 2002. 18(5): p. 341-348.
9. Krutmann, J., et al., *The skin aging exposome*. Journal of Dermatological Science, 2017. 85(3): p. 152-161.
10. Andreia, A., et al., *Topical Delivery of Antioxidants*. Current Drug Delivery, 2011. 8(6): p. 640-660.
11. Nagula, R.L. and S. Wairkar, *Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review*. Journal of Controlled Release, 2019. 296: p. 190-201.
12. Hatahet, T., et al., *Quercetin topical application, from conventional dosage forms to nanodosage forms*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. 108(Supplement C): p. 41-53.
13. Hatahet, T., et al., *Dermal quercetin smartCrystals®: Formulation development, antioxidant activity and cellular safety*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016. 102(Supplement C): p. 51-63.
14. Hatahet, T., et al., *Dermal quercetin lipid nanocapsules: Influence of the formulation on antioxidant activity and cellular protection against hydrogen peroxide*. International Journal of Pharmaceutics, 2017. 518(1): p. 167-176.
15. Hatahet, T., et al., *Liposomes, lipid nanocapsules and smartCrystals®: A comparative study for an effective quercetin delivery to the skin*. International Journal of Pharmaceutics, 2018. 542(1): p. 176-185.
16. Bose, S., et al., *Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. 441(1): p. 56-66.
17. Chessa, M., et al., *Effect of Penetration Enhancer Containing Vesicles on the Percutaneous Delivery of Quercetin through New Born Pig Skin*. Pharmaceutics, 2011. 3(3): p. 497-509.
18. Chen-yu, G., et al., *Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery*. International Journal of Pharmaceutics, 2012. 430(1): p. 292-298.
19. Tan, Q., et al., *Preparation and evaluation of quercetin-loaded lecithin-chitosan nanoparticles for topical delivery*. International journal of nanomedicine, 2011. 6: p. 1621-1630.
20. Martena, V., et al., *Permeation and skin retention of quercetin from microemulsions containing Transcutol® P AU - Censi, Roberta*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2012. 38(9): p. 1128-1133.
21. Caddeo, C., et al., *Topical Anti-Inflammatory Potential of Quercetin in Lipid-Based Nanosystems: In Vivo and In Vitro Evaluation*. Pharmaceutical Research, 2014. 31(4): p. 959-968.
22. Shen, Z., et al., *1 - PEGylated "stealth" nanoparticles and liposomes*, in *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, A. Parambath, Editor. 2018, Woodhead Publishing. p. 1-26.
23. Lubich, C., et al., *The Mystery of Antibodies Against Polyethylene Glycol (PEG) - What do we Know?* Pharmaceutical Research, 2016. 33(9): p. 2239-2249.
24. Rudmann, D.G., et al., *High Molecular Weight Polyethylene Glycol Cellular Distribution and PEG-associated Cytoplasmic Vacuolation Is Molecular Weight Dependent and Does Not Require Conjugation to Proteins*. Toxicologic Pathology, 2013. 41(7): p. 970-983.
25. Viegas, T.X., et al., 6 - *Poly(oxazolines)*, in *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems*, A. Parambath, Editor. 2018, Woodhead Publishing. p. 173-198.
26. Hoogenboom, R., *Poly(2-oxazoline)s: A Polymer Class with Numerous Potential Applications*. Angewandte Chemie International Edition, 2009. 48(43): p. 7978-7994.
27. Adams, N. and U.S. Schubert, *Poly(2-oxazolines) in biological and biomedical application contexts*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. 59(15): p. 1504-1520.
28. Lorson, T., et al., *Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update*. Biomaterials, 2018. 178: p. 204-280.
29. Goddard, P., et al., *Soluble polymeric carriers for drug delivery. Part 2. Preparation and in vivo behaviour of N-acyl ethylenimine copolymers*. Journal of Controlled Release, 1989. 10(1): p. 5-16.
30. Bauer, M., et al., *Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility*. Macromolecular Bioscience, 2012. 12(7): p. 986-998.
31. Leiske, M.N., et al., *Mission ImPOxable – or the unknown utilization of non-toxic poly(2-oxazoline)s as cryoprotectants and surfactants at the same time*. Journal of Materials Chemistry B, 2017. 5(46): p. 9102-9113.
32. Gaertner, F.C., et al., *Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s*. Journal of Controlled Release, 2007. 119(3): p. 291-300.

33. Zalipsky, S., et al., *Evaluation of Blood Clearance Rates and Biodistribution of Poly(2-oxazoline)-Grafted Liposomes*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996. 85(2): p. 133-137.
34. Kyliuk-Price, D.L., L. Li, and M.D. Scott, *Comparative efficacy of blood cell immunocamouflage by membrane grafting of methoxypoly(ethylene glycol) and polyethyloxazoline*. Biomaterials, 2014. 35(1): p. 412-422.
35. Woodle, M.C., C.M. Engbers, and S. Zalipsky, *New Amphipatic Polymer-Lipid Conjugates Forming Long-Circulating Reticuloendothelial System-Evading Liposomes*. Bioconjugate chemistry, 1994. 5(6): p. 493-496.
36. Moreadith, R.W., et al., *Clinical development of a poly(2-oxazoline) (POZ) polymer therapeutic for the treatment of Parkinson's disease – Proof of concept of POZ as a versatile polymer platform for drug development in multiple therapeutic indications*. European Polymer Journal, 2017. 88: p. 524-552.
37. Verbraeken, B., et al., *The chemistry of poly(2-oxazoline)s*. European Polymer Journal, 2017. 88: p. 451-469.
38. Guillermin, B., et al., *How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization*. Macromolecular Rapid Communications, 2012. 33(19): p. 1600-1612.
39. Guillermin, B., et al., *Synthesis and evaluation of triazole-linked poly(ϵ -caprolactone)-graft-poly(2-methyl-2-oxazoline) copolymers as potential drug carriers*. Chemical Communications, 2012. 48(23): p. 2879-2881.
40. Korchia, L., et al., *Photodimerization as an alternative to photocrosslinking of nanoparticles: proof of concept with amphiphilic linear polyoxazoline bearing coumarin unit*. Polymer Chemistry, 2015. 6(33): p. 6029-6039.
41. Huber, S., N. Hutter, and R. Jordan, *Effect of end group polarity upon the lower critical solution temperature of poly(2-isopropyl-2-oxazoline)*. Vol. 286. 2008. 1653-1661.
42. El Asmar, A., et al., *Tuning the Thermo-Sensitivity of Micellar Systems through a Blending Approach*. Macromolecules, 2016. 49(11): p. 4307-4315.
43. Stemmelen, M., et al., *Synthesis and self-assembly of amphiphilic polymers based on polyoxazoline and vegetable oil derivatives*. Polymer Chemistry, 2013. 4(5): p. 1445-1458.
44. Giardi, C., et al., *Nonionic polyoxazoline surfactants based on renewable source: Synthesis, surface and bulk properties*. Reactive and Functional Polymers, 2009. 69(9): p. 643-649.
45. Purrucker, O., et al., *Supported Membranes with Well-Defined Polymer Tethers—Incorporation of Cell Receptors*. ChemPhysChem, 2004. 5(3): p. 327-335.
46. Yi, X. and A.V. Kabanov, *Brain delivery of proteins via their fatty acid and block copolymer modifications*. Journal of drug targeting, 2013. 21(10): p. 940-955.
47. Nukolova, N.V., et al., *Folate-decorated nanogels for targeted therapy of ovarian cancer*. Biomaterials, 2011. 32(23): p. 5417-5426.
48. Baumann, P., et al., *Cellular Trojan Horse Based Polymer Nanoreactors with Light-Sensitive Activity*. The Journal of Physical Chemistry B, 2014. 118(31): p. 9361-9370.
49. Le Meins, J.F., et al., *Hybrid polymer/lipid vesicles: state of the art and future perspectives*. Materials Today, 2013. 16(10): p. 397-402.
50. Almgren, M., *Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. 1508(1): p. 146-163.
51. D'Souza, A. and R. Shegokar, *Polymer: Lipid Hybrid Nanostructures in Cancer Drug Delivery: Successes and Limitations*. 2016. p. 431-463.
52. Mandal, B., et al., *Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform*. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2013. 9(4): p. 474-491.
53. Pippa, N., et al., *DPPC:MPOx chimeric advanced Drug Delivery nano Systems (chi-aDDnSs): Physicochemical and structural characterization, stability and drug release studies*. International Journal of Pharmaceutics, 2013. 450(1): p. 1-10.
54. Bangham, A.D., J. De Gier, and G.D. Greville, *Osmotic Properties and Water Permeability of Phospholipid Liquid Crystals*. Vol. 1. 1967. 225-246.
55. Yang, L., et al., *Time Resolved UV-Vis Absorption Spectra of Quercetin Reacting with Various Concentrations of Sodium Hydroxide*. Vol. 29. 2009. 1632-5.
56. Blois, M.S., *Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical*. Nature, 1958. 181(4617): p. 1199-1200.
57. Padday, J.F. and D.R. Russell, *The measurement of the surface tension of pure liquids and solutions*. Journal of Colloid Science, 1960. 15(6): p. 503-511.
58. Barnadas, R.R. and X.M. Sabes, *Liposomes prepared by high-pressure homogenizers*. Vol. 367. 2003. 28.
59. Pool, H., et al., *Antioxidant Effects of Quercetin and Catechin Encapsulated into PLGA Nanoparticles*. Journal of Nanomaterials, 2012. 2012: p. 12.
60. Sahoo, N.G., et al., *Preparation and Characterization of Quercetin Nanocrystals*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. 100(6): p. 2379-2390.
61. Manca, M.L., et al., *Improvement of quercetin protective effect against oxidative stress skin damages by incorporation in nanovesicles*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014. 123: p. 566-574.
62. Schäfer-Korting, M., W. Mehnert, and H.-C. Korting, *Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2007. 59(6): p. 427-443.
63. Wang, J. and X.H. Zhao, *Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions affected by medium pH, temperature and co-existing proteins*. Journal of the Serbian Chemical Society, 2016. 81(3): p. 243-254.
64. Ashtikar, M., K. Nagarsekar, and A. Fahr, *Transdermal delivery from liposomal formulations – Evolution of the technology over the last three decades*. Journal of Controlled Release, 2016. 242(Supplement C): p. 126-140.

65. Casiraghi, A., et al., *Nonionic Surfactants: Polyethylene Glycol (PEG) Ethers and Fatty Acid Esters as Penetration Enhancers*, in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, N. Dragicevic and H.I. Maibach, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 251-271.
66. Ostuni, E., et al., *A Survey of Structure–Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein*. *Langmuir*, 2001. 17(18): p. 5605-5620.
67. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based lipid nanocapsules for topical delivery of antioxidants*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020. 579: p. 119126.
68. Elias, P.M., *Epidermal Lipids, Barrier Function, and Desquamation*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1983. 80(1, Supplement): p. S44-S49.
69. Roberts, M.S., et al., *Topical and cutaneous delivery using nanosystems*. *Journal of Controlled Release*, 2017. 247(Supplement C): p. 86-105.
70. Dragicevic, N., J.P. Atkinson, and H.I. Maibach, *Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action*, in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, N. Dragicevic and H.I. Maibach, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 11-27.
71. Sala, M., et al., *Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018. 535(1): p. 1-17.
72. Garcês, A., et al., *Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018. 112: p. 159-167.
73. Huynh, N.T., et al., *Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. 379(2): p. 201-209.
74. Zhai, Y. and G. Zhai, *Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery*. *Journal of Controlled Release*, 2014. 193: p. 90-99.
75. Montenegro, L., et al., *From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016. 32: p. 100-112.
76. Maherani, B., et al., *Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies*. *Current Nanoscience*, 2011. 7(3): p. 436-452.
77. Heurtault, B., et al., *A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers*. Vol. 19. 2002. 875-80.
78. Abdel-Mottaleb, M.M.A., D. Neumann, and A. Lamprecht, *Lipid nanocapsules for dermal application: A comparative study of lipid-based versus polymer-based nanocarriers*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011. 79(1): p. 36-42.
79. Anton, N., et al., *Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2007. 344(1): p. 44-52.
80. Zhai, Y., et al., *Lipid nanocapsules for transdermal delivery of ropivacaine: in vitro and in vivo evaluation*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2014. 471(1): p. 103-111.
81. Zhang, P., et al., *Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation*. *Journal of Controlled Release*, 2016. 244: p. 184-193.
82. Dargaville, T.R., J.-R. Park, and R. Hoogenboom, *Poly(2-oxazoline) Hydrogels: State-of-the-Art and Emerging Applications*. *Macromolecular Bioscience*, 2018. 18(6): p. 1800070.
83. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019: p. 118516.
84. Masaki, H., et al., *Reactive Oxygen Species in HaCaT Keratinocytes After UVB Irradiation Are Triggered by Intracellular Ca²⁺ Levels*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 2009. 14(1): p. 50-52.
85. Glassner, M., M. Vergaelen, and R. Hoogenboom, *Poly(2-oxazoline)s: A comprehensive overview of polymer structures and their physical properties*. *Polymer International*, 2018. 67(1): p. 32-45.
86. Cohen, J., et al., *Interactions of engineered nanomaterials in physiological media and implications for in vitro dosimetry*. *Nanotoxicology*, 2013. 7(4): p. 417-431.
87. Qiao, L., et al., *Sonochemical effects on 14 flavonoids common in citrus: relation to stability*. *PLoS one*, 2014. 9(2): p. e87766-e87766.
88. Barras, A., et al., *Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2009. 379(2): p. 270-277.
89. Pivetta, T.P., et al., *Topical formulation of quercetin encapsulated in natural lipid nanocarriers: Evaluation of biological properties and phototoxic effect*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2019. 53: p. 101148.

Chapitre 4 : Interactions de surface entre la peau et les POx formulés

Après avoir élaboré trois types de nanoformulations à base de POx : nanoémulsions (NE), micelles mixtes (MM) et nanocapsules lipidiques (LNC) comme présenté dans le chapitre précédent, nous avons retenu les MM et LNC pour la suite de notre étude. Avant d'évaluer la capacité de pénétration des POx seuls et formulés à travers l'épiderme, nous nous sommes intéressés à **leurs interactions avec la surface de la peau**. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre bibliographique, la surface de la peau est une surface caractérisée par une topographie, une rugosité et une composition lipidique spécifique. Cet ensemble lui confère des **propriétés chimiques de surface et une énergie libre de surface** particulières. Nous avons donc étudié les interactions physico-chimiques à la surface de la peau qui gouvernent l'étalement des formulations topiques. *In fine*, nous allons donc essayer de déterminer si nos nanoformulations ont une **affinité particulière avec la surface de la peau et si ces interactions conduisent à un meilleur étalement du produit et optimisent la pénétration**.

Cette étude a été réalisée grâce à **une nouvelle collaboration** mise en place avec l'Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire (URCOM), Université du Havre et soutenue par un financement Inter-Carnot. Le Dr Céline Picard et son équipe ont développé un modèle de peau non biologique mimant efficacement les propriétés de surface de la peau. La méthode de caractérisation choisie pour étudier les propriétés physico-chimiques de surface repose sur des mesures d'angles de contact.

Nous avons voulu comprendre comment les POx de différentes structures (chaines lipidiques linéaires ou ramifiées, longueurs de chaîne variées) sont capables d'interagir avec la peau et si cette interaction est maintenue une fois incorporés dans les nanoformulations (Figure 49).

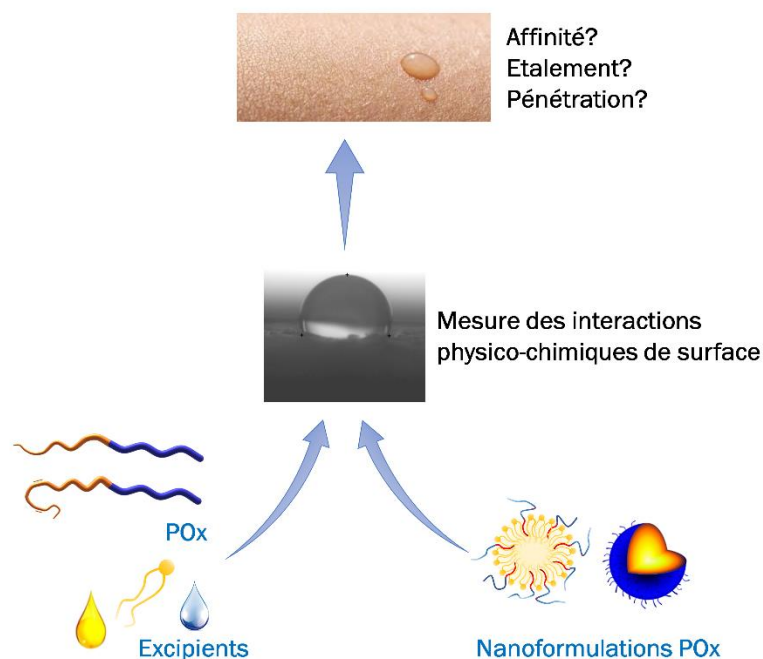


Figure 49 : Etude des interactions physico-chimiques de surface entre la peau et les POx seuls ou formulés

Après avoir réalisé ces expériences sur le modèle non biologique, l'étape suivante était de confirmer les résultats sur explant de peau humaine en utilisant la spectroscopie infrarouge pour évaluer la perturbation de l'organisation des lipides de surface. A cause de la crise sanitaire liée au COVID-19, la session d'expériences a été repoussée. Ainsi, pour ce manuscrit nous limiterons ce travail de recherche à l'étude sur le modèle non biologique de la peau.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord exposer, dans une partie bibliographique, les connaissances actuelles sur la détermination des interactions physico-chimiques de surface par mesure d'angle de contact. Puis, dans une deuxième partie, nous étudierons le comportement des POx aux interfaces (air/liquide, liquide/liquide puis liquide/surface solide) pour mieux appréhender ensuite dans une dernière partie les interactions physico-chimiques entre les nanoformulations sélectionnées et le modèle de peau.

I. Bibliographie sur la détermination des interactions physico-chimiques de surface

La compréhension de la physico-chimie de surface de la peau est importante pour le développement de produits à délivrance topique. Par exemple, **la capacité d'étalement de l'eau sur la peau est un bon indicateur de ses propriétés hydrophile ou hydrophobe**. Ainsi, les mesures de mouillabilité de la peau par une nanoformulation et le calcul de l'énergie libre de surface permettent au niveau de la surface de la peau : d'identifier les interactions physico-chimiques mises en jeu [1], de prévoir l'adhésion de particules et d'évaluer la pénétration de molécules d'intérêt ou la perception tactile.

Par définition, les interactions intermoléculaires à l'interface entre deux phases condensées (solide/solide, liquide/liquide et solide/liquide) ou entre une phase condensée et un gaz (solide/gaz et

liquide/gaz) ne sont pas égales ($\sum \vec{F} \neq 0$). **L'énergie de surface et la tension de surface** sont alors nécessaires pour maintenir ces interfaces. **L'énergie libre totale de surface solide, noté γ_s** , est équivalente à la tension de surface d'un liquide γ_L et est définie comme l'énergie nécessaire pour augmenter d'une unité l'aire d'une phase [2]. Les forces intermoléculaires et notamment **les forces de Van der Waals** jouent un rôle clé à l'interface entre deux phases et donc dans l'énergie de surface. Puisque ces forces sont au cœur des interactions physicochimiques de surface et du modèle mathématique, nous avons choisi de les rappeler dans le Tableau 14. Elles se composent des trois forces de Keesom, Debye et London. Les interactions polaires (acide/base de Lewis) et les liaisons hydrogène sont également à considérer.

Tableau 14 : Rappels des forces intermoléculaires

Forces et Interactions	Description	Ordre de grandeur (kJ.mol ⁻¹)
Van Der Waals	Forces d'attraction entre dipôles permanents ou induits d'atomes ou molécules. Elles ont trois origines qui s'additionnent (Keesom, Debye, London). Interactions qui s'exercent à faible distance.	1-10
Keesom	Force d'attraction entre deux molécules polaires ayant des dipôles permanents dont l'interaction crée un effet d'orientation.	1
Debye	Lorsqu'une molécule apolaire s'approche d'une polaire ayant un dipôle permanent (créant un champ électrique autour d'elle), celle-ci par effet d'induction adopte un dipôle induit.	0,1
London	Le moment dipolaire instantané d'une molécule apolaire crée un moment dipolaire induit sur une autre molécule apolaire. Ces moments dipolaires interagissent entre eux induisant une force attractive, on parle d'effet de dispersion.	10
Hydrogène	Force créée par une interaction électrostatique entre un élément très électronégatif portant au moins un doublet non liant et un atome d'hydrogène lié à un élément très électronégatif	20-40
Acide-Base Lewis	Force créée par un échange d'électrons entre une base et un acide. La base met en commun un doublet électronique libre avec l'acide qui l'accepte dans sa lacune électronique.	

Selon Fowkes, l'ensemble de ces forces ainsi que les interactions électrostatiques et π contribuent à l'énergie libre de surface selon l'équation suivante [3] :

$$\gamma_s = \gamma_\pi + \gamma_{\text{électrostatique}} + \gamma_{\text{Keesom}} + \gamma_{\text{Debye}} + \gamma_{\text{London}} + \gamma_{\text{Debye}} + \gamma_{\text{hydrogène}}$$

Plusieurs modèles mathématiques ont été mis au point pour exprimer l'énergie interfaciale. L'approche de Van Oss est la plus utilisée car plus précise et adaptée au système liquide/surface solide mimant la peau. Elle repose sur les **forces de Van der Waals appelées « Lifshitz – Van der Waals parameters »**, notées γ^{LW} , (comprenant les composantes additives apolaires) et les interactions polaires de type acide/base de Lewis (non additives et asymétriques) [4]. La composante acide/base

se divise en deux paramètres : γ^+ représentant l'acide (accepteur d'électron) et γ^- la base (donneur d'électron). Après traitement mathématique, l'équation du modèle de Van Oss pour déterminer l'énergie libre de surface est [5] :

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2\sqrt{\gamma_L^{LW}\gamma_S^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_L^+\gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_L^-\gamma_S^+}$$

L'angle θ correspond à l'angle de contact entre la surface solide et le liquide et est mesuré juste après le dépôt par la méthode de la goutte posée (Figure 50). Une goutte est déposée à la surface d'un solide plat et horizontal dont la rugosité est considérée comme négligeable. La goutte peut conserver sa forme au cours du temps ou s'étaler en augmentant la surface de contact. Son étalement augmente alors la surface d'interaction liquide/solide et liquide/gaz, et continue jusqu'à atteindre un équilibre. Le degré d'étalement est gouverné par la tension de surface du liquide γ_L , l'énergie libre de surface du solide γ_S et la tension interfaciale entre le liquide et le solide γ_{LS} [6].

Lorsque $\theta = 0^\circ$ le mouillage de la surface est total. Au contraire lorsque $\theta = 180^\circ$, on parle de démouillage. L'angle est généralement compris entre les deux valeurs extrêmes. Si l'angle formé entre une goutte d'eau et une surface est $\theta > 90^\circ$, la surface est hydrophobe. A l'inverse si $\theta < 90^\circ$, la surface est hydrophile [1].

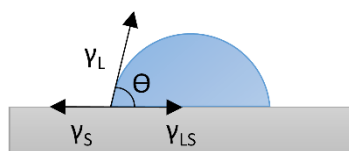


Figure 50 : Mesure de l'angle de contact θ entre une surface solide S, un liquide L et un gaz (air).

L'énergie libre de surface doit être déterminée en utilisant au moins trois liquides de référence dont les tensions de surface sont connues. Il est recommandé de choisir un liquide faiblement monopolaire, comme par exemple le diodométhane et deux solvants polaires tels que l'eau et le formamide [3]. Ils doivent être peu volatils pour éviter leur évaporation lors de la mesure ce qui fausserait les valeurs.

Mavon et al., ont étudié les propriétés de surface *in vivo* sur l'avant-bras et le front [1]. L'étude sur l'avant-bras permet d'analyser la peau normale c'est-à-dire sans excès de sébum. Dans cette zone, **la peau a une tendance hydrophobe** avec un angle de contact avec l'eau supérieur à 90° (généralement autour de 100°). **L'étalement de l'eau à la surface de la peau est une indication de ses propriétés hydrophile ou hydrophobe**. En utilisant le modèle mathématique de Van Oss simplifié, il est possible de mesurer l'énergie libre de surface totale (γ_S) en fonction de la composante de Lifshitz-Van der Waals (γ^{LW}) et composante acido-basique (acide : γ^+ et basique : γ^-).

$$\gamma_S = \gamma^{LW} + 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$$

Le Tableau 15 présente les valeurs d'énergie de surface de la peau humaine (avant-bras). La quasi nullité de sa composante γ^+ (accepteur d'électron) et la forte contribution de la composante γ^- (donneur d'électron) indiquent que la peau possède un caractère **majoritairement électrodonneur**. Ce comportement est qualifié de **monopolaire basique** [7].

Tableau 15 : Valeurs de l'énergie de surface (en mJ/m^2) de la peau humaine (avant-bras), extrait de[7]

γ^{LW}	γ^-	γ^+	γ_s
$35,6 \pm 5,8$	$4,2 \pm 3,0$	$0,8 \pm 0,7$	$38,7 \pm 6,4$

Comme vu dans le chapitre 1 partie I.1, la peau est constituée à sa surface d'un film hydrolipidique correspondant à un mélange de sueur et de sébum. Le sébum est notamment composé d'acides gras libres, de triglycérides, de squalène et de cholestérol et est principalement sécrété par les glandes sébacées. Ce sébum peut selon les zones du corps (comme le front) être sécrété en excès et ainsi modifier les propriétés de surface de peau. Les mesures *in vivo* de Mavon et al. sur le front ont montré que dans cette zone, **la peau a une tendance hydrophile** avec un angle de contact avec l'eau inférieur à 90° (mesuré à 55°)[1]. L'excès de sébum à la surface de la peau impacte aussi l'énergie libre de surface. La présence de sébum se répercute notamment sur la valeur de la composante γ^- en l'augmentant considérablement (Tableau 16). Ceci est dû aux acides gras libres présents dans le sébum qui sont donneurs d'électrons et par conséquent augmentent γ^- . Bien qu'ils puissent exprimer un côté accepteur d'électron avec les groupements hydroxyle présents, ce comportement est masqué par l'hydratation de surface avec l'eau issue de la transpiration ou de l'évaporation de l'eau de l'épiderme [8]. Ainsi, **en présence de sébum, la peau a un comportement fortement monopolaire basique et plus hydrophile.**

Tableau 16 : Valeurs de l'énergie de surface (en mJ/m^2) de la peau humaine en excès de sébum (front), extrait de[7]

γ^{LW}	γ^-	γ^+	γ_s
$35,0 \pm 3,1$	$28,3 \pm 11,5$	$0,5 \pm 0,2$	$42,5 \pm 3,9$

Des modèles non biologiques (nonbiological skin model, NBSM) **mimant les propriétés physico-chimiques de la peau** sont généralement utilisés pour déterminer l'énergie de surface de nouvelles formulations. Des surfaces de polymères tels que le poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) ou le polyamide (Nylon 6) présentant des propriétés monopolaires basiques peuvent être utilisées comme modèle de peau mais de nouveaux modèles plus proches de la topographie de la peau ont été développés : modèle Vitro-skin ou Bioskin. Après une étude approfondie des modèles existants [3], l'équipe l'URCOM a développé et breveté son propre modèle de peau améliorant la topographie et la composition lipidique. Il est composé d'une surface polymère permettant de mieux mimer la microtopographie de la peau et un sébum artificiel dont la composition peut être ajusté en fonction de la zone du corps étudiée (Figure 51).

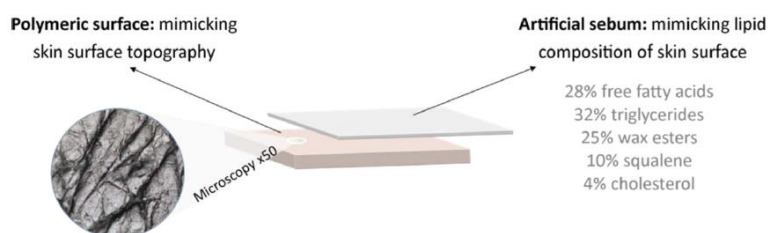


Figure 51 : Présentation du NBSM développé à l'URCOM [9]

Nous avons pu déterminer par mesure d'angle de contact les interactions physico-chimiques mises en jeu entre le modèle NBSM et les POx saturés et insaturés ainsi que les formulations à base de POx de type micelles mixtes et nanocapsules lipidiques. Pour étudier la cinétique et la nature des interactions, deux mesures complémentaires ont été réalisées. D'une part, le dépôt de goutte de solution sur le modèle de peau qui permet d'évaluer l'étalement spontané et par conséquent la cinétique d'interaction. D'autre part, l'étalement manuel de la solution sur le modèle reflétant l'utilisation classique d'un produit topique qui permet de caractériser les propriétés du film résiduel de la solution sur la peau.

II. Etude du comportement aux interfaces air/liquide et liquide/surface des POx

Lors de cette étude, nous avons examiné le comportement aux interfaces des POx : $C_{16}POx_{15}$, $C_{16}POx_{35}$, $C_{18:2}POx_{15}$. Pour faciliter la présentation des données, nous allons comparer le $C_{16}POx_{15}$ aux $C_{16}POx_{35}$ et $C_{18:2}POx_{15}$ pour évaluer l'impact de la longueur de la chaîne POx (DP 15 et DP 35) mais aussi de la nature (saturée et insaturée) et la taille de chaîne alkyle (C_{16} et $C_{18:2}$).

II.1 Etude à l'interface air/liquide

La mesure de la tension de surface des POx à l'interface air/liquide a été effectuée à l'aide d'un tensiomètre muni d'une lame de Wilhelmy (Figure 52). Comme vu dans le chapitre 2 partie IV, **le comportement des POx à l'interface air/liquide n'est pas encore bien maîtrisé** car une diminution discontinue de la tension de surface (zone instable de 0,075 à 0,15 g/L) est observée plutôt qu'une diminution continue et brutale comme cela est souvent reporté dans la littérature. On distingue peu de différence au niveau de la CAC avec des valeurs de **0,15 g/L pour $C_{16}POx_n$ et 0,1 g/L pour $C_{18:2}POx_{15}$** . De même, l'effectivité de $C_{16}POx_{15}$ (33,8 mN/m) est voisine de celle de $C_{18:2}POx_{15}$ (31,8 mN/m). Par contre, l'effectivité de $C_{16}POx_{35}$ est bien plus faible avec 21,6 mN/m. Ainsi, pour cette chaîne alkyle en C_{16} , la longueur de chaîne POx (DP_n) impacte la capacité du POx à abaisser la tension de surface. Cette différence peut s'expliquer par le caractère hydrophile plus marqué avec une chaîne POx plus longue. **En conclusion au regard de l'effectivité mesurée, le $C_{16}POx_{15}$ et le $C_{18:2}POx_{15}$ possèdent un caractère tensioactif marqué.** Leur balance hydrophile-lipophile (HLB) déterminée à 17 pour les deux POx selon la méthode Griffin confirme le caractère tensioactif hydrophile.

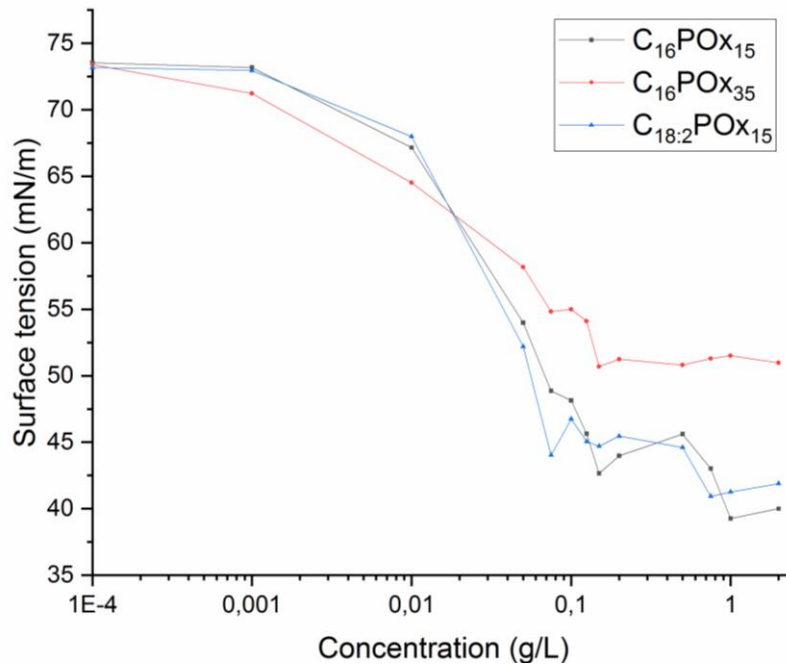


Figure 52 : Tension de surface de C₁₆POx₁₅, C₁₆POx₃₅, C_{18:2}POx₁₅ en fonction de la concentration en POx

Nous avons également étudié la capacité du C₁₆POx₁₅ à diminuer la tension de surface à l'interface liquide/liquide en mesurant la tension de surface entre l'eau et l'huile (Labrafac®) pour deux concentrations en POx (0,5 g/L et 62,5 g/L). Sans POx, la tension de surface est de 50,6 mN/m alors qu'avec le POx, elle s'abaisse à 28,5 mN/m, pour les deux concentrations. Ces résultats montrent que le POx abaisse la tension de surface entre ces deux liquides non miscibles pour permettre d'améliorer leur dispersion lors de leur mélange en formulation.

II.2 Etude à l'interface liquide/surface du modèle de peau non biologique

L'interaction entre les POx et le modèle de peau a été étudiée en déposant des gouttes de solutions aqueuses de POx de concentration croissante. Des mesures d'angle contact ont été réalisées afin de déterminer la capacité d'étalement de ces solutions sur la surface et appréhender leurs interactions potentielles. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si la concentration en POx impactait la valeur de l'angle contact avec la surface NBSM. Pour cela, nous avons réalisé une gamme de concentration de 0,01 à 70 g/L et effectué les mesures immédiatement après le dépôt de la goutte de solution POx (T0 min) puis 1 minute après le dépôt (T1 min). La mesure a été répétée 5 fois. Les résultats obtenus pour le C₁₆POx₁₅ sont présentés sur la Figure 53. A T0, sur l'ensemble de la gamme de concentration, la valeur de Θ est supérieure à 100 ° et l'angle évolue peu avec la concentration. La peau garde donc ses propriétés hydrophobes et n'est pas affectée par la concentration en POx. En revanche, à T1 min, l'angle Θ devient inférieur à 90 ° seulement pour des concentrations supérieures à la CAC (0.1 g/L). Cela indique un changement d'affinité de la peau, qui devient plus hydrophile en présence de POx en concentration supérieure à la CAC. On observe une différence significative pour toute la gamme de concentration entre T0 et T1 minute indiquant un **effet de cinétique** et un **effet de concentration pour T1 min**. Le même phénomène de cinétique et concentration a aussi été observé pour le C_{18:2}POx₁₅. En revanche, le C₁₆POx₃₅ n'a pas induit de changement de comportement de la

peau : à T0 et T1 min, pour l'ensemble des concentrations, l'angle θ est supérieur à 90 ° (108°). Il semble donc que pour une même chaîne alkyle, **une chaîne hydrophile POx plus longue limite les interactions avec la surface**. Cette expérience a été réalisée avec de l'eau (valeur d'angle à 113 °) et aucune différence significative entre T0 et T1 min n'a été observée ; ceci implique que la modification des angles en présence de POx n'est donc pas due à l'évaporation de l'eau.

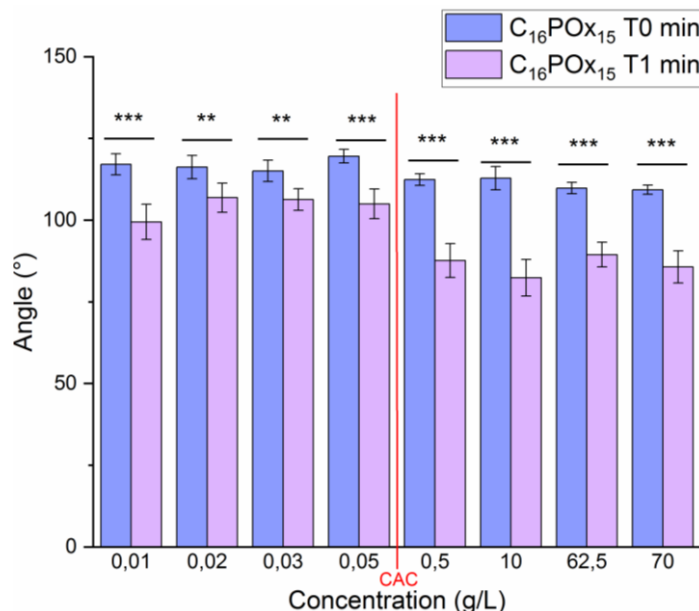
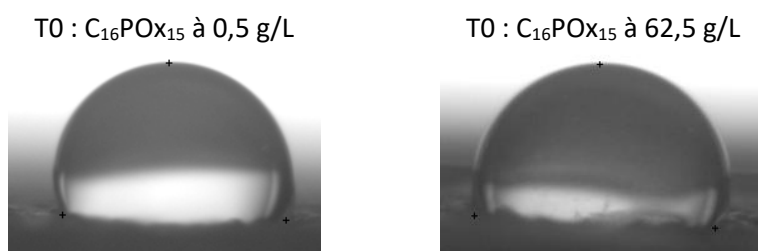


Figure 53 : Angle de contact à T0 et T1 min de C₁₆POx₁₅ en fonction de sa concentration (étude statistique entre T0 et T1 pour une même concentration * P < 0.05, **P < 0.01 et ***P < 0.001)

Nous avons exploré plus en détails **l'effet de cinétique** du POx sur la valeur de l'angle en réalisant la même expérience de mesure d'angle de contact aux concentrations de 0,5 et 62,5 g/L pendant 5 min (une mesure par minute). Ces deux concentrations en POx correspondent à celles utilisées dans les formulations MM et LNC. Les résultats pour le C₁₆POx₁₅ sont présentés Figure 54 sous forme d'une image à T0 et T5 min pour chacune des concentrations sélectionnées. L'étalement de la solution entre T0 et T5 min est significatif pour une concentration en POx de 0,5 g/L (P < 0,001) avec une valeur qui passe de 103 ° à 78 °. La faible valeur de l'angle à T5 min confirme le **changement de comportement de la peau qui devient plus hydrophile suite aux interactions établies avec le POx**. La nature des interactions mises en jeu sera déterminée dans la partie suivante. Cette tendance ne se confirme pas à 62,5 g/L car l'angle de contact varie de 98 ° à 88 °, indiquant un caractère majoritairement hydrophobe du modèle de peau. Pour les deux concentrations, un plateau stable est atteint après 3 min. La mesure contrôle avec l'eau n'a montré aucune différence significative, ceci nous a permis de nous affranchir de phénomènes d'évaporation éventuels.



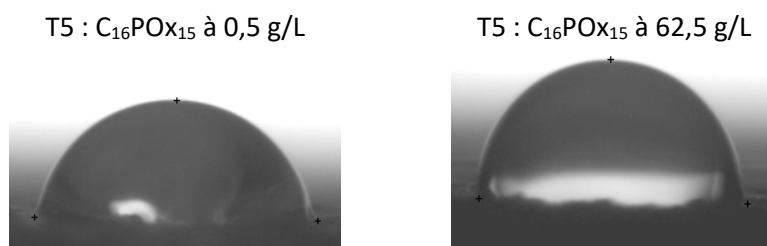


Figure 54 : Evolution de l'angle de contact de $C_{16}POX_{15}$ à 0,5 et 62,5 g/L de T0 à T5 min

Les résultats obtenus pour les deux autres POx aux mêmes concentrations (0,5 et 62,5 g/L) sont regroupés dans le Tableau 17. Une différence entre les deux concentrations est également observée pour les deux autres POx ; ce phénomène est donc propre aux POx. Ainsi, dans le cas du $C_{16}POX_{35}$ la cinétique de réaction est plus lente car à T5 min une différence a été observée mais aucune à T1 min n'était visible. A 0,5 g/L, après 5 minutes, tous les POx modifient les propriétés de surface du NBSM la rendant plus hydrophile ($\theta < 90^\circ$). Il y a une diminution progressive de l'angle de T0 à T3 min puis le plateau est atteint. On note une légère différence de valeur finale d'angle de contact entre les trois POx mais cela est peu significatif. A 62,5 g/L, il y a un abaissement de la valeur de l'angle de T0 à T1 min puis le plateau est directement atteint. L'abaissement des angles de contact n'est pas suffisant pour considérer un changement de propriété. **En conclusion, lorsque les POx sont trop concentrés, il y a peu d'interaction avec la surface.** On ne distingue pas de différence de cinétique ou d'interaction entre la chaîne alkyle saturée et insaturée du POX_{15} . En revanche, pour la chaîne alkyle saturée C_{16} , le POx de DP_n 35 semble avoir une action ralentie par rapport au DP_n 15 mais *in fine* conduisent au même changement de propriété de surface à 0,5 g/L.

Tableau 17 : Récapitulatif des angles de contact obtenus après 5 minutes de cinétique

Polymère	θ à T5 à 0,5 g/L	θ à T5 à 62,5 g/L
$C_{16}POX_{15}$	78°	88°
$C_{16}POX_{35}$	83°	90°
$C_{18:2}POX_{15}$	81°	86°

Nous avons formulé plusieurs hypothèses pour expliquer le peu d'interaction avec la surface dans le cas du $C_{16}POX_{15}$ à la concentration 62,5 g/L par rapport à 0,5 g/L. La différence pourrait s'expliquer par une augmentation de la viscosité qui ralentirait fortement la cinétique d'interaction et augmenterait la valeur de l'angle de contact. Après mesure, les deux concentrations pour le $C_{16}POX_{15}$ présentent la même viscosité (0,725 mPa.s à 0,5 g/L et 0,787 mPa.s à 62,5 g/L) en accord avec la littérature puisque les POx sont connus pour leur faible viscosité en solution aqueuse [10]. La seconde hypothèse s'oriente vers **un effet de déséquilibre du $C_{16}POX_{15}$ à forte concentration vers la formation d'agrégats plutôt que la stabilisation de l'interface liquide/solide.** En effet, les résultats obtenus avec le $C_{16}POX_{15}$ ont montré (i) une capacité à stabiliser l'interface air/liquide reflétée par la diminution de la tension superficielle, (ii) un changement d'interactions liquide/surface solide avec les variations d'angle de contact (bien que faibles) et (iii) un effet de concentration. Ainsi, nous avons illustré Figure 55 cette hypothèse avec un comportement et une orientation des POx aux interfaces. Bien que cette hypothèse n'ait pu être vérifiée, elle s'appuie sur le modèle d'orientation des molécules tensioactives sur une surface hydrophobe développée par Holmberg et al. [6] et est soutenue par le côté peu dynamique des agrégats POx : « frozen behavior » [11].

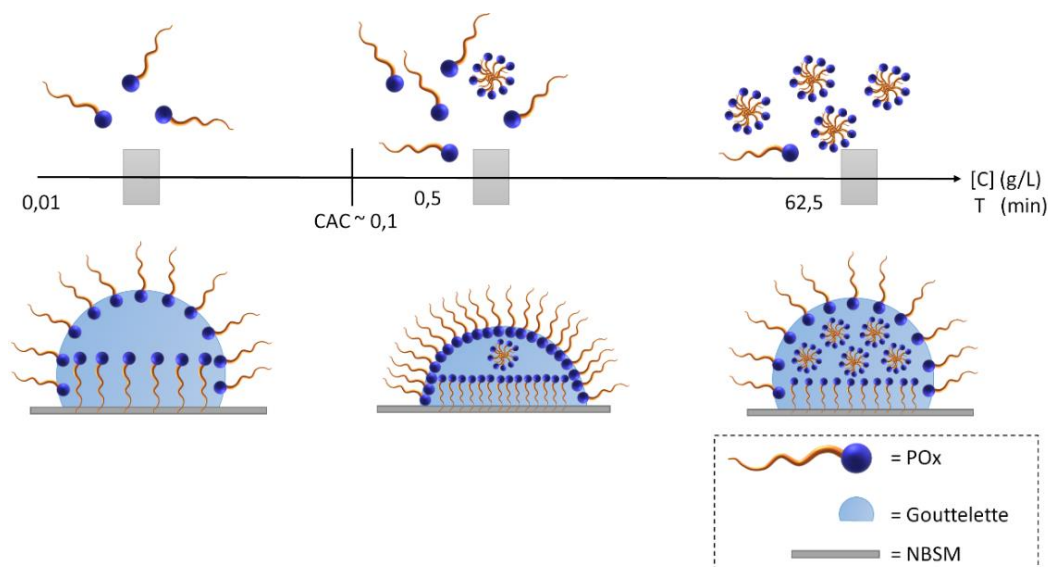


Figure 55 : Hypothèse des interactions potentielles entre le $C_{16}POx_{15}$ et la surface NBSM

Pour comprendre cette différence de comportement, nous avons identifié les interactions physico-chimiques mises en jeu avec le $C_{16}POx_{15}$ pris comme exemple.

II.3 Détermination des interactions physico-chimiques mises en jeu

La solution de POx a été étalée manuellement sur le NBSM suivant le protocole décrit partie III.3.6 et laissée au repos 3 min avant la mesure. L'intérêt de cette méthode est de déterminer comment une fois étalée sur la surface cutanée, la solution de POx **sous forme de film résiduel** peut modifier les propriétés de surface. La solution appliquée étant de composition majoritairement aqueuse, le dépôt sur la surface est relativement hétérogène, ce qui se traduit par des écarts types importants lors des mesures. Les mesures d'angle de contact ont été réalisées avec les liquides de référence : eau, diiodométhane et formamide. Les résultats d'énergie libre de surface (γ_s , γ^+ , γ^- et γ_{LW}) avec les solutions de $C_{16}POx_{15}$ à 0,5 et 62,5 g/L et du modèle NBSM (sans film résiduel) sont présentés Figure 56. L'analyse statistique a été réalisée en prenant le NBSM seul comme référence. Par rapport au modèle de référence, **l'énergie libre de surface totale (γ_s) n'est pas significativement modifiée par le POx à 0,5 qu'à 62,5 g/L** bien que les valeurs de γ_s soient plus élevées. L'étude de chaque constante indique une différence statistique de γ^- et γ_{LW} par comparaison avec le NBSM. A 62,5 g/L, γ^- est significativement plus élevée ($34,4 \pm 15,6$ mJ/m²) qu'à 0,5 g/L ($4,2 \pm 5,7$ mJ/m²) et γ_{LW} est significativement plus faible à 62,5 g/L ($13,2 \pm 2,0$ mJ/m²) qu'à 0,5 g/L ($23,5 \pm 1,4$ mJ/m²). Cette forte augmentation de γ^- indique que **le film résiduel à 62,5 g/L augmente le caractère monopolaire basique et modifie les propriétés de la surface du modèle**. Ce phénomène s'explique par **l'augmentation du nombre des groupements polaires POx à forte concentration**. Par conséquent, l'affinité de surface du modèle NBSM pour les molécules hydrophiles est augmentée permettant un meilleur étalement et une meilleure interaction avec les formulations à base aqueuse. Ce phénomène est également observé sur les autres POx ($C_{16}POx_{35}$ et $C_{18:2}POx_{15}$). **Les POx sont donc capables de former un film résiduel pour augmenter leur affinité avec la surface mais sans profondément modifier les propriétés de surface du modèle.**

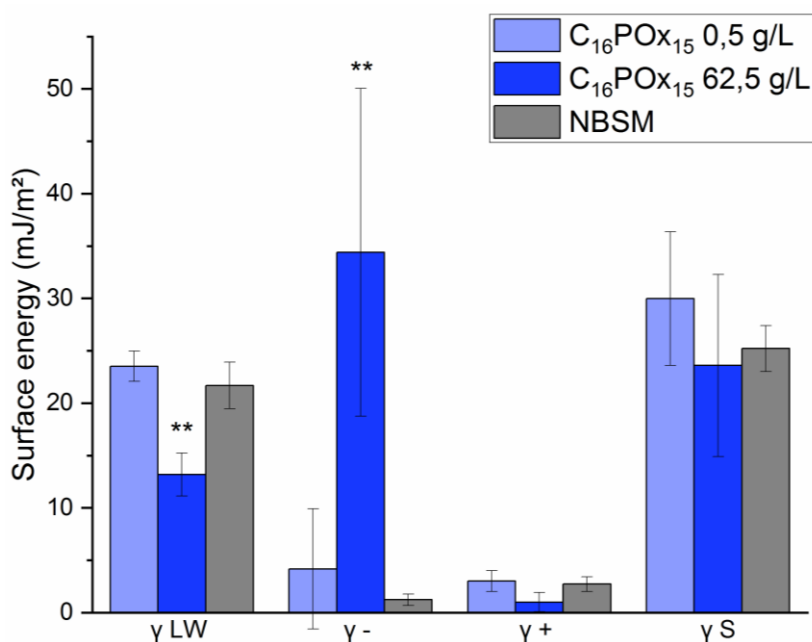


Figure 56 : Energie libre de surface de C₁₆POx₁₅ à 0,5 g/L et 62,5 g/L (**P < 0,001)

Lors de l'étude du comportement des POx aux interfaces, nous avons identifié **une capacité du C₁₆POx₁₅ à abaisser la tension de surface à l'interface air/liquide avec une bonne efficacité. Il est également capable d'interagir spontanément avec une surface solide mimant les propriétés physico-chimiques de la peau en modifiant l'affinité pour les molécules hydrophiles.** Nous avons également déterminé un **effet de cinétique et de concentration** avec une meilleure interaction du POx avec la surface à 0,5 g/L. En comparant le C₁₆POx₁₅ avec le C₁₆POx₃₅ et le C_{18:2}POx₁₅, il semble que la nature de la chaîne alkyle ait peu d'influence sur l'interface solide/liquide alors qu'une augmentation du DP_n influe sur la **cinétique d'interaction.**

Il est difficile de comparer ces résultats avec la littérature car le modèle utilisé a été développé récemment et à notre connaissance, des mesures de physicochimie de surface avec les POx n'ont jamais été réalisées. Toutefois, des études à l'interface liquide/solide ont été menées sur des surfaces hydrophobes dont les propriétés sont proches de celles de la peau. En effet, la peau présente une énergie de surface faible comme certaines surfaces polymères qui peuvent ainsi être utilisées comme modèle mimant les propriétés de surface de la peau [12]. Zdziennicka et al. ont mesuré sur des surfaces de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA) et de polyamide (Nylon 6) les valeurs d'angles de contact de solution de Tween 20, 40 et 60, et ils ont déterminé les constantes d'énergie de surface [13]. Les trois Tween ont un comportement différent selon leur concentration (au-dessus ou dessous de la CAC) et augmentent le côté électrodonneur de la surface solide, comme observé ici avec les POx. L'orientation des macromolécules et leur épaisseur sur la surface solide impactent les propriétés de surface. Ces trois Tween ont été également étudiés à l'interface air/liquide et les valeurs d'abaissement de tension de surface pour les trois polymères (respectivement 34,9 mN/m, 37,8 mN/m et 39,5 mN/m) sont proches de celles obtenues pour le C₁₆POx₁₅ (39,3 mN/m) confirmant aussi le pouvoir tensioactif du POx [14]. Ainsi, les valeurs d'énergie obtenues aux interfaces air/liquide et liquide/solide pour le C₁₆POx₁₅ sont cohérentes et en accord avec la littérature.

Dans un deuxième temps, nous allons regarder si une fois formulés dans les nanoformulations de type micelles mixtes et nanocapsules lipidiques les POx gardent leur capacité d'interaction avec le NBSM et leur effet de cinétique.

III. Etude de la physico-chimie de surface des formulations à base de POx sur un modèle non biologique

Au cours de ce travail, nous allons étudier l'évolution de l'angle de contact et de l'énergie libre de surface des POx formulés en MM et LNC. Pour comprendre les interactions mises en jeu et l'apport des excipients en formulation, chaque constituant a été analysé à la concentration à laquelle il est utilisé en formulation. Deux POx de structure différente ont été comparées : une linéaire saturée et une linéaire insaturée pour évaluer l'impact de la chaîne alkyle sur l'affinité avec le modèle de peau. Cette partie est rédigée sous forme de publication et sera soumise prochainement dans le journal *Colloids and Surfaces B : Biointerface*.

Study of the physicochemical interactions of nanoformulations based on polyoxazolines with a skin surface model

L. Simon¹, C. Picard^{2*}, V. Lapinte¹, N. Marcotte¹, J.M. Devoisselle¹, S. Bégu^{1*}

1: ICGM, Montpellier University, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

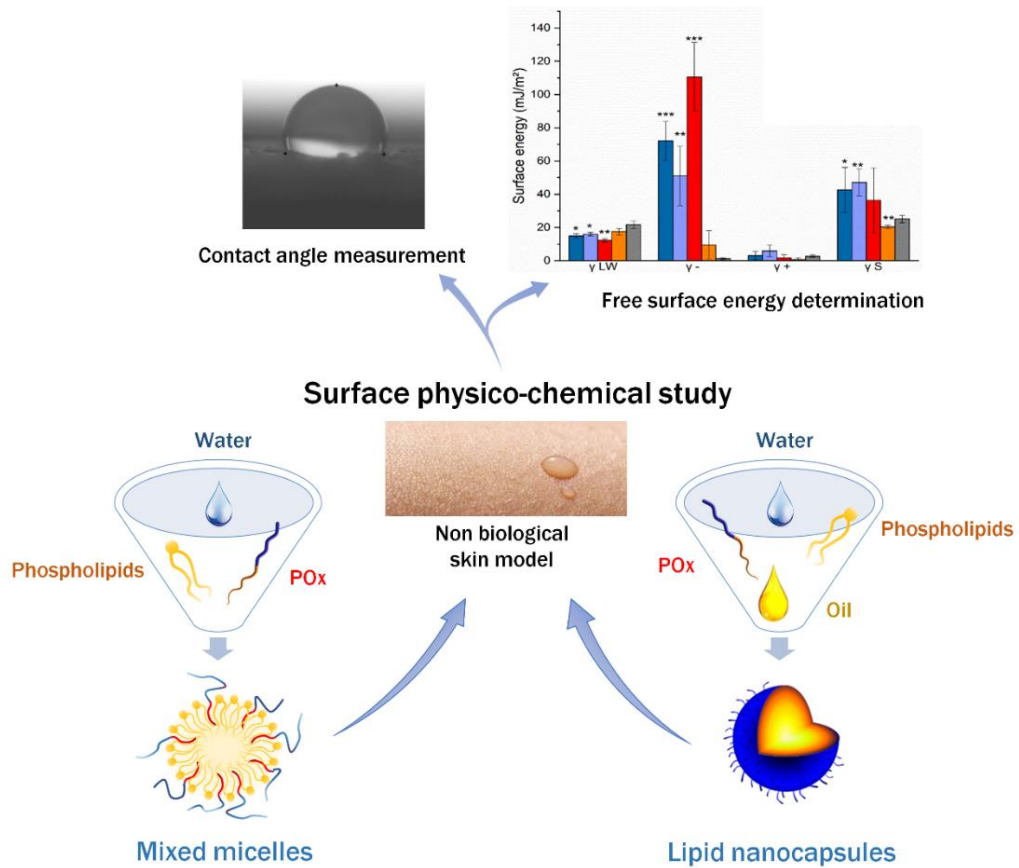
2: Normandie Univ, UNILEHAVRE, FR 3038 CNRS, URCOM, EA 3221, France

Abstract

Mixed micelles and lipid nanocapsules based on amphiphilic polyoxazoline ($C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$) were studied in presence of nonbiological human skin model for potential topical delivery. The understanding of the physicochemical interactions between the nanoformulations and the skin surface was investigated using contact angle measurements and free surface energy determination with Van Oss model in order to predict how the formulations interact and modify the skin surface properties. In brief, the formulations were able to modify the skin model physicochemical properties and enhance their spreading and affinity. Regarding in detail each formulation excipients, the crucial role of phospholipids on the formulation behavior was demonstrated.

Key words: Skin model, physicochemical properties, polyoxazoline, lipid nanocapsule, mixed micelles, free surface energy, contact angle

Graphical abstract



III.1 Introduction

To protect the human body from external aggressions, the skin acts as a shield. More especially, the *stratum corneum* with its unique composition and structure of corneocytes embedded in lipid matrix such as “brick and mortar” ensures stiffness and protection [15]. The external aggressions defined as “skin exposome” [16] (pollution, cigarette smoke, UV) directly impact the skin by inducing increased production of radical oxygen species (ROS). Overall, the excess of ROS accelerated skin aging and higher risks of skin cancer [17]. To help the skin maintain its essential integrity for its barrier function, topical products are proposed to deliver active ingredients and to prevent skin damages from happening. Once applied on the skin, topical product spreads onto the surface and then interacts with the skin surface components mainly the sebum. Therefore, it is of interest to predict and understand how the product interacts and modifies the skin surface properties to enhance penetration. To do so, a method was developed based on physicochemical interactions and free surface energy of the skin surface determination. Van Oss et al. studied the interactions of Lifshitz- Van der Waals gathering the forces of Keesom (orientation), Debye (induction) and London (dispersion) and the interactions acide-base (electron acceptor and electron donor, respectively) to characterize the interfacial energy [4]. Mavon et al. applied this equation model to study the effect of sebum on human skin and proved that skin behaves like a basic monopolar surface and sebum increases its hydrophilic affinity (strong electron donor component) [7],[8].

Therefore, Van Oss model and method can predict the spreading and affinity of the topical product on the skin. However, to avoid toxic hazard during *in vivo* testing or wasting expensive *ex vivo* skin, nonbiological skin models (NBSM) were fine tuned to mimic the skin surface properties. Eudier et al. previously deeply examined some nonbiological model regarding their physicochemistry [3] and

patented a model reproducing the skin topography and sebum composition. A correlation between the tested solution on their model and *in vivo* results was established [9].

Thus, this NBSM was selected to investigate the surface interactions with new lipid nanoformulations based on amphiphilic polyoxazolines. Polyoxazoline (POx) is a bioinspired nonionic polymer with a risen interest for therapeutic use due to its excellent biomedical properties [18]. The hydrophilic POx was associated with lipid alkyl chain to form amphiphilic POx also called LipoPOx [19]. The LipoPOx will be called POx in this article to ease the comprehension of the study. Various POx were investigated for their interesting features in development of nanodrug delivery systems and many were developed for intravenous injection delivery. However, POx was also formulated for skin delivery in lipid based nanoformulations such as liposomes, mixed micelles (MM) [20] and lipid nanocapsules (LNC) [21] as stabilizing agent and potential penetration enhancer. MM and LNC were proved to encapsulate, protect and deliver while maintaining the molecule bioactivity in our case a strong antioxidant: quercetin. These two formulations have different composition and morphology suggesting divergent behavior. MM is composed of phospholipids and POx with a hydrophobic core made of the entanglement of hydrophobic chains. On the contrary, LNC is highly ordered with an oily core surrounded by a phospholipid rigid capsule and POx corona. The resulting nanoscale mechanical properties might influence the interaction with the NBSM. Now, as POx have never been used for topical delivery, our work evaluate the MM and LNC interactions with the NBSM and to characterize the free surface energy. Two different POx, one with a linear saturated and one with a linear unsaturated alkyl chain, were explored to see if one of them leads to better skin affinity and penetration efficiency. To go further into understanding the surface physicochemistry, each component of the two formulations will be investigated such as POx.

III.2 Materials and Methods

-For POx synthesis:

2-Methyl-2-oxazoline (MOx, Sigma Aldrich, 99.0%) was dried over CaH₂, distilled at reduced pressure and stored under nitrogen atmosphere. Iodo-hexadecane (95.0 %), potassium hydroxide (KOH), lithium aluminum hydride (LiAlH₄, 95 %), trimethylamine (98 %), methanesulfonyl chloride (99.7 %) acetonitrile, diethyl ether, anhydrous tetrahydrofuran (99 %), methanol and acetone were bought from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Germany). Linseed oil was brought from Bioplanète (France).

-For POx based nanoformulations:

Phosphatidylcholine (L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk \approx 60%) and Brij[®]58 were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Germany). Lipophilic Labrafac[®] (caprylic acid triglycerides) was brought from Gattefossé (Saint-Priest, France) and Lipoid S75[®] (soybean phospholipids with 70% phosphatidylcholine) was kindly provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Sodium chloride (NaCl) was bought from VWR. MilliQ water was produced from Milli-Q Gradient A10 (Merck Millipore, Germany) apparatus.

-For contact angle measurements:

Three reference liquids were used to perform surface free energy calculations: ultrapure water (resistivity of 18 M Ω .cm⁻¹ at 25 °C), diiodomethane (analytical grade, 99% purity), and formamide (analytical grade, 99% purity).

III.2.1 Amphiphilic polyoxazolines (POx) synthesis: C₁₆POx_n and C_{18:2}POx_n

Both polyoxazolines (POx) syntheses were based on cationic ring-opening polymerization of MOx performed under nitrogen atmosphere.

The polymerization of C₁₆POx_n was initiated with the commercialized iodohexadecane. Regarding C_{18:2}POx_n, the initiator of the polymerization was produced from the linseed oil in two steps. First the linseed oil (4 g, 4.55 mmol) was reduced by lithium aluminum hydride (9 eq, 41 mmol) under nitrogen atmosphere in dry tetrahydrofuran for 8 h. The organic phase was then solubilized in dichloromethane and washed with a solution of sodium chloride saturated. The corresponding fatty alcohol (NMR spectra Figure SI 1) was obtained with a yield of 98 %. Then, methanesulfonyl chloride (1.5 eq, 22.5 mmol) and trimethylamine (1.5 eq, 22.5 mmol) were added to the fatty alcohol in dry diethyl ether for 8 h. After washing with water and dried on MgSO₄, the initiator of the polymerization (C_{18:2}OMs) was synthesized (NMR spectra Figure SI 2) with a yield of 93 %.

C₁₆POx_n was synthesized after dissolving iodohexadecane (3.564 g, 10.1 mmol) and MOx (15 eq, 151.7 mmol) in dry acetonitrile (0.5 M). After strong agitation at 80 °C for 8 h, the solution was quenched with potassium hydroxide dissolved in methanol (5 eq, 50.5 mmol, 5M). The mixture was left under magnetic stirring at 40 °C for 8 h. The C₁₆POx₁₅ was obtained after precipitation dropwisely in cold diethyl ether and filtration [20]. C₁₆POx₁₅ had a molar mass of 1500 g/mol and a critical aggregation concentration of respectively 150 mg/L. C_{18:2}POx₁₅ synthesis occurred in the same conditions with the initiator (C_{18:2}OMs) (2.5 g, 7.8 mmol) left to react with MOx (15 eq, 117 mmol) in dry acetonitrile (0.5 M). The polymerization and purification conditions remained the same as C₁₆POx₁₅. C_{18:2}POx₁₅ (NMR spectra Figure SI 3) had a molar mass of 1500 g/mol and a critical aggregation concentration of respectively 100 mg/L.

III.2.2 Preparation of mixed micelles (MM)

The mixed micelles (MM) were produced using the thin film method with POx and phosphatidylcholine (PC) at the molar ratio 1:40. The components were dissolved in chloroform: acetone in 1:1 volume ratio and the film was made after evaporation of the solvent mixture under vacuum at 40 °C. The film of PC and POx was hydrated with filtered phosphate buffered saline (PBS, 150 mM, pH 7.4). The solution was then processed 5 times with a high pressure homogenizer (Microfluidizer LV1, Microfluidics, USA) at 10 000 PSI. The size of MM was measured with a Zetasizer NanoZS apparatus (Malvern Instrument, UK) at 18 nm (PDI 0.3) [20].

To evaluate the impact of PC excipient on the nonbiological skin model surface properties, the phospholipids were prepared as liposome at the same concentration as in MM (10 g/L).

III.2.3 Preparation of lipid nanocapsules (LNC)

The lipid nanocapsules (LNC) were composed of POx (200 mg), caprylic acid triglycerides oil (Labrafac®) (150 mg) and water (650 mg) and additional phospholipids (Lipoid® S75) (15 mg) and NaCl (30mg). The mixture was heated at 85 °C and cooled down to 30 °C three times and then sonicated for 4 min at 30 % amplitude with a sonication probe (Branson Ultrasonics Corporation, USA). The solution was heated and cooled down again and 2.5 mL of cold water was added under magnetic stirring. The resulting LNC size was about 30 nm and a PDI of 0.16 [21].

To evaluate the impact of S75 excipient on the nonbiological skin model surface properties, the phospholipids were prepared as liposome at the same concentration as in LNC (5 g/L).

III.2.4 Nonbiological skin surface model

The model was developed by Eudier et al. and the production of the NBSM was deeply explained in their article [9]. The NBSM was made of two parts, one polymeric material (biocompatible silicon) mimicking the surface topography and a coating of artificial sebum (28% free fatty acids, 32% triglycerides, 25% was esters, 10% squalene and 4% cholesterol) reproducing the lipid composition of skin face.

III.2.5 Advancing contact angle measurement

The contact angles were measured with a portative goniometer (PGX +, ScanGaule, France) associated to a high resolution camera and connected to a software (PGPlus). A syringe with an internal diameter of 0.77 mm was used to deposit the solution droplet on the surface. Five successive droplet deposition were performed to reach a final volume of droplet of 7 μL to measure the advancing contact angle. Five pictures were taken immediately after each deposition. Contact angles were determined with the software on both sides of the droplet, the maximum value of the two sides mean from the five measurements was selected. This entire measurement procedure was repeated five times for each solution tested on the NBSM. All measurements were conducted at 20 °C.

The kinetics measurement over 5 minutes was performed with the same protocol. After deposition, a picture was taken every minute. The same kinetic measurement was performed with water and no significant modification of contact angle was observed showing that the evaporation is neglected.

III.2.6 Free surface energy determination

To determine the free surface energy, 20 μL of solution were dropped on the NBSM surface of 5 cm^2 and spread manually with 15 rotations and left untouched for 3 minutes. Contact angles with water, diiomethane and formamide were performed with the same procedure as described in 2.5. The Van Oss was employed to determine the free surface energy using the Lifschitz-Van Der Waals (γ_{LW}) components (interactions Keesom, Debye, London) and acid-base components (electron acceptor γ^+ and electron donor γ^-) [7], [4]. Each components was determined with the following Young equation:

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2\sqrt{\gamma_L^{\text{LW}}\gamma_S^{\text{LW}}} + 2\sqrt{\gamma_L^+\gamma_S^-} + 2\sqrt{\gamma_L^-\gamma_S^+}$$

The determination of this equation is further explained in Eudier et al. article [9].

III.2.7 Statistical analysis

The statistical analysis of the data conducted on the contact angles and free surface energy were performed using the Origin Pro software 8.1 (OriginLab, USA). A two-sample t-test with equal variance was carried out to compare results one by one. The P value reflects the significance with *P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001.

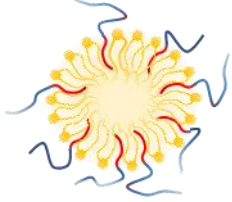
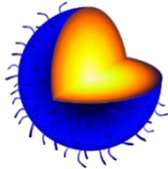
III.3 Results and discussion

III.3.1 Presentation of the mixed micelles and lipid nanocapsules

In order to understand the interactions of the MM and LNC with the surface of NBSM, the main features of the formulations are summarized in Table 1. This table reflected the difference of composition and morphology of the two formulations. MM is mainly composed of phospholipids

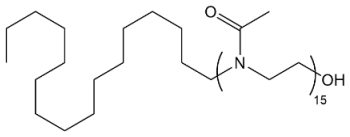
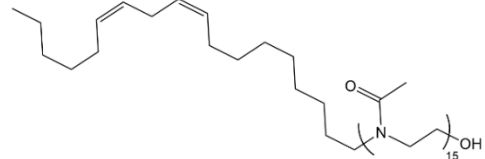
whereas LNC has more POx and oil. Regarding their morphology, the hydrophobic core of MM correspond to the entanglement of phospholipids and POx alkyl chains [20] whereas for LNC, it is a rigid capsule of phospholipids and POx and a soft oil core. The mechanical properties due to the rigid capsule of LNC were confirmed with no deformation observed up to a constraint of 10-20 nN [21].

Table 1: Composition and concentration of MM and LNC

Mixed micelles			Lipid nanocapsules		
Structure					
Size (PDI)	20 nm (0.3)		30 nm (0.16)		
Name	Composition	Concentration (g/L)	Name	Composition	Concentration (g/L)
Liposome PC	Phosphatidylcholine	10	Liposome S75	70% Phosphatidylcholine + 30% soy bean lecithin	5
POx	C ₁₆ POx ₁₅ or C _{18:2} POx ₁₅	0.5	POx	C ₁₆ POx ₁₅ or C _{18:2} POx ₁₅	62.5
			Labrafac®	Caprylic acid triglycerides	48

The characteristics of the two POx polymers: structure, molar mass, CMC, calculated HLB are summarized in Table 2 to evaluate the impact of the alkyl chain of the two different POx in formulation. Even if their structures are different, their properties do not differ a lot. The presence of insaturation of C_{18:2}POx₁₅ by contrast to the linear character of C₁₆POx₁₅ should reduce the mobility of the alkyl chain and induce another behavior such as lower kinetic. The other components such as the excipients used in the formulations were then examined as described in Table 1.

 Table 2: Summary of C₁₆POx₁₅ and C_{18:2}POx₁₅ characteristics

Properties	C ₁₆ POx ₁₅	C _{18:2} POx ₁₅
Structure		
Molar mass (g/mol)	1520	1540
CMC (mg/L)	150	100
Effectivity (mN/m)	33.8	31.8
Calculated HLB	17	16.7

III.3.2 Interactions of mixed micelles and lipid nanocapsules with the NBSM model

The contact angle of the two formulations on the NBSM was measured from 0 to 5 minutes to evaluate the spontaneous spreading of the solution on the surface after a droplet deposition and the potential kinetic effect over 5 minutes (Figure 1).

The NBSM mimicking the physicochemical properties of the surface of the skin behaves as a basic monopolar surface. The contact angle of water is about 100° reflecting the hydrophobic surface properties of NBSM. At T0, just after deposition on the NBSM all formulations behaved as water (due to the aqueous continuous medium) with a contact angle of about 100° . Afterwards, a kinetic effect occurred during the first minutes with a sharp decrease of the contact angle for formulations with $C_{16}POx_{15}$ (50° for MM and 55° for LNC) and with a slight decrease for $C_{18:2}POx_{15}$ (84° for MM and 87° for LNC). After 3 minutes, a plateau was reached. A contact angle lower than 90° means that the surface is modified by the deposited formulation becoming more hydrophilic. This also implies that the formulation has affinity with the surface. From this plateau, a significant difference between the two formulated POx was demonstrated but none between the type of formulations. To conclude, the POx alkyl chain rapidly dominates over the formulations effect or concentration of POx. Formulations with $C_{16}POx_{15}$ reacted quickly with the surface and modified its properties to more hydrophilic ones whereas $C_{18:2}POx_{15}$ had almost no impact. This might be explained by the lower mobility of the unsaturated alkyl chains.

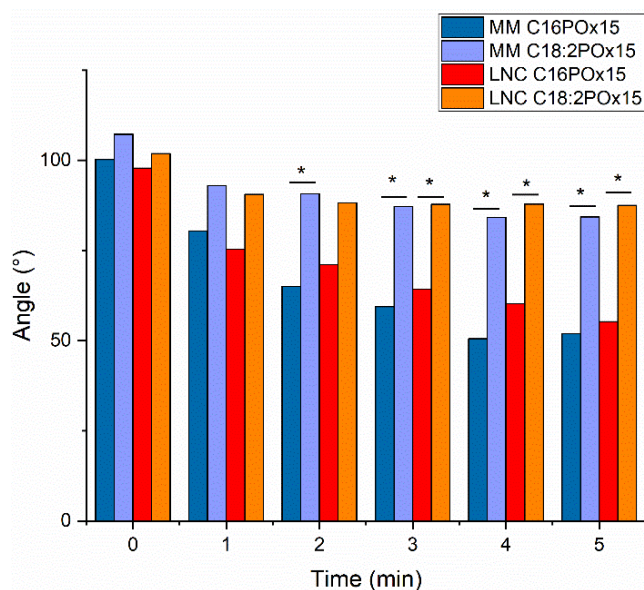


Figure 1: Contact angle of MM and LNC with $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ over 5 minutes after deposition on the NBSM. Statistical analysis was performed by a two-sample *t*-test between the same formulation with different POx (* $P < 0.05$)

To get rid of the kinetic effect and understand the interactions, the formulations were manually spread on the NBSM according to the procedure described. The surface was covered with a formulation residual film and left untouched for 3 minutes. It was noticed that the spreading was not completely homogenous on the surface. This might be explained by the weak interaction of the hydrophobic surface with a hydrophilic water based solutions in addition to the lack of adsorption due to the polymeric nature of the NBSM. The total surface energy (γ_s) was composed of 3 components (γ_{LW} , γ^+ , γ^-) (Figure 2). The surface energy of the NBSM with no formulation applied was measured and considered as a reference for statistical analysis.

The residual film after application on the NBSM was first characterized as described [9], after 3 minutes looking at the water contact angle. Before any product application, the NBSM had a water angle of $118.6 \pm 2.2^\circ$ whereas after formulations application, the value decreased as follows: LNC $C_{18:2}POx_{15}$ ($91.7 \pm 6.3^\circ$) > LNC $C_{16}POx_{15}$ ($41.2 \pm 4.2^\circ$) > MM $C_{18:2}POx_{15}$ ($35.2 \pm 4.9^\circ$) > MM $C_{16}POx_{15}$ ($32.5 \pm 4.9^\circ$). The residual film obtained after spreading of the formulations and especially MM deeply modified the surface properties as Eudier et al. have previously described with standard emulsion [9]. The free surface energy might help understanding the ongoing interactions. All the following modifications were proved to be significant.

The total surface energy (γ_s) of NBSM (25.2 ± 2.2 mJ/m²) increased with both MM, $C_{16}POx_{15}$ (42.6 ± 13.5 mJ/m²) and $C_{18:2}POx_{15}$ (47.1 ± 8.2 mJ/m²). The apolar and electron donor components explained these modifications. For both MM, γ^- increased while γ_{LW} was lowered thus reflecting a higher basic monopolar behavior. MM $C_{16}POx_{15}$ led to a higher increase of γ^- (72.2 ± 11.6 mJ/m²) compared to MM $C_{18:2}POx_{15}$ (51.1 ± 17.8 mJ/m²). Overall, once spread on the surface both POx from MM behaved the same way with a modification of the surface energy through the electron donor component.

Regarding the LNC, with $C_{16}POx_{15}$ γ_s increased (36.4 ± 19.5 mJ/m²) whereas it decreased with $C_{18:2}POx_{15}$ (20.3 ± 1.1 mJ/m²). The higher electron donor component of $C_{16}POx_{15}$ (110.7 ± 20.6 mJ/m²) can explain this result. Therefore, POx behave differently once formulated into lipid nanocapsules with $C_{16}POx_{15}$ leading to faster kinetic of interaction with skin surface model compared to $C_{18:2}POx_{15}$.

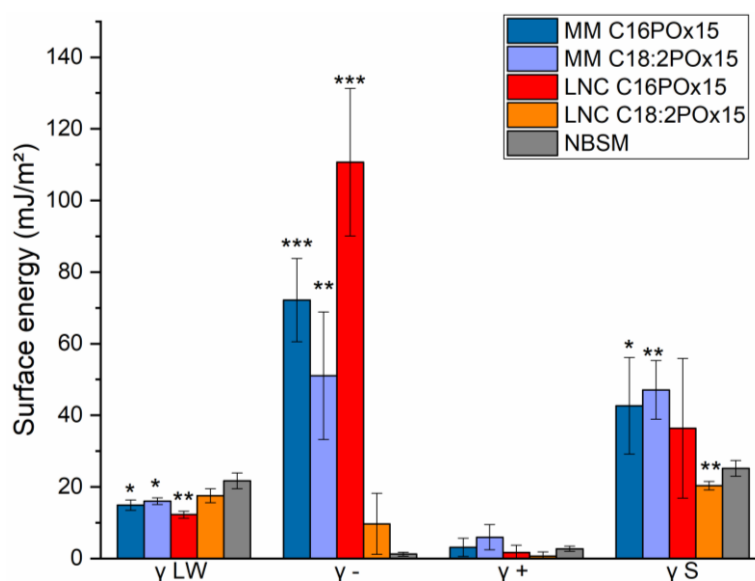


Figure 2: Free surface energy of NBSM after application of MM and LNC with $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$. Statistical analysis was performed by a two-sample t-test between the NBSM and formulations (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

As a conclusion, with MM of both POx the NBSM became more monopolar basic meaning more hydrophilic inducing more interactions with polar molecules. Higher surface energy was reached with MM indicating a better affinity and spreading on NBSM [9]. Regarding the LNC, the saturated POx lead to the same results as MM but the unsaturated one did not modify significantly the NBSM properties. This difference of behavior of $C_{18:2}POx_{15}$ in the two formulations should be explained by an analysis of each component effect.

III.3.3 Impact of each component of the nanoformulations

Knowing that each component might influence the formulation behavior and explain the interactions observed in the previous part, all excipients were analyzed on their own.

First, the contact angle of both POx solution over 5 minutes was measured at the concentration they were introduced in formulation: 0.5 g/L for MM and 62.5 g/L for LNC (Figure 3).

Overall, the contact angle did not decrease as much as for the formulations. However, two trends appeared at 0-1 minute where the concentration dominated over POx and the opposite (POx dominated over concentration) at 3-5 minutes when a plateau was reached. A significant difference ($P < 0.001$) for $C_{16}POx_{15}$ from 0.5 g/L (78°) to 62.5 g/L (88°) was observed at 5 minutes and none for $C_{18:2}POx_{15}$ (respectively 81° and 86°). Therefore, no effect of alkyl chain was clearly noticed and a slight effect of concentration with more hydrophilic modification at 0.5 g/L ($\theta < 90^\circ$).

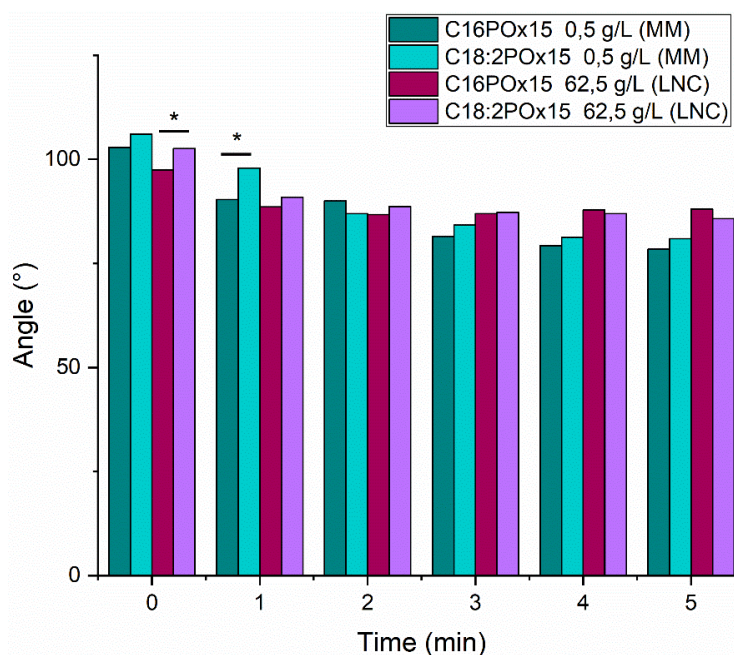


Figure 3: Contact angle of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ over 5 minutes as a function of time. Statistical analysis was performed by a two-sample t-test between the same formulation with different POx ($*P < 0.05$)

Secondly, the free surface energy was evaluated separately for MM and LNC with the formulation, the POx and the excipients. Phospholipids were evaluated as liposomes at the concentration in formulation. The surface energy of the NBSM with no formulation applied was measured and considered as a reference for statistical analysis.

Study of each component for mixed micelles

Among the two MM formulations and their components ($C_{16}POx_{15}$, $C_{18:2}POx_{15}$, and liposomes PC), the PC have the higher surface energy γ_s (51.1 ± 2.9 mJ/m²). We do not observe any difference between the intermediate values of MM formulations related to the corresponding POx. From all these results we deduce that phospholipid PC was the component which mainly governed the interactions skin model/nanoformulation.

Looking at the other γ_s components: γ^- and γ_{LW} , both POx had no significant difference with NBSM reference. Nevertheless, C₁₆POx₁₅ seemed to slightly impact more the NBSM properties. On the other hand, liposome PC and both MM had significant increase of γ^- and slight of γ_{LW} . As a conclusion the MM behavior was ruled by the phospholipids PC modifying the properties to more basic monopolar. The main component of the formulation dominated the physicochemical interactions.

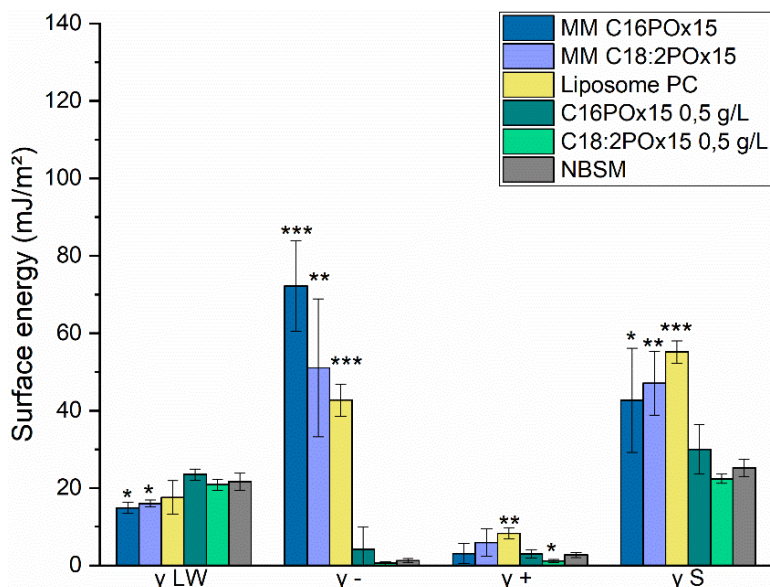


Figure 4: Free surface energy of MM with each constituent for both POx. Statistical analysis was performed by a two-sample t-test between NBSM and excipients (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Study of each component for lipid nanocapsules:

As observed with MM formulations, the POx did not significantly impact the γ_s unlike the two other excipients: phospholipid S75 (46.3 ± 11.0 mJ/m²) and Labrafac® (47.6 ± 0.3 mJ/m²). For liposome S75, the increase of γ_s and especially the drastic rise of γ^- (107.6 ± 32.6 mJ/m²) seemed to affect the LNC C₁₆POx₁₅ (110.7 ± 20.6 mJ/m²) and not LNC C_{18:2}POx₁₅ (9.6 ± 8.5 mJ/m²). This phenomenon can be attributed to the difference of C₁₆POx₁₅ and C_{18:2}POx₁₅ behavior related to this component. The additional effect of liposome S75 and C₁₆POx₁₅ led to the very high electron donor behavior of LNC C₁₆POx₁₅. The difference of γ^- between the two POx seemed to explain the resulting difference of the two LNC. Regarding the apolar component, all excipients decreased value compared to NBSM except the oil (Labrafac®) that had a major rise due to its apolar nature.

To conclude, the phospholipid S75 triggered the behavior of LNC even if it was not the main component of the formulation. This can be linked with their surfactant characteristics and capacity to modify skin properties as demonstrated by Mavon et al. with the study on the sebum [8]. However, the POx still modulated the modification final properties with a difference observed between C₁₆POx₁₅ and C_{18:2}POx₁₅.

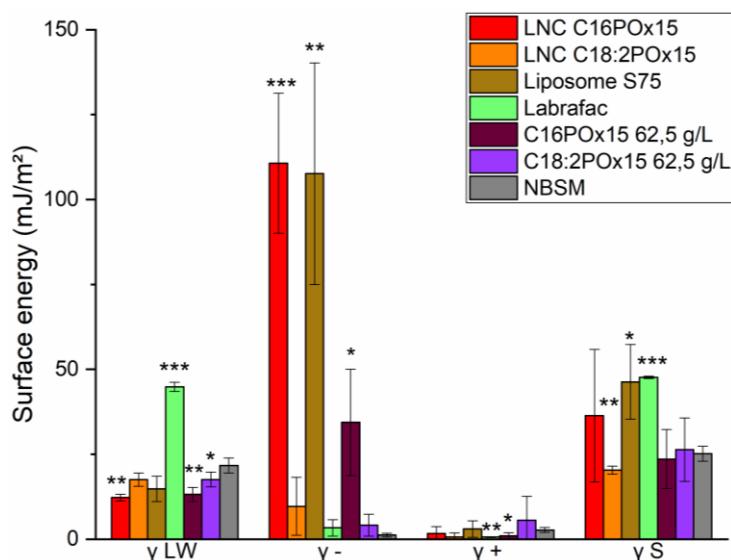


Figure 5: Free surface energy of LNC with each constituent for both POx. Statistical analysis was performed by a two-sample t-test between NBSM and excipients (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

The saturated POx interacted rapidly with the NBSM and modified the properties illustrated on the γ for both formulations. The saturated alkyl chains must be more flexible and have less steric repulsion than the unsaturated ones. This phenomenon is reinforced by the air/liquid interfacial behavior with a slight difference of C₁₆POx₁₅ vs C_{18:2}POx₁₅. Indeed, C₁₆POx₁₅ is slightly more hydrophilic (CMC of 150 vs 100 mg/L) and has a better effectivity (33.8 vs 31.8).

The effect of phospholipids on MM and LNC behavior might also be linked to the formulation structure. MM are made of an entanglement of phospholipids and POx that seem flexible and soft. On the contrary, LNC are highly ordered with oily core, phospholipids (S75) shell and POx corona therefore, even if phospholipids are the lowest components as they are located in the outer part of the formulation, they interact directly with the surface compared to the oil located in the inner part. Moreover, the mechanical properties of LNC (rigid capsule) might lower the impact with less interaction capacity and during spreading on surface compared to MM. As the measured surface properties are very sensitive, a nanosized organization of each formulation might matter.

It is difficult to compare these results with the literature as POx alone and formulated POx have never been tested on skin or on the NBSM and the surface physicochemistry is seldom studied. However, we can discuss with the experiments conducted by Mouzouvi et al on the lipid nanocapsules surface properties evaluated with drop tensiometry measurement [22]. Even if these LNC were based on PEG, the formulations were proved to lower the surface tension (35 mN/m) compared to the polymer alone (38 mN/m). Moreover, the impact of phospholipids on their physicochemical properties was demonstrated. These findings are in agreement with the LNC POx. Indeed, the physicochemical interactions were improved with LNC POx compared to POx alone and the phospholipids were shown to play a key role in these interactions.

III.4 Conclusion

This work investigated the surface interaction of the MM and LNC nanoformulations with a nonbiological skin model mimicking the human skin physicochemical properties. Both formulations

produced residual film able to modify the NBSM properties to more hydrophilic behavior (more electron donor γ) thus enhancing the spreading and affinity of the formulations with the surface. This could lead to a better penetration capacity. Looking at the free surface energy components, both formulations behavior was governed by the main component. MM was led by the phospholipids (PC) and LNC by the phospholipids (S75) and slightly the POx. However, the nanostructure of the formulations should also be considered and not only the composition itself. The two formulations are interesting and none is better than the other one. The choice of formulation should be made depending on the goal willing to be achieved. Regarding the two POx tested, the saturated one has shown a pronounced kinetic effect indicating a better flexibility and fast interaction with the surface. However, compared to the influence of phospholipids on the formulations behavior and the modification physicochemical surface properties, both POx seemed to have a lower impact. Overall, these new data on amphiphilic POx and their nanoformulations confirmed their interesting capacity for topical delivery.

III.5 Supplementary information

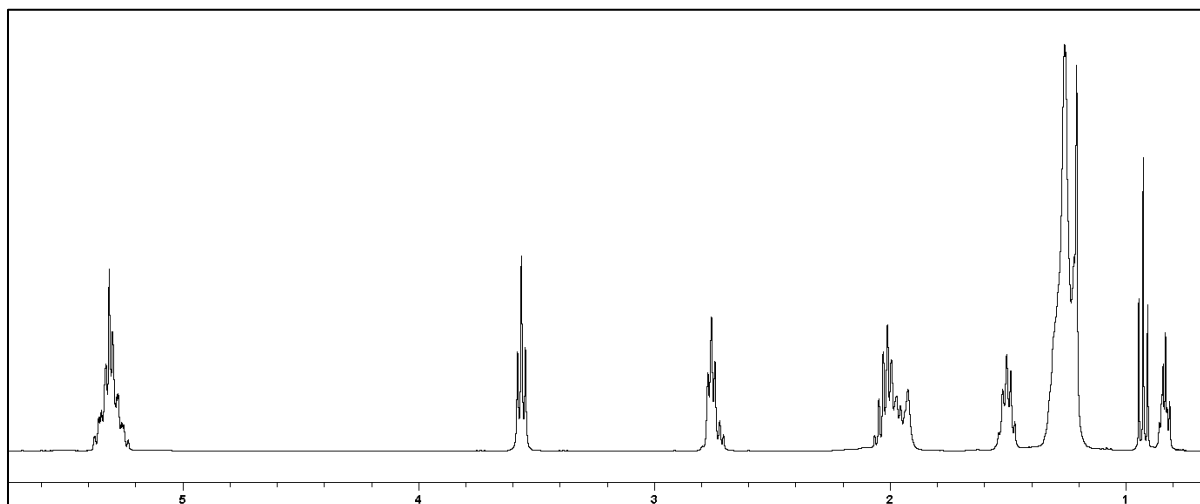


Figure SI 1: RMN ^1H (CDCl_3) spectra of fatty alcohol ($\text{C}_{18:2}\text{OH}$)

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (3H, CH_3), 1,2 (14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,5 (4H, HOCH_2CH_2), 2,0 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,5 (2H, HOCH_2), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

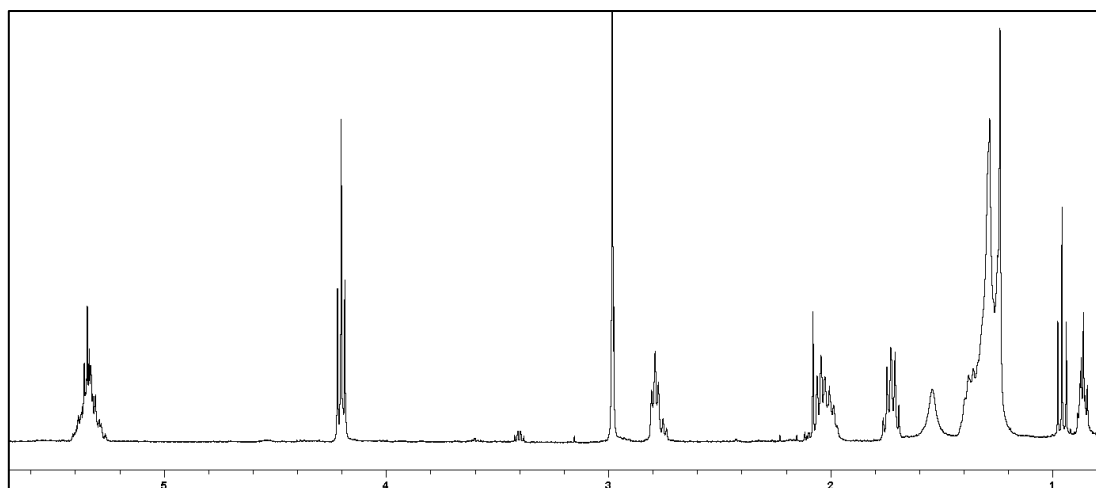


Figure SI 2: RMN ^1H (CDCl_3) spectra of mesylate ($\text{C}_{18:2}\text{OMs}$)

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (3H, CH_3), 1,2 (14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,5 (4H, HOCH_2CH_2), 2,0 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,0 (3H, O_3SCH_3), 4,2 (2H, sMOCH_2), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

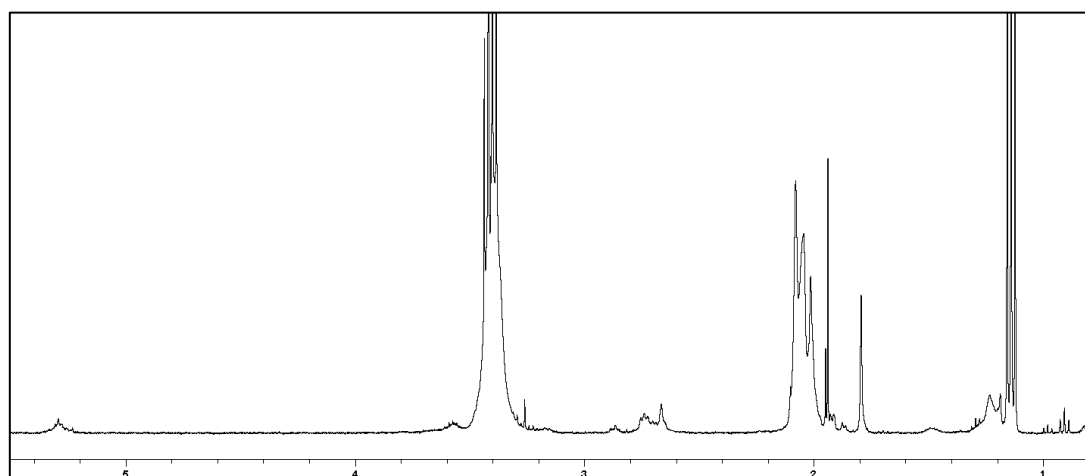


Figure SI 3: RMN ^1H (CDCl_3) spectra of POx ($\text{C}_{18:2}\text{POx}_{15}$)

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,9 (3H, CH_3), 1,0-1,2 (24H, CH_2), 2,1 (45H, $\text{CH}_3 \text{POx}$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,4 (62H, $\text{CH}_2 \text{POx}$), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Conclusion du chapitre

Au cours de ce chapitre, nous avons étudié les interactions physico-chimiques de surface entre les POx seuls ou formulés et un modèle non biologique mimant les propriétés de surface de la peau. Concernant les POx seuls, nous avons démontré leur capacité à interagir avec la surface et modifier les propriétés de surface pour favoriser l'étalement et l'affinité avec des molécules hydrophiles. Nous avons ainsi déterminé que l'interaction avec la peau est favorisée avec les POx de faible masse molaire (DP_n faible) et à faible concentration (0,5 g/L). Toutefois, on note peu de différence entre les deux chaînes alkyle étudiées : $C_{16}POx_n$ et $C_{18.2}POx_n$. Par contre, une fois formulés, la cinétique d'interaction est plus rapide avec les POx linéaires saturés qu'insaturés. Cette différence peut s'expliquer par une plus grande flexibilité de chaîne ou d'interaction avec les excipients composant les formulations. En s'affranchissant de l'effet de cinétique par l'étalement manuel des formulations, les nanoformulations MM et LNC ont montré *in fine* la même capacité à former un film résiduel sur la surface cutanée à caractère plus monopolaire basique que le NBSM, pouvant conduire potentiellement à un meilleur étalement, voire une meilleure pénétration. Ainsi, en formulation comme en solution dans l'eau, l'affinité des POx pour la surface est maintenue.

Nous allons maintenant étudier la capacité de pénétration sur divers modèles des POx seuls et des formulations.

Références

1. Elkhyat, A., et al., *Influence of the Sebum and the Hydrolipidic Layer in Skin Wettability and Friction*, in *Agache's Measuring the Skin*, P. Humbert, et al., Editors. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 1-12.
2. Fowkes, F.M., *Donor-Acceptor Interactions at Interfaces*. *The Journal of Adhesion*, 1972. 4(2): p. 155-159.
3. Eudier, F., et al., *Skin surface physico-chemistry: Characteristics, methods of measurement, influencing factors and future developments*. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2019. 264: p. 11-27.
4. Van Oss, C.J., M.K. Chaudhury, and R.J. Good, *Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems*. *Chemical Reviews*, 1988. 88(6): p. 927-941.
5. Van Oss, C.J., R.J. Good, and M.K. Chaudhury, *Additive and nonadditive surface tension components and the interpretation of contact angles*. *Langmuir*, 1988. 4(4): p. 884-891.
6. *Wetting and Wetting Agents, Hydrophobization and Hydrophobizing Agents*, in *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. p. 389-402.
7. Mavon, A., et al., *Sebum and stratum corneum lipids increase human skin surface free energy as determined from contact angle measurements: A study on two anatomical sites*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1997. 8(3): p. 147-155.
8. Mavon, A., et al., *Changes in sebum levels and skin surface free energy components following skin surface washing*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1998. 10(5): p. 243-250.
9. Eudier, F., et al., *Design of a Lipid-Coated Polymeric Material Mimic Human Skin Surface Properties: a Performing Tool to Evaluate Skin Interaction with Topical Products*. *Langmuir*, 2020. 36(17): p. 4582-4591.
10. Viegas, T.X., et al., *Polyoxazoline: Chemistry, Properties, and Applications in Drug Delivery*. *Bioconjugate Chemistry*, 2011. 22(5): p. 976-986.
11. Nicolai, T., O. Colombani, and C. Chassenieux, *Dynamic polymeric micelles versus frozen nanoparticles formed by block copolymers*. *Soft Matter*, 2010. 6(14): p. 3111-3118.
12. Savary, G., M. Grisel, and C. Picard, *Impact of emollients on the spreading properties of cosmetic products: A combined sensory and instrumental characterization*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2013. 102: p. 371-378.
13. Zdziennicka, A., et al., *Components and parameters of solid/surfactant layer surface tension*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2017. 522: p. 461-469.
14. Zdziennicka, A., et al., *Macroscopic and Microscopic Properties of Some Surfactants and Biosurfactants*. *International journal of molecular sciences*, 2018. 19(7): p. 1934.
15. van Smeden, J., et al., *The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014. 1841(3): p. 295-313.
16. Krutmann, J., et al., *The skin aging exposome*. *Journal of Dermatological Science*, 2017. 85(3): p. 152-161.
17. Baudouin, C., et al., *Environmental pollutants and skin cancer*. *Cell Biology and Toxicology*, 2002. 18(5): p. 341-348.
18. Lorson, T., et al., *Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update*. *Biomaterials*, 2018. 178: p. 204-280.
19. Simon, L., et al., *Recent Advances and Prospects in NanoDrug Delivery Systems using Lipopolyoxazolines*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020: p. 119536.
20. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019. 570: p. 118516.
21. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based lipid nanocapsules for topical delivery of antioxidants*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020. 579: p. 119126.
22. Mouzouvi, C.R.A., et al., *Surface active properties of lipid nanocapsules*. *PLOS ONE*, 2017. 12(8): p. e0179211.

Chapitre 5 : Evaluation de la pénétration des POx seuls et formulés

Suite à la synthèse de différentes architectures POx (Chapitre 2), nous avons développé principalement deux nanoformulations : des micelles mixtes et des nanocapsules lipidiques (Chapitre 3) dont nous allons maintenant **étudier leur capacité d'insertion et de pénétration cutanée**. Pour cela, nous avons adopté une **démarche de recherche graduelle** en utilisant différents modèles de peau. Nous avons travaillé tout d'abord avec des membranes lipidiques simples : vésicules lipidiques géantes (GUV), puis plus complexes avec des cellules humaines de la peau, ensuite *in vivo* sur oreille de souris et enfin sur explants de peau humaine (Figure 57).

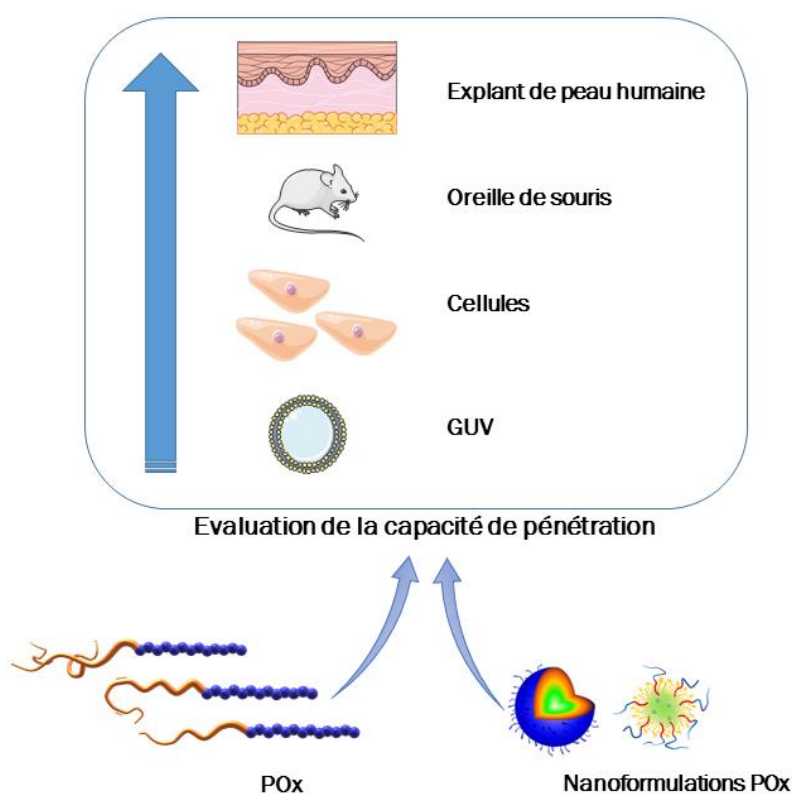


Figure 57 : Etude graduelle de la capacité de pénétration des POx et des nanoformulations POx

Cette stratégie nous a permis d'identifier les molécules de POx les plus efficaces pour réaliser l'étude sur les explants de peau. Le greffage d'une sonde fluorescente sur les POx nous a permis de suivre l'insertion des systèmes dans les membranes lipidiques et la peau. Il est à noter que le POx ramifié ($C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$) n'a pu être évalué que sur peau humaine (liée à la situation sanitaire du COVID-19).

Les études sur GUV, cellules de peau et oreilles de souris ont pu être menées grâce à la collaboration avec l'équipe du Dr Marie Pierre Rols (Institut de Pharmacologie et Biologie Structurale, Toulouse) et plus particulièrement le Dr Muriel Golzio. Cette étude s'inscrit dans un contexte pharmaceutique et non cosmétique car il est interdit d'effectuer des tests de produits à visée cosmétique sur les animaux. L'étude histologique sur explants de peau humaine a également pu être conduite grâce à la

collaboration avec Mme Chantal Ripoll de l'Institut des Neurosciences de Montpellier (INM) dans le cadre d'un projet soutenu par la SATT AxLR.

A notre connaissance, l'évaluation des capacités d'insertion et de pénétration des polymères et plus particulièrement des POx n'a jamais été réalisée rendant peu aisée la discussion des résultats en comparaison avec ceux de la littérature. Nous avons donc essayé d'émettre des hypothèses pour expliquer les phénomènes observés.

Ce chapitre s'articulera en deux parties. La première, sous forme d'une publication, présente l'étude d'insertion des POx dans les membranes lipidiques, en allant des modèles les plus simples à des plus complexes puis la pénétration sur oreille de souris. La seconde partie expose les résultats de l'étude préliminaire de pénétration sur explants de peau humaine.

I. Evaluation de la pénétration de modèle simple à étude *in vivo*

Au cours de cette étude, nous allons comparer la capacité d'insertion de deux POx de chaîne alkyle différente : C₁₆POx₁₅ et C_{18:2}POx₁₅ dans les membranes de GUV et de cellules humaines puis évaluer leur pénétration *in vivo* sur oreille de souris. La délivrance topique de la quercétine chargée dans les nanocapsules lipidiques élaborées avec les deux POx a également été déterminée *in vivo*. Ce travail est présenté sous la forme d'un article scientifique. Des expériences complémentaires annulées à cause de la crise sanitaire liée au COVID-19 devront être menées avant soumission à publication.

Evaluation of the polyoxazolines insertion in the epidermis: from a simple GUV model to *in vivo* study

L. Simon¹, E. Bellard², B. Jouanmiquéou², V. Lapinte¹, N. Marcotte¹, J.M. Devoisselle¹, M.P. Rols², M. Golzio², S. Bégu^{1*}

1: ICGM, Montpellier University, CNRS, ENSCM, Montpellier, France

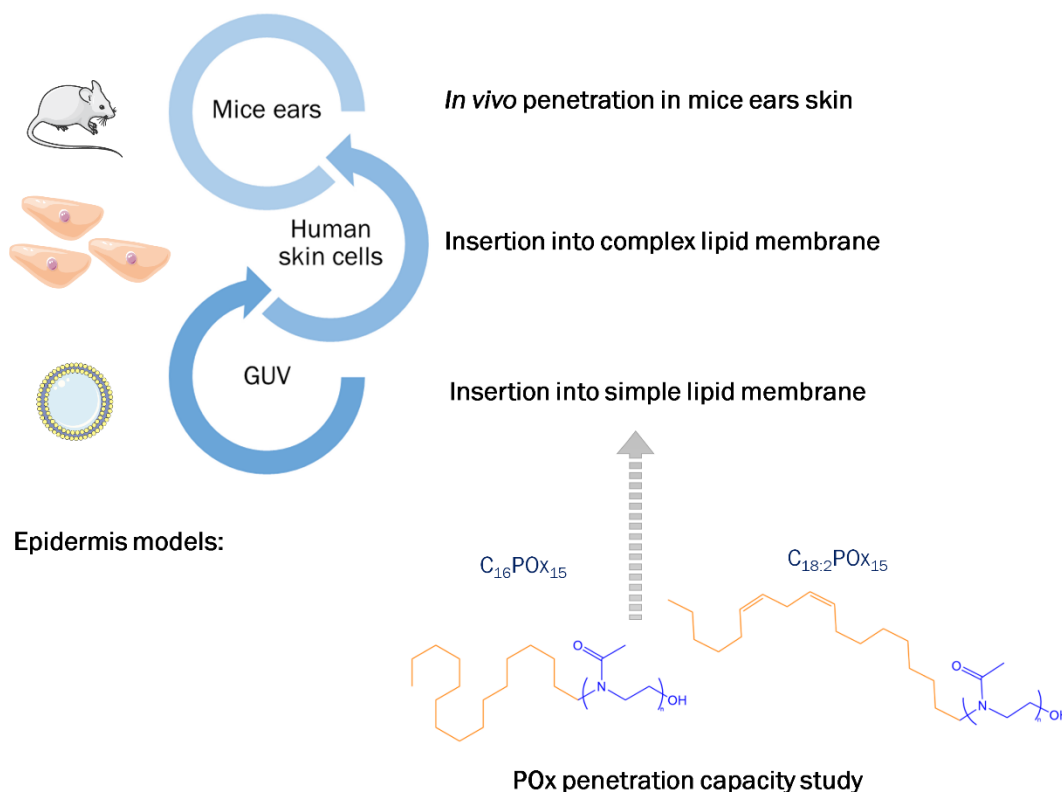
2: CNRS UMR 5089, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

Abstract

Crossing the skin barrier to reach an efficient topical delivery is quite challenging. Therefore, efforts are made to design new molecules and nanoformulations to take up the challenge. The present work aims at evaluating the potential of amphiphilic polyoxazolines (POx) to interact with skin and enter the viable epidermis. We first tested the capacity of POx to insert into simple lipid bilayer like giant unilamellar vesicles. Then, we evaluated *in vivo* penetration using more complex membranes on human skin cells and mice ears. On the hydrophilic POx block, saturated lipid alkyl chain (C₁₆POx₁₅) and unsaturated lipid alkyl chain (C_{18:2}POx₁₅) were investigated to distinctive lipid membrane insertion behavior but overall both successfully penetrate mice skin by overcoming the *stratum corneum* barrier. Both POx penetration in mice skin was also analyzed once formulated in lipid nanocapsules loaded with antioxidant. We showed that POx formulations were able to deliver the loaded antioxidant in the epidermis proving their efficacy for topical delivery of active molecule.

Key words: Polyoxazolines, skin penetration, lipid membrane insertion, GUV, human cells, mice ears

Graphical abstract



I.1 Introduction

With its unique structure and composition, the human skin envelope acts as a barrier to preserve and protect the organs from environmental aggressions such as UV radiation, pollution, tobacco. The epidermis and more especially its non-viable part, the *stratum corneum* (SC), is the main barrier against the external assaults. More especially, the dead corneocytes filled with keratin and embedded in a lipid matrix made of free fatty acids, ceramides and cholesterol insure stiffness and permeability [1], [2]. However, overtime these environmental sources led to an excess production of reactive oxygen species (ROS) in the human skin inducing premature skin aging [3] and potentially skin cancer [4]. To prevent these effects from happening, active molecules such as antioxidant can be topically delivered to quench the excess of ROS. To take up the challenge of crossing skin barrier, nanosized formulations such as nanoparticles, polymeric nanocarriers and lipid nanocarriers are used due to their physicochemical properties [5]. With their composition close to skin lipid matrix, lipid based nanoformulations present advantages over the others such as being less cytotoxic and irritating, enhancing hydrophobic drug loading [6] and interacting with the SC by occlusion, lipid fusion or adhesion [7]. The most common lipid based nanoformulations for topical delivery are liposomes, nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles and lipid nanocapsules (LNC) [8]. The LNC are the latest lipid based nanoformulations developed [9] which are composed of an oily core surrounded by a phospholipids rigid capsule and polymer corona. They are known to have a high hydrophobic drug loading, high stability overtime and excellent skin tolerability for dermal application [7]. In addition, chemical penetration enhancers (CPE) such as alcohols, urea or surfactants can be incorporated into nanoformulations to further enhance their penetration capacity [10]. In order to screen the penetration capacity of a new molecule or nanoformulation and avoid wasting animals or human skin, simple models mimicking the skin barrier were investigated. For example, simple phospholipid bilayer

can be used to first evaluate the molecule insertion such as in supported membrane [11] or in liposomes composed of phosphatidylcholine [12] and more rigid one such as the stratum corneum lipid liposomes reproducing the lipids composition of the SC with cholesterol and ceramides [13]. In our study, the penetration potential of amphiphilic polymers belonging to the polyoxazolines family was assessed. With their pseudopeptidic structure, they are known for their excellent biocompatible properties as recently reported by Lorson et al. [14] but have never been used for topical delivery. Polyoxazolines also called POx, can be easily tuned during the synthesis with different sites of functionalities (terminal groups or pendent chain coming from the monomer) [15]. Therefore, it is possible to create amphiphilic POx, called lipopolyoxazolines, with lipid or lipid like alkyl chain as hydrophobic part and POx repetition units as hydrophilic part [16]. For this work, we synthesized two amphiphilic polyoxazolines with a saturated lipid alkyl chain, C₁₆POx₁₅, or with an unsaturated lipid chain: C_{18:2}POx₁₅ maintaining the same POx size. To ease the comprehension, we will call these two polymers POx. Based on these amphiphilic POx, we previously designed two lipid based nanoformulations : mixed micelles [17] and lipid nanocapsules [18] for topical delivery of the quercetin antioxidant. The present study aims at evaluating the topical delivery efficacy of POx based lipid nanocapsules loaded with quercetin to the epidermis. To conduct our penetration evaluation, we first tested the two POx in solution on simple lipid membranes using giant unilamellar vesicles (GUV), then on more complex membranes with human skin cells: fibroblasts, keratinocytes and melanocytes and finally on mice skin in an *in vivo* study. For this very last study, the POx based LNC loaded with quercetin were also investigated to assess the topical delivery to the epidermis.

I.2 Materials and Methods

I.2.1 Amphiphilic POx synthesis: C₁₆POx₁₅ and C_{18:2}POx₁₅

2-Methyl-2-oxazoline (MOx, Sigma Aldrich, 99.0%) was dried over CaH₂, distilled at reduced pressure and stored under nitrogen atmosphere. Iodohexadecane (95.0 %), potassium hydroxide (KOH), lithium aluminum hydride (LiAlH₄, 95 %), trimethylamine (98 %), methanesulfonyl chloride (99.7 %), ammonia solution in methanol (7 N), acetonitrile, diethyl ether, anhydrous tetrahydrofuran (99 %), methanol, *N,N*-dimethylformamide anhydrous (99.8 %), acetone were bought from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, Germany). Linseed oil was brought from Bioplanète (France).

Both polyoxazolines (POx) syntheses were based on cationic ring-opening polymerization of MOx performed under nitrogen atmosphere.

The polymerization of C₁₆POx_n was initiated with the commercialized iodohexadecane. Regarding C_{18:2}POx_n, the initiator of the polymerization was produced from the linseed oil in two steps. First the linseed oil (4 g, 4.55 mmol) was reduced by lithium aluminum hydride (9 eq, 41 mmol) under nitrogen atmosphere in dry tetrahydrofuran for 8 h. The organic phase was then solubilized in dichloromethane and washed with a solution of sodium chloride saturated. The corresponding fatty alcohol (NMR spectra Figure SI 1) was obtained with a yield of 98 %. Then, methanesulfonyl chloride (1.5 eq, 22.5 mmol) and trimethylamine (1.5 eq, 22.5 mmol) were added to the fatty alcohol in dry diethyl ether for 8 h. After washing with water and dried on MgSO₄, the initiator of the polymerization (C_{18:2}OMs) was synthesized (NMR spectra Figure SI 2) with a yield of 93 %.

C₁₆POx_n was synthesized after dissolving iodohexadecane (3.564 g, 10.1 mmol) and MOx (15 eq, 151.7 mmol) in dry acetonitrile (0.5 M). After strong agitation at 80 °C for 8 h, the solution was quenched

with potassium hydroxide dissolved in methanol (5 eq, 50.5 mmol, 5M). The mixture was left under magnetic stirring at 40 °C for 8 h. The C₁₆POX₁₅ was obtained after precipitation dropwised in cold diethyl ether and filtration [17]. C₁₆POX₁₅ had a molar mass of 1500 g/mol and a critical aggregation concentration of respectively 150 mg/L. C_{18:2}POX₁₅ synthesis occurred in the same conditions with the initiator (C_{18:2}OMs) (2.5 g, 7.8 mmol) left to react with MOx (15 eq, 117 mmol) in dry acetonitrile (0.5 M). The polymerization and purification conditions remained the same as C₁₆POX₁₅. C_{18:2}POX₁₅ (NMR spectra Figure SI 3) had a molar mass of 1500 g/mol and a critical aggregation concentration of respectively 100 mg/L.

Alexa fluorescent probe grafting

For labelling, Alexa 546 NHS ester (maximum excitation/emission: 554/570 nm) used was brought from ThermoFischer Scientific (USA). To graft it, the amine-reactive crosslinker chemistry was performed based on the reactivity between a primary amine (-NH₂) and NHS ester group. Therefore, both POx were produced as described above but the polymerization was quenched by ammonia solution in methanol 7N (10 eq, 8 mmol) to obtain the primary amine group. The fluorescent probe was added to POx with a molar ratio of 1:50. The POx and Alexa were solubilized in a mixture of sodium bicarbonate buffer (0.1 M, pH 8.2) and DMF (amine free) in a volume ratio 9:1 and left under magnetic stirring for 8 hours. The solution was then lyophilized, solubilized in DMF, precipitated in cold diethyl ether and filtered.

I.2.2 Formulation of quercetin loaded lipid nanocapsules (Q-LNC)

Lipophilic Labrafac[®] (caprylic acid triglycerides) was brought from Gattefossé (Saint-Priest, France) and Lipoid S75[®] (fatfree soybean phospholipids with 70% phosphatidylcholine) was kindly provided by Lipoid (Ludwigshafen, Germany). Quercetin (95% HPLC) was purchased from Sigma Aldrich (Germany). Sodium chloride (NaCl) was bought from VWR. MilliQ water was obtained from Milli-Q Gradient A10 (Merck Millipore, Germany) apparatus.

The lipid nanocapsules (LNC) were composed of POx (200 mg) with a final concentration of POx grafted with of 0.5 g/L Alexa, caprylic acid triglycerides oil (Labrafac[®]) (150 mg) and water (650 mg) and additional phospholipids (Lipoid[®] S75) (15 mg) and NaCl (30 mg). The mixture was heated at 85 °C and cooled down to 30 °C three times and sonicated for 4 min at 30 % amplitude with a sonication probe (Branson Ultrasonics Corporation, USA). Quercetin was then added as a powder to the mixture. The solution was heated and cooled down again and 2.5 mL of cold water was added under magnetic stirring. The resulting Q-LNC size was about 30 nm and a PDI of 0.16 [18]. The same process was applied for both POx C₁₆POX₁₅ and C_{18:2}POX₁₅.

I.2.3 Giant unilamellar vesicles experiments

Giant unilamellar vesicles (GUV) formation

GUV were prepared by electroformation using the Vesicle Prep Pro[®] (Nanion Technologies) and following the previously described protocol [19]. Phospholipids DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) and NBD-PE (N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (maximum excitation/emission: 463/536 nm) were bought from Avanti[®] Polar Lipids. Both were diluted in chloroform, at a concentration of 0.5 mg/mL for DOPC and 0.05 mg/mL for NBD, as solution stocks. GUVs were formed from DOPC lipids (99%) and the fluorescent NBD-PE

lipid (1%). This preparation and the following steps can be performed at room temperature because the gel-phase/liquid-phase transition temperature of the lipids used is much lower.

The electroformation chamber was made of two glass slides covered with Indium Tin Oxide to ensure the electrical conductivity of the surface. The two slides were separated by an adhesive silicone joint of 1 mm width. 15 μ L of lipid solution were deposited on the conducting sides of the glass slides. The deposition was carried out slowly, at constant rate, at room temperature to evaporate the chloroform and then the slides were dried under vacuum for a couple of hours to entirely remove the remaining solvent molecules. Finally, the slides were sealed together and the chamber was filled with 300 μ L of formation medium being an aqueous solution with 240 mM sucrose.

We applied a sinusoidal voltage of 25 mV peak to peak at 8 Hz. The voltage is increased by 100 mV steps every 5 min, up to a value of 1225 mV. It is maintained under these conditions for 960 minutes. Next, we apply a square wave of same amplitude at 4 Hz for 1 h to detach the GUV from the slides.

Giant unilamellar vesicles (GUV) observation

The GUV were then diluted in a glucose solution at 260 mM and deposited on a sealed glass slide with a coverslip on top. The POx grafted with the Alexa fluorescent probe were solubilized in water and added to the diluted GUV at a final concentration of 50 or 100 mg/L. Phase contrast and fluorescence micrographs were acquired using a wide-field fluorescence DMIRB Leica microscope coupled to a Photometrics Cool SNAP HQ2 camera (Roper Scientific, Tucson, USA). GFP filters (λ_{exc} 480/40 nm, λ_{em} 527/30 nm) and mCherry (MCH) (λ_{exc} 560/40 nm, λ_{em} 630/75 nm) were used to observe the GUV, to respectively see the NBD-PE of the GUV and the POx-Alexa 546. The time acquisition of the camera was set at 500 mS for GFP filter and 100 mS for the MCH and binning camera set to 1. Image acquisition parameters were defined based on controlled pictures (with GUV only) to avoid GUV autofluorescence with the MCH channel. To observe POx insertion, the magnification 100 was employed whereas for the population and size evolution the magnification 40 was preferred.

To measure the population and size evolution upon POx addition, 5 pictures were taken for each condition 30 minutes after deposition of GUV solution to ensure the sedimentation of GUV on the coverslip. The calculation of size and number was performed with ImageJ software.

1.2.4 Cell culture

Human keratinocytes (HaCaT) and human melanocytes (A375) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA). Primary normal human dermal fibroblasts provided from a skin biopsy by Icelltis (Toulouse, France) were isolated as previously described [20], [21]. Cells were cultivated in the DMEM culture medium (Gibco, Invitrogen, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Gibco, Invitrogen, France) and 100 μ g/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Both cell types were tested negative for mycoplasma using MycoAlert mycoplasma detection kit (Lonza #LT07-318, USA).

1.2.5 Cell viability

HaCaT cells were seeded at 50 000 cells/cm² in a 96 well plate and incubated for 24h at 37 °C, 5% CO₂ to allow cell adhesion. C₁₆POX₁₅ and C_{18:2}POX₁₅ were solubilized in DMEM supplemented medium and filtered through 0.2 μ m (no mass was lost through filtration). Cells were treated or not (control) with both POx solutions at a concentration range from 0.01 to 20 g/L. After 24 h of exposure, a CellTiter 96[®] Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, USA), was used to evaluate the cell

viability following the manufacturer's instructions. The absorbance was then recorded at 490 nm using Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA) and the background corresponding to wells free of cells (mean of 3) was subtracted from each triplicate mean. Values of treated cells were normalized to non-treated cells (representing the 100% cell viability).

1.2.6 Cell interaction experiments

The cells were seeded at 10 000 cells/cm² in a 8 well plate (LabTrek) and incubated for 24 h at 37 °C, 5 % CO₂ to allow cells adhesion. For the observation, the culture media was replaced by phosphate buffered saline (PBS) with Mg²⁺ and Ca²⁺ (Gibco, Invitrogen, France). The grafted POx was solubilized in water and added to the cells for a final concentration of 100 mg/L. After a few minutes, the POx media was rinsed and replaced by fresh PBS for direct observation or incubated in culture medium for 12 hours before observation. Micrographs were acquired using the same set-up as for the GUV experiments. Image acquisition parameters were defined based on controlled pictures (without fluorescent probe) to avoid cells autofluorescence with the MCH channel.

1.2.7 Animal experiments

C57Bl/6-CD11c-GFP-DTR mice (a generous gift of Dr B. Malissen, CIML, Marseille, France) were bred in IPBS animal facility. All experiments involving animals were performed in compliance with relevant laws and institutional guidelines. All the procedures were performed under gas anesthesia (2% Vetflurane®). The skin from the external face of mice ears was depilated using a depilatory cream (Veet®) the day prior treatment. 20 µL of grafted POx solution in water at 500 mg/L or Q-LNC with POx grafted were deposited on a paper filter (Finn chamber of 8 mm, Smart Practice, USA) then inserted into a Finn chamber on Scanpor (50x5 8mm, Stallergenes, France). The chamber was placed on the external face of the mice ears and left untouched for 24 hours until imaging. For imaging session, the chamber was gently removed and the skin was rinsed 3 times with PBS and dried with a Q-tip. The mice was then installed on a customized stage and ear external face immobilized with a coverslip with Echogel (Unigel, ASEPT, Medical Hygiene, La Seyne sur Mer, France) in between. The observation was performed with a 7MP upright multiphoton microscope (Carl Zeiss S.A.S., Jena, Germany) equipped with a 20x objective and coupled to a pulsed laser, Chameleon Ultrall (Coherent Inc) tuned to 820 nm. Signals from Alexa 546, collagen (second harmonic generation), skin autofluorescence and quercetin were detected on non-descanned detectors through 565-610 nm, 390-410 nm, 435-485 nm and 500-550 nm bandpass filters, respectively. For each mouse, 5 images stacks of sections (425*425 µm) at a resolution of 0.42*0.42 µm and with z-spacing of 2 µm were acquired using same parameters. Complementary observations were performed with the wide field fluorescence microscope (Macrofluor, Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France). For the spreading on mice ear the following features were set up on wide field microscope: magnification x 0.8, exposure time GFP 2000 ms and RFP 1000 ms. The experiment was repeated three times to ensure a good repeatability of the results. Mice with water application only were added as control to evaluate the auto fluorescence of the skin. The same microscope parameters were reused for each observation to ensure the same experimental conditions and thus an appropriate comparison between each experiment.

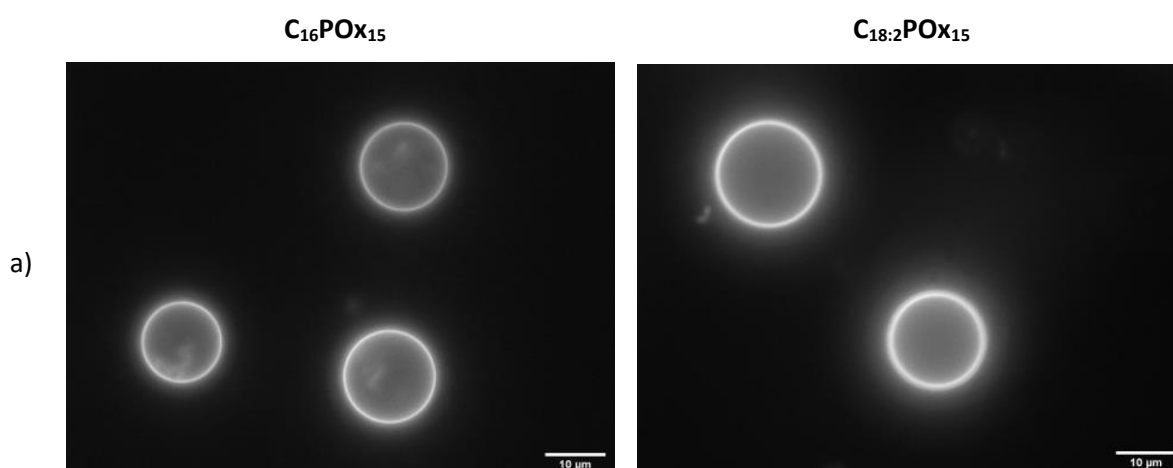
I.2.8 Histology study on mice ears

The mice ears were cut and placed in a solution of PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde) for 4 hours under agitation and then rinsed 3 times with buffer and placed in a solution of sucrose at 30 %. The ears were frozen using the cryopreservation in OCT technique and staining at -80°C . Slice of $10\ \mu\text{m}$ were made by cryostat and the nucleus were labelled using DAPI (mounting medium with DAPI; abcam104139). The skin blades were observed with microscope Axiomager M2 (Zeiss, Germany) at a magnification of 40, fluorescence intensity of 58 % and the 3 channels: 465 nm for DAPI probe at the exposure time 40 mS, 572 nm for Alexa probe at 300 mS and 509 nm for quercetin molecule at 300 mS. The controlled mice with water applied were also added to the histology study for auto fluorescence verification.

I.3 Results and discussion

I.3.1 Study of the interaction with phospholipid membrane on GUV model

First, the insertion was visually investigated on giant unilamellar vesicles (GUV) of phosphatidylcholine with POx solubilized in water and added to the GUV solution. The GUV were marked with the NBD fluorescent probe and for POx, the fluorescent Alexa 546 probe was grafted at the end of the POx chain. The GUV size was polydisperse from 1 to $20\ \mu\text{m}$ and the insertion was observed on the biggest vesicles. Both $\text{C}_{16}\text{POx}_{15}$ and $\text{C}_{18:2}\text{POx}_{15}$ were evaluated at 0.05 g/L under their critical aggregation concentration and the insertion capacity of the two alkyl chains was compared. The observation was conducted immediately after POx addition looking at the GUV (GFP filter) (Figure 1 a) and the grafted POx (filter MCH) (Figure 1 b). All GUV membranes were well shaped and uniform. $\text{C}_{16}\text{POx}_{15}$ co-localized within the GUV membrane and $\text{C}_{18:2}\text{POx}_{15}$ remained in the media around the GUV but did not insert in the membrane. As a conclusion, using a simple phospholipid bilayer as a model, $\text{C}_{16}\text{POx}_{15}$ and $\text{C}_{18:2}\text{POx}_{15}$ behave differently due to a variation of affinity in between their alkyl chain and the GUV membrane. The same result was obtained after 24 hours of incubation confirming that the absence of affinity of $\text{C}_{18:2}\text{POx}_{15}$ was not due to kinetics effect.



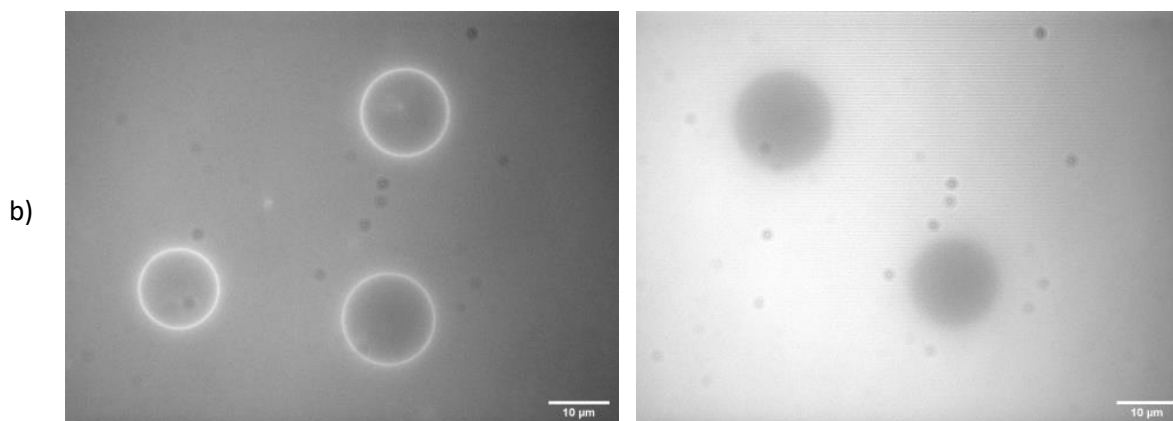


Figure 1: Fluorescence images of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ POx insertion in the biggest GUV bilayer a) GFP filter b) MCH filter (x100)

The effect of POx addition on the population of GUVs regarding their size was also evaluated and compared to GUV without POx (control) (Figure 2). With $C_{16}POx_{15}$ addition, the size of GUV was modified compared to control. At a $C_{16}POx_{15}$ concentration of 0.05 g/L, 50 % of the measured GUV had a sized of 1-2 μm and the other 50 % from 2 to 15 μm and at 0.1 g/L all the GUV were measured at 1-2 μm . This modification of GUV size upon $C_{16}POx_{15}$ concentration clearly indicated a reorganization to form monodisperse vesicles. On the contrary, with $C_{18:2}POx_{15}$ at both concentrations (0.05 and 0.1 g/L), the size of GUV was not modified confirming the lack of affinity and interaction in between $C_{18:2}POx_{15}$ and the GUV. The GUV reorganization phenomenon noticed with $C_{16}POx_{15}$ was also observed with other polymer such as poly(acrylic acid) [22] and poly(ethylene glycol) [23] where polymer induced a transition to smaller vesicles.

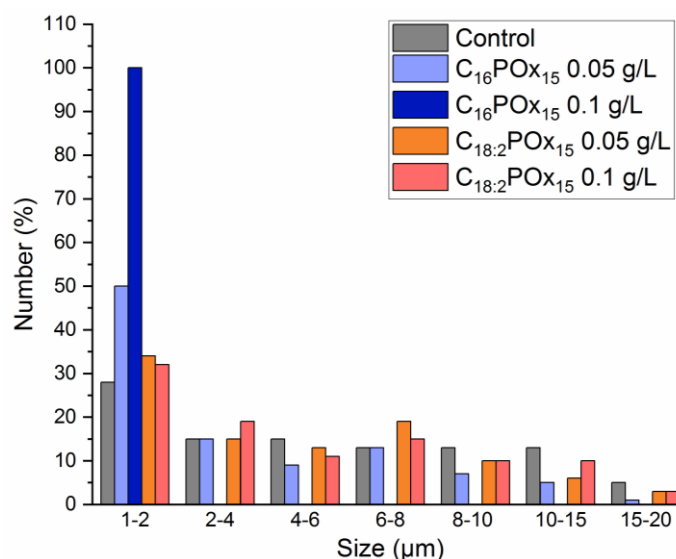


Figure 2: Evolution of the GUV size population function of POx nature and concentration

$C_{16}POx_{15}$ was proved to have a capacity to insert in simple phospholipid bilayer which was not the case of $C_{18:2}POx_{15}$. This result was due to the difference of alkyl chain where the linear saturated one had the affinity for the GUV membrane whereas the linear unsaturated one had not.

I.3.2 Study of the interaction with human cells

First, the cell viability of both POx was investigated on human keratinocyte cells (HaCaT) to determine the concentration at which POx should be added to cells for the insertion observation without inducing cells death. As shown in Figure 3, $C_{16}POx_{15}$ impacts the cell viability from 50 mg/L whereas $C_{18:2}POx_{15}$ had no effect until 200 mg/L. The calculated IC_{50} value reflected the difference induced by the alkyl chain with a value of 130 mg/L for $C_{16}POx_{15}$ and a value of 770 mg/L for $C_{18:2}POx_{15}$ which is 6 times higher. As $C_{16}POx_{15}$ had a higher impact on cell viability than $C_{18:2}POx_{15}$, it revealed a higher tendency of $C_{16}POx_{15}$ to interact and disturb the cell leading to its death. The concentration of both POx to observe the cell penetration was selected at 100 mg/L since the cell viability is high enough to avoid cell death.

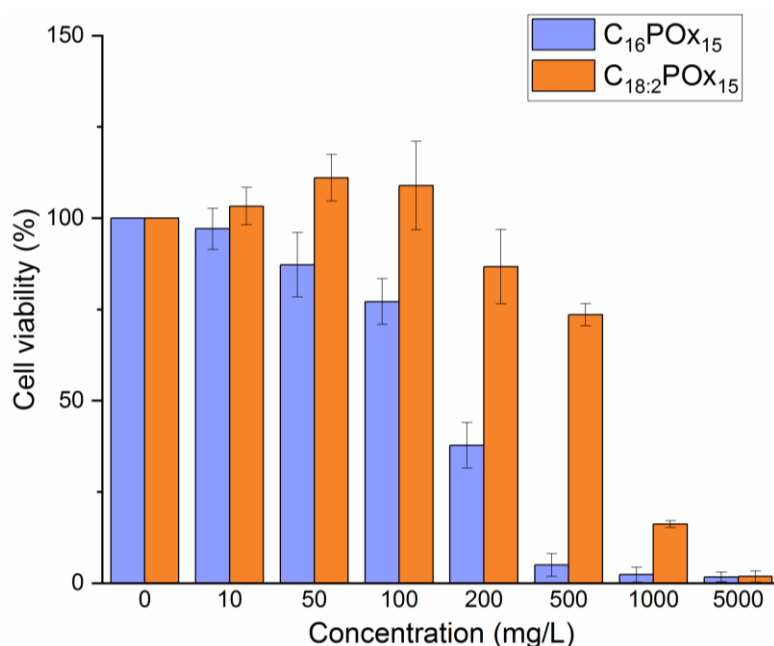


Figure 3: Cell viability of human keratinocytes HaCaT co-incubated with increasing concentration of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ for 24 hours ($n=3$)

Both POx were then tested on human cells to evaluate their insertion within a more complex phospholipid membrane also composed of cholesterol and proteins. In order to evaluate the potential insertion dependency of POx on a skin cells type, we investigated the direct interaction on human fibroblasts, keratinocytes and melanocytes. Figure 4 showed the results (with MCH filter) with $C_{16}POx_{15}$ (left) and $C_{18:2}POx_{15}$ (right) grafted with the fluorescent probe Alexa on fibroblasts (on top), keratinocytes (middle) and melanocytes (bottom). For all three cell types, $C_{16}POx_{15}$ brightly localized within the cell membrane immediately after the addition. The cells membrane became fluorescent with a well-shaped labelling and homogeneously distributed in all cells type, except in fibroblasts where some aggregates are observed. Thus, $C_{16}POx_{15}$ was able of inserting within cell membranes whatever the human skin cell types. On the contrary, $C_{18:2}POx_{15}$ diffused in the media around the cells but did not localized within the cell membrane. Some aggregates were also observed. Thus, as observed with the GUV made of phospholipid bilayer, only the linear saturated alkyl chain was able to interact with the cell membrane.

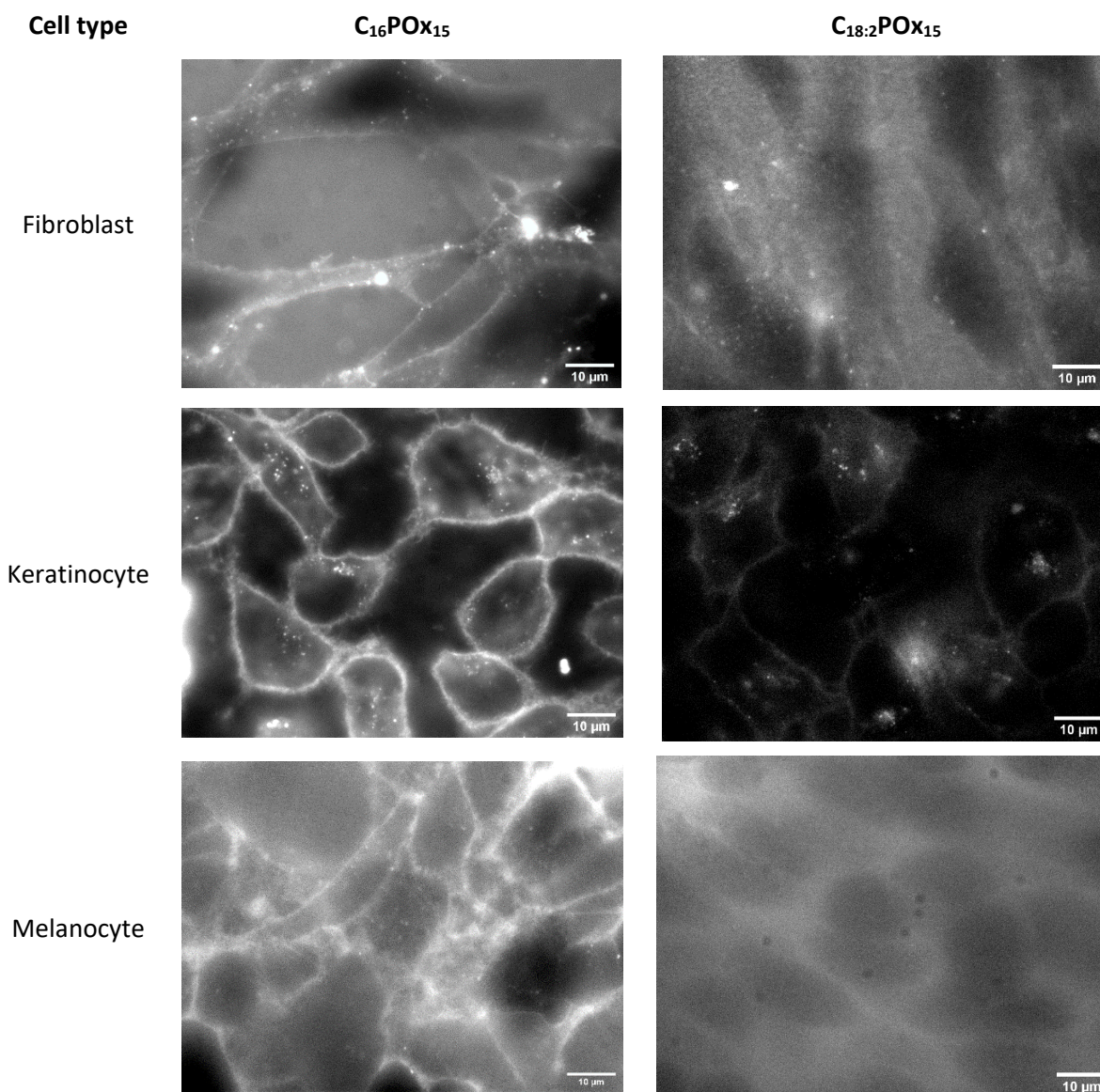


Figure 4: Evaluation of the direct insertion of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ within human cells (x100)

The same experiment was conducted on fibroblasts after 12 hours of incubation (Figure 5). The fluorescence signals of both POx were localized within the cells around the nucleus and in intracellular vesicular compartments (either endosomes, lysosomes or mitochondria). No particular insertion of both POx in the cell membrane was observed. The exact same fluorescence pattern was obtained for $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ and this might be due to the endocytosis pathway that both POx used to enter the cells. However, $C_{16}POx_{15}$ might have also used another pathway. Indeed, the continuous cell membrane recycling allowed POx to reach the vesicular compartment due to its interaction with the cell membrane. Regarding $C_{18:2}POx_{15}$ only the endocytosis pathway should have occurred. This theory was confirmed by the literature on amphiphilic POx. Indeed, Luxenhorfer et al. previously described that amphiphilic POx even with different architectures were able to enter cells by endocytosis and enrich the vesicular compartment. They showed that a little portion was found to interact with membrane. According to their work, amphiphilic POx cellular uptake was dependent on POx structure [24]. Moreover in another study, Kempe et al, demonstrated that an efficient cellular uptake of POx

material was reached on mice fibroblasts using the endocytosis pathway and distributed uniformly in cell cytosol around the nucleus [25].

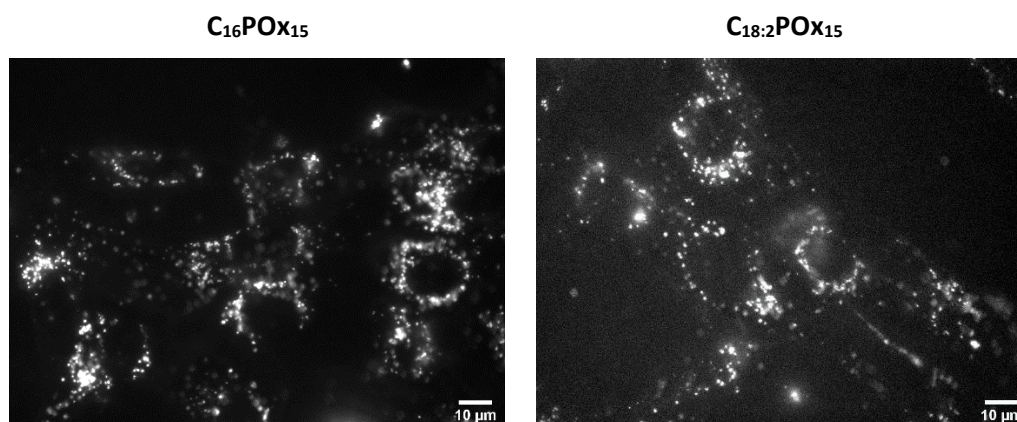


Figure 5: Insertion of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ after 12 hours incubation in human fibroblasts (x63)

As a conclusion, only the $C_{16}POx_{15}$ was able to insert in the GUV phospholipid membrane and more complex cells membrane. Indeed, $C_{18:2}POx_{15}$ diffused around the cell but did not insert. The insertion of polymer in lipid membrane was also analyzed by Schulz et al. [26]. They proposed that the interaction between nonionic amphiphilic polymers and lipid membrane mainly depended on the polymeric architecture and hydrophobic/hydrophilic balance. Moreover, the penetration of neutral polymer into lipid membrane is primarily driven by hydrophobic interaction. Concerning POx amphiphilic polymers, it was proved that they can insert into membrane resulting in “mushroom” or “brush” type decoration. Therefore, as the hydrophobic/hydrophilic balance is similar for the two POx investigated here, the nature of hydrophobic alkyl chain is responsible for the difference of interaction. The unsaturated alkyl chain was not able to interact with lipid membrane maybe due to the less mobility and higher steric hindrance created by the unsaturation compared to the saturated alkyl chain. The slightly longer alkyl chain might also play a role as it is known that shorter alkyl chain enter easily in bilayer [10].

Since at least one of the POx showed capacity to insert into lipid membrane, their ability to penetration skin was then determined.

1.3.3 *In vivo* evaluation of the POx interaction with the ear skin of mice

Mice were used for this *in vivo* study as proof of concept because they are easy to handle compared to other animals and their ears are thin enough to observe the epidermis and dermis by multiphoton microscopy. $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ POx at 500 mg/L (the concentration was increased to ensure a sufficient fluorescent signal) and formulated as lipid nanocapsules (LNC) at 500 mg/L (of grafted POx) were applied on the mice ear with a patch and left to rest for 24 hours. After the patch removal and rinsing what have been left at the skin surface was macroscopically evaluated. First of all, no redness nor irritation were noticed on the ear confirming the harmlessness of the POx formulated. Then, the spreading of POx in water and formulated in LNC was investigated (Figure 6). Due to skin topography, the spreading was not homogenous and the solutions applied went to the wrinkles and furrows. With POx in water, broad spots corresponding to concentrated area of POx were noticed whereas it was more a film of small aggregates for POx in formulation. Therefore, no fluorescence intensity

comparison will be performed in between the two POx. The application with occlusive patch of the water based solutions might have led to the not homogenous spreading during the drying. The two POx left the same spreading in water and in formulation. So, the results were shown in the case of C_{18:2}POx₁₅ only.

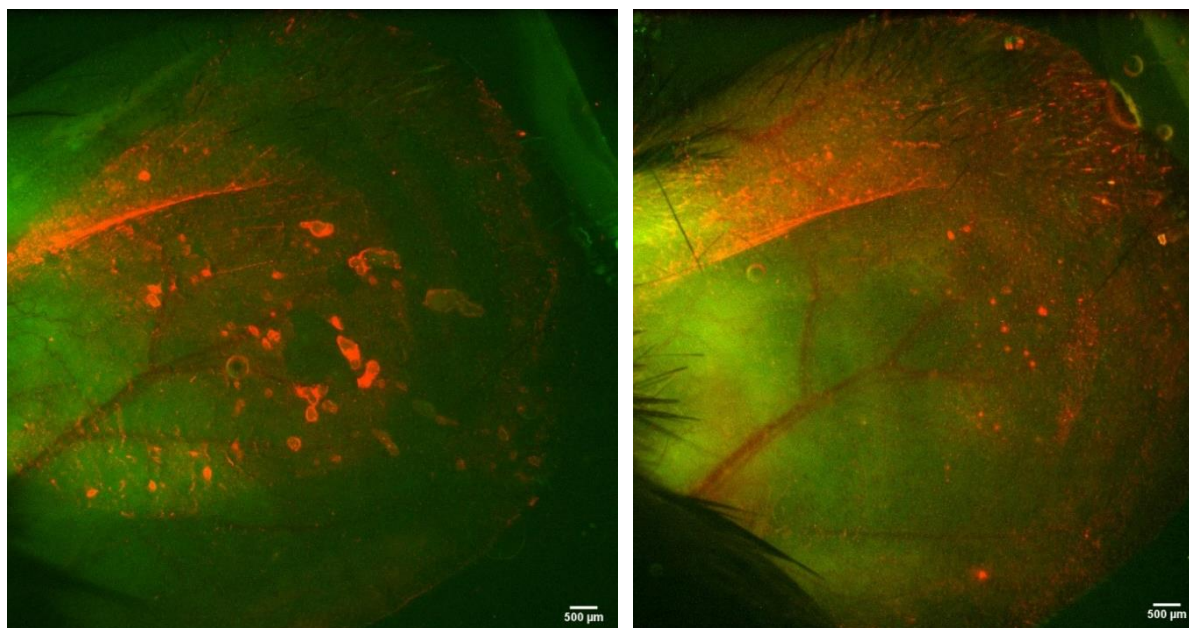


Figure 6: Observation of the spreading on mice ear after the patch application of POx on the left and LNC POx on the right (x 0.8)

The penetration observation was conducted using a multiphoton microscope allowing to see the collagen with the second harmonic (in blue) to localize the dermis. Figure 7 illustrates the results after application of C₁₆POx₁₅ on the left and C_{18:2}POx₁₅ on the right in a) orthogonal view (x,y,z), b) Z-projection and c) histology study. First, the presence of a fluorescent signal for C₁₆POx₁₅ and C_{18:2}POx₁₅ (Figure 7 a) indicated that POx penetrated the skin surface otherwise they would have been washed out during the ear rinsing steps. For the two POx, a red thin POx layer was formed with non-uniform fluorescent signal due to the spreading and skin topography. Compared with the dermis represented in blue in Figure 7, an absence of co-localization was noticed with the POx layer meaning that the POx did not reach the dermis. A closer look was given at the keratinocytes using a Z-projection (Figure 7, b). Both POx diffused in the cells and some round dark shape were visible inside the keratinocytes indicating that POx were located in the epidermis, as keratinocytes in *stratum corneum* have no more nucleus. To confirm that both POx were located in the epidermis, mice ears were examined by histology study (Figure 7, c). The epidermis appeared in blue with the DAPI labelling of the keratinocytes nucleus. Co-localization of the red Alexa fluorescent signal of the two POx and DAPI in blue confirmed the presence of POx in the epidermis. Some aggregates were also visible at the surface, corresponding to the SC filled with POx. Gathering the information with the microscopy observation and the histology study helped to determine the penetration capacity of POx in skin.

As the conclusion, C₁₆POx₁₅ and C_{18:2}POx₁₅ succeeded to cross the *stratum corneum*, reach the upper epidermis and diffused into the keratinocytes cells without any difference due to the insaturation. Thus, once applied on skin and left for 24 hours, both POx enabled to reach the targeted skin layer. The same experiment was conducted with incubation time of 32 h and 48 h but no penetration

difference was observed. The mechanism of POx penetration in mice skin might be due to the lipid alkyl chain that insert within the lipid matrix of the skin and diffused to the epidermis layer.

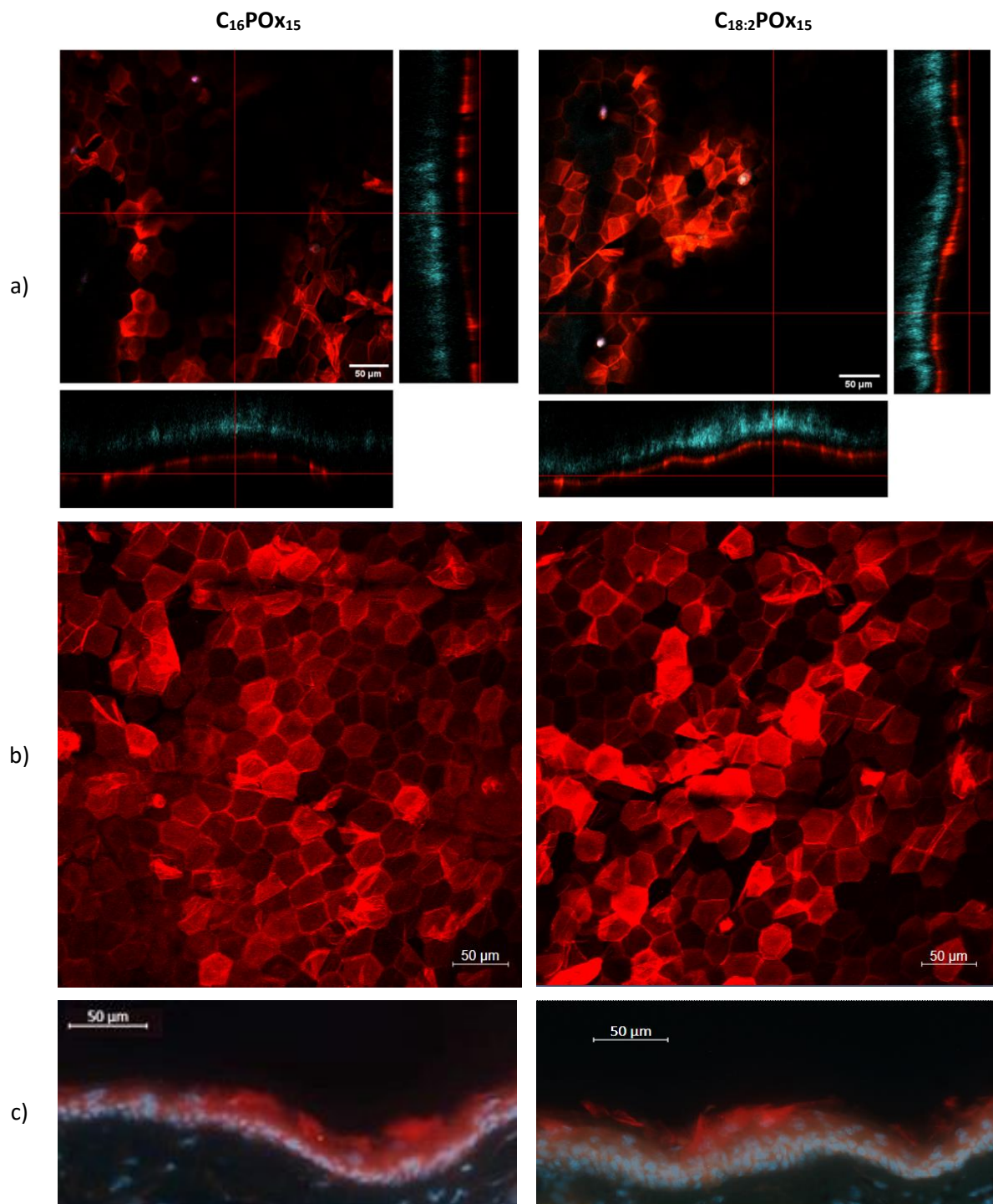
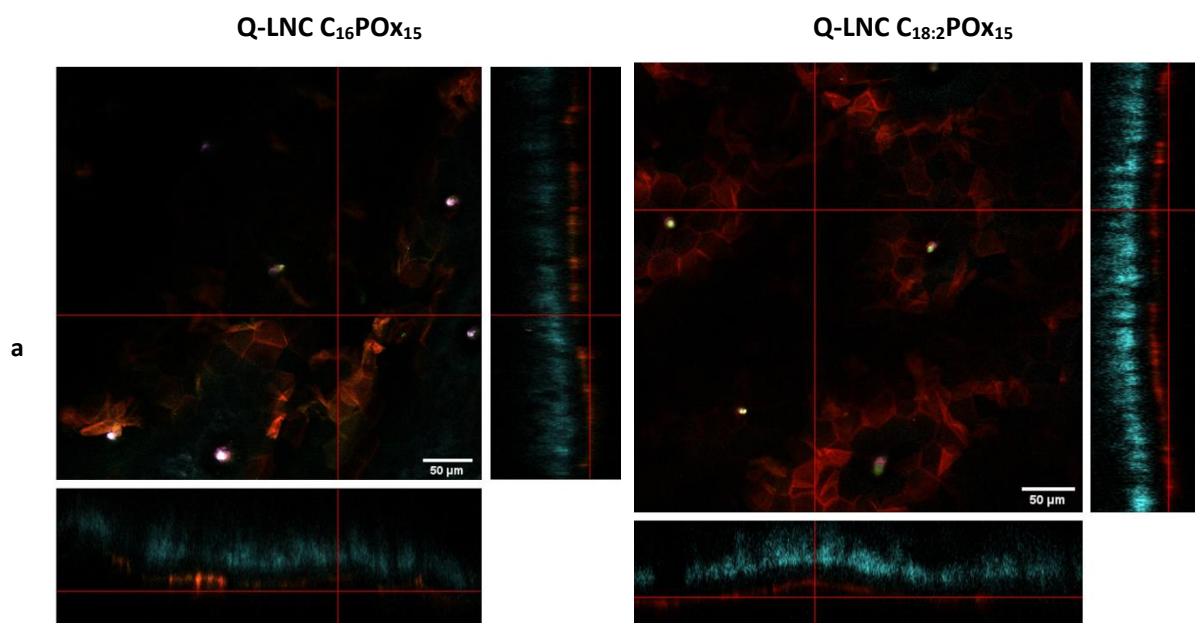


Figure 7: Observation of the penetration capacity after 24h of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ in mice ear ($n=3$), a) orthogonal view, b) Z-projection and c) mice epidermis section, ($n=3$)

Topical delivery to the epidermis of antioxidant loaded in POx based nanoformulation was then evaluated. The antioxidant quercetin was encapsulated in lipid nanocapsules (called Q-LNC) made of POx grafted with the fluorescent probe Alexa at 500 mg/L. The penetration was followed using the quercetin fluorescent signal (in green) and the one of Alexa (in red). The Q-LNC were applied with no dilution on the patch and left untouched for 24 hours. The observation was performed with the multiphoton as shown Figure 8 with a) orthogonal view, b) Z-projection and c) histology study. The fluorescence signal of Alexa in Q-LNC was lower than before with POx in water at the exact same concentration. However it was strong enough to evaluate the Q-LNC penetration on mice ears. First of all, the aggregates noticed before on the macroscopic observation of LNC spreading in Figure 6, were also observed and investigated microscopically. The aggregates were localized at the surface inside the *stratum corneum* and made of POx and quercetin. The LNC might fused with the skin and merged all together. In solution their stability was guaranteed by steric repulsion of POx hydrophilic part but once topically applied, POx interacted with the skin. This effect might be reinforced with the patch application creating aggregates during its drying. As previously observed with POx in solution, a thin layer was formed on top of the dermis, indicating the absence of co-localization with the dermis (Figure 8 a). Looking at the Z-projection on Figure 8 b), the slightly green fluorescent signal inside the keratinocytes revealed the quercetin presence. It should be noted that the green rounded shape spots corresponded to the auto fluorescence signals of remaining hair follicles. Finally, Figure 8 c) confirmed the co-localization of both Q-LNC in the upper epidermis. As a conclusion, even in formulation POx successfully reached and delivered the antioxidant encapsulated to the epidermis layer.



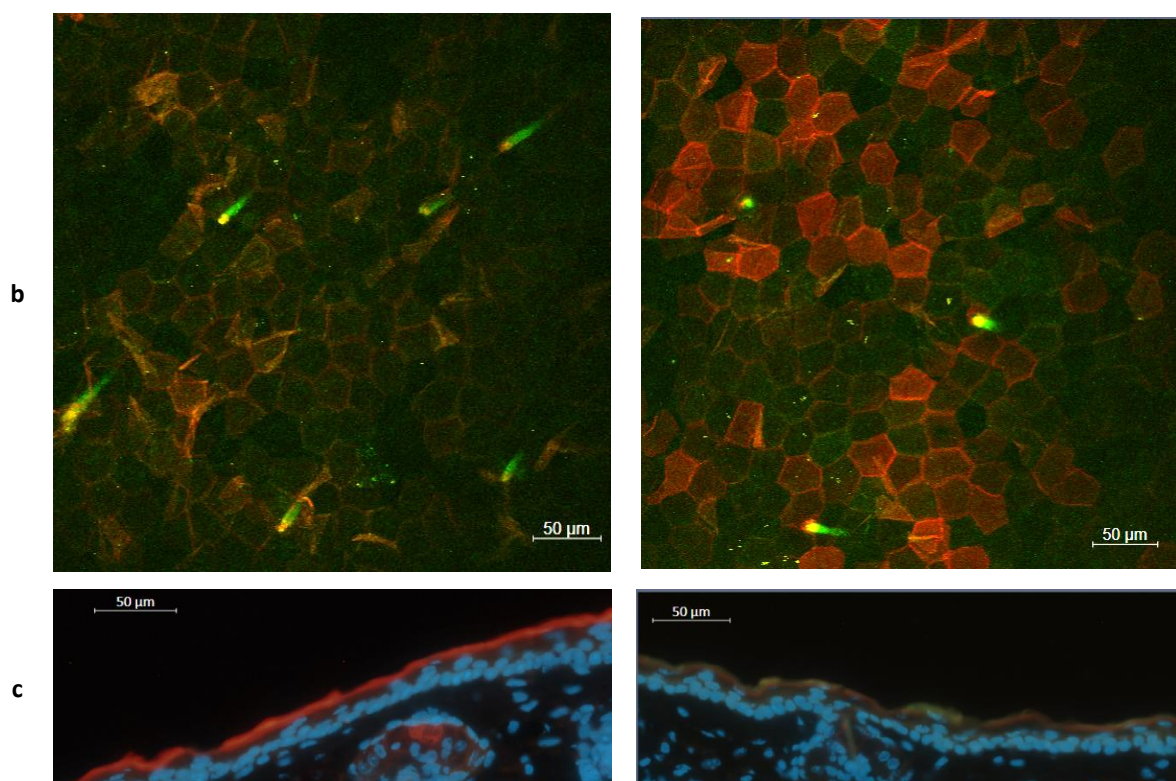


Figure 8: Observation of the penetration capacity after 24h of Q-LNC $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ in mice ear, a) orthogonal view, b) Z-projection and c) mice epidermis section, (n=3)

Discussing the penetration results with the literature was not easy due to the variation of the experimental conditions such as skin origin, mode of application, technique measurement, incubation time, observation conditions. However, we can compare the penetration capacity of POx lipid nanocapsules with the study performed by Hung et al. on lipid based nanocarriers and polymeric based nanocarriers penetration on mice skin [27]. As they also evaluate the impact of UV radiation on the penetration capacity of their formulation, we only focused on the results without UV exposure. The nanoparticles with a size of 200 nm were loaded with Nile Red and their penetration capacity on mice skin was assessed by fluorescence microscopy. The lipid nanoparticles (NLC) did not penetrate any skin layers (SC or epidermis) and the polymeric nanoparticles based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) were localized in the *stratum corneum* and not the epidermis. According to them, this difference of penetration was due to the flexibility of the soft polymeric nanoparticles, compared to the NLC, allowing them to cross the SC. In our case, LNC are known for their rigid capsules but POx chain did show some flexibility that might influence as they are located in the corona of the LNC. Moreover, the small size of LNC might also help enhancing the penetration compared to the NLC of 200 nm. To validate the nanosized hypothesis, we looked into the work of Mortensen et al. as the use nanoparticles with the same size than LNC [28]. They applied on mice skin for 24 hours on healthy skin carboxylate Quantum Dots nanoparticles diluted in glycerol. The nanoparticles remained in the stratum corneum and did not penetrate until the epidermis. Therefore, nanosized or the lipid based formulation did not guarantee the skin penetration. The mechanism of penetration enhancement of $C_{16}POx_{15}$ and $C_{18:2}POx_{15}$ still remain difficult to understand but they were proved to have the capacity to penetrate mice skin.

I.4 Conclusion

Our study aimed at evaluating the ability of POx to insert in simple lipid bilayers, cell membranes and to penetrate into mice skin. Two POx were compared one with a linear saturated alkyl chain ($C_{16}POx_{15}$) and one with a linear unsaturated alkyl chain ($C_{18:2}POx_{15}$). Both POx behave differently regarding the insertion in lipid bilayer of GUV and cells but both succeeded to penetrate in mice skin. Indeed, $C_{16}POx_{15}$ was able to immediately insert in lipid bilayer whereas $C_{18:2}POx_{15}$ did not interact. This might be due to the higher flexibility and mobility of the linear saturated alkyl chain compared to the unsaturated one. Once applied on mice skin using a patch for 24 hours, both POx successfully crossed the *stratum corneum* barrier and reached the epidermis. Even formulated into lipid nanocapsules, both POx reached the epidermis and delivered the quercetin encapsulated. These results are very promising and need to be confirm on human skin to validate the skin penetration capacity for human use.

I.5 Supplementary information

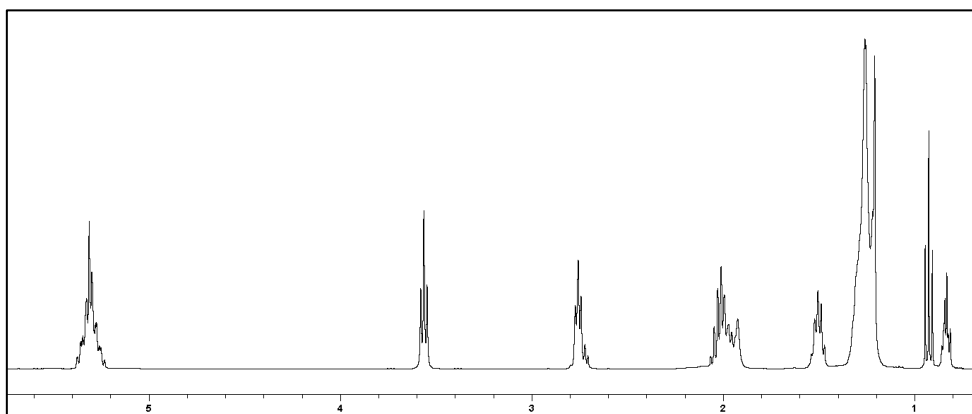


Figure SI 1: RMN ^1H (CDCl_3) spectra of fatty alcohol ($\text{C}_{18:2}\text{OH}$)

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (3H, CH_3), 1,2 (14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,5 (4H, HOCH_2CH_2), 2,0 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,5 (2H, HOCH_2), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

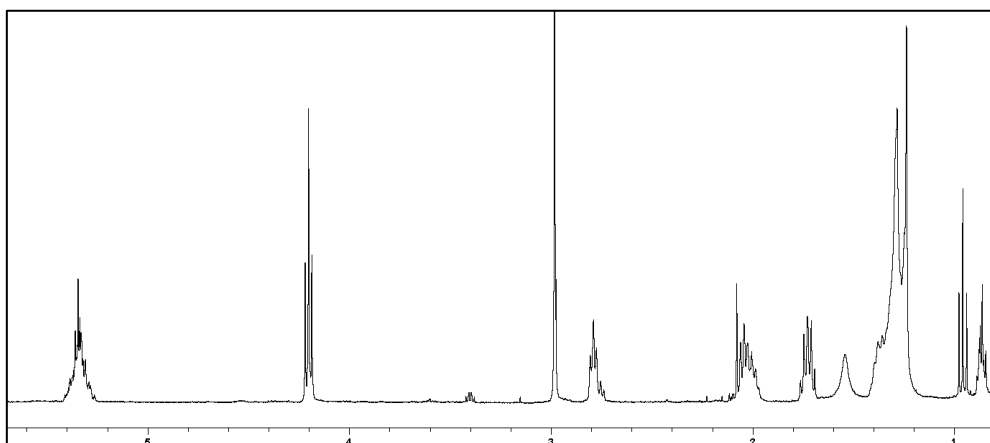


Figure SI 2: RMN ^1H (CDCl_3) spectra of mesylate ($\text{C}_{18:2}\text{OMs}$)

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (3H, CH_3), 1,2 (14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,5 (4H, HOCH_2CH_2), 2,0 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,0 (3H, O_3SCH_3), 4,2 (2H, sMOCH_2), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

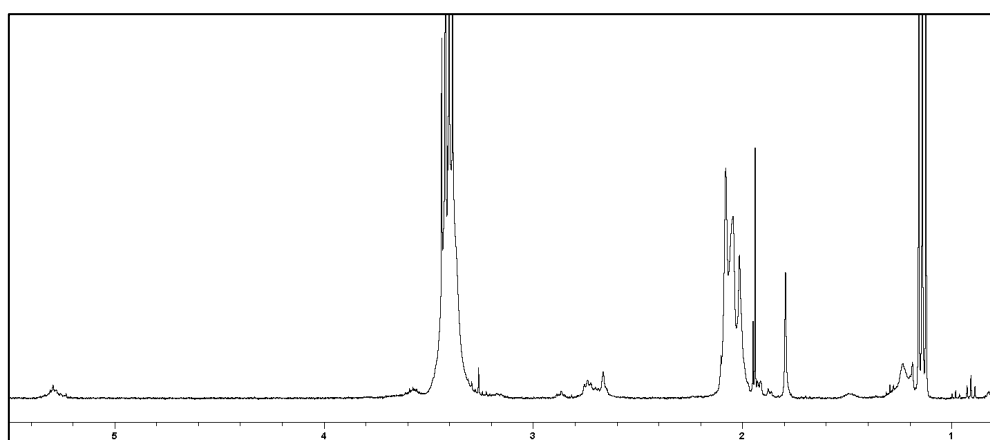


Figure SI 3: RMN ^1H (CDCl_3) spectra of POx ($\text{C}_{18:2}\text{POx}_{15}$)

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,9 (3H, CH_3), 1,0-1,2 (24H, CH_2), 2,1 (45H, CH_3 POx), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,4 (62H, CH_2 POx), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

I.6 Résultats complémentaires

Pour centrer le message de la publication sur l'étude de pénétration, nous avons choisi de ne pas présenter certains résultats. En effet, nous avons également réalisé l'étude d'insertion sur GUV et sur les cellules des formulations MM et LNC et la pénétration des MM. Ces résultats complémentaires sont présentés et discutés dans cette partie. Tout d'abord, les formulations MM et LNC réalisées avec le $C_{16}POx_{15}$ greffé Alexa à 500 mg/L ont été testées sur les GUV (Figure 58). **Après addition des MM** dans la solution de GUV, on observe (filtre GFP) **une déformation de la membrane sur certains GUV**. L'observation du signal de fluorescence du POx-Alexa (filtre MCH) n'a pas révélé de co-localisation dans les membranes. Le faible impact sur les membranes des GUV des MM de $C_{16}POx_{15}$ observé peut être lié à la concentration en POx. En effet, la concentration en POx dans les MM est de 0,5 g/L et l'ajout des MM dans la solution des GUV a conduit à une dilution par 20 soit une concentration finale en POx à 0,025 g/L. Ainsi, nous avons augmenté la concentration en MM dans la solution de GUV pour arriver à la même concentration en POx de 0.05 g/L que dans l'étude d'insertion des $C_{16}POx_{15}$ dans les GUV (cf partie I.3.1). N'ayant pas constaté de différence d'insertion, il est possible que les MM fusionnent avec les GUV car tous deux sont composés des mêmes phospholipides (phosphatidylcholine).

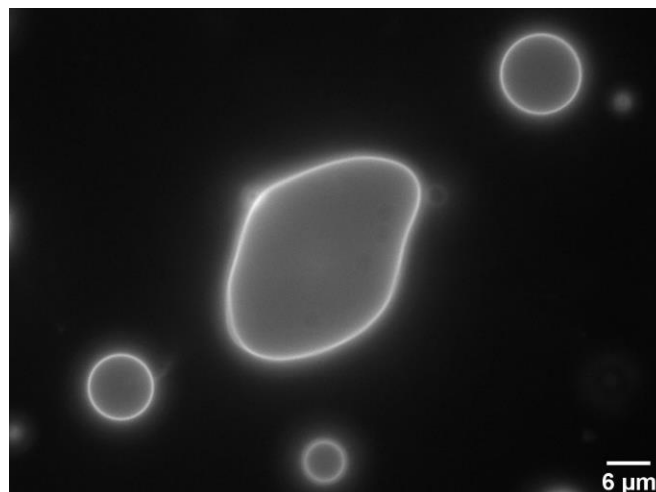


Figure 58 : Interaction des MM $C_{16}POx_{15}$ avec les GUV (x100, filtre GFP)

En revanche **dans le cas des LNC** (Figure 59), après ajout de la solution LNC $C_{16}POx_{15}$ nous avons observé **l'explosion immédiate des GUV**. L'image de gauche montre les GUV stables avant l'ajout et celle de droite, 30 secondes après l'ajout où de nombreux GUV ont explosé. La concentration en POx dans les LNC est de 62,5 g/L et l'ajout des LNC dans la solution des GUV a conduit à une dilution par 20 soit une concentration finale en POx de 3 g/L. On note que les GUV de très grosses tailles ne semblent pas exploser immédiatement. Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer ce phénomène : soit les POx présents en grande concentration s'insèrent dans la membrane en grand nombre induisant sa perméabilité, soit les LNC fusionnent avec la membrane et le cœur huileux s'écoule dans les GUV générant une forte pression interne. Pour vérifier que l'explosion est plus liée à la forte concentration en POx qu'au type de formulation, nous avons voulu ajouter le $C_{16}POx_{15}$ en solution à 3 g/L dans la solution de GUV. Cependant, les expériences ont dû être annulées à cause de la crise sanitaire liée au COVID-19. De même, nous avons prévu de mesurer l'insertion des POx dans des GUV composés de phosphatidylcholine et cholestérol pour induire une asymétrie dans la membrane et étudier l'affinité du POx pour les différents domaines.

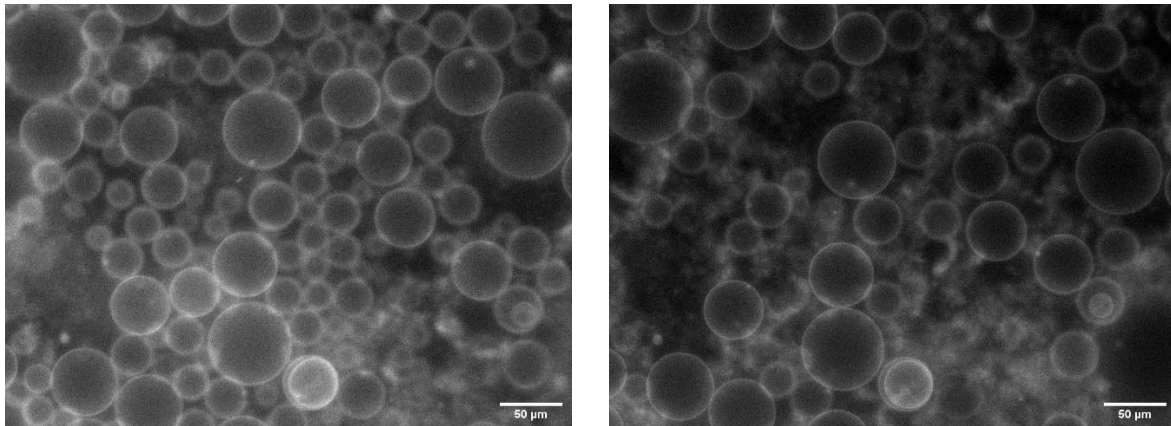


Figure 59 : Observation des GUV avant (à gauche) et après ajout de LNC $C_{16}POx_{15}$ (à droite) (x40, filtre GFP)

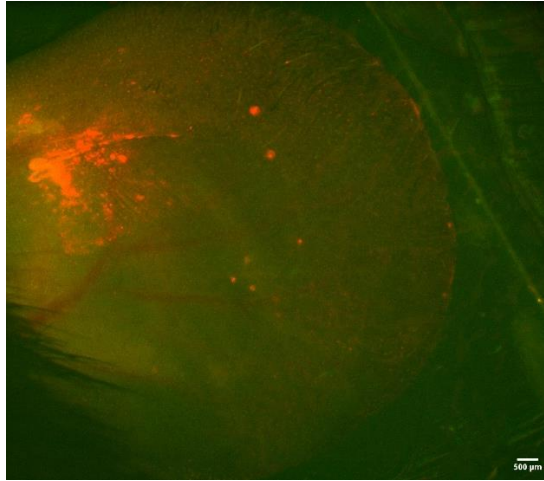
Concernant les cellules, une étude complémentaire sur l'insertion des POx seuls et formulés, leur cinétique ainsi que leur localisation après incubation à l'intérieur des cellules fibroblastes et kératinocytes humains (mitochondrie, lysosome ou noyau) devait être conduite en collaboration avec le Dr. L. Lionnard (ISEM). A cause, de la crise sanitaire liée au COVID-19, ces expériences ont aussi été annulées. C'est pourquoi nous nous sommes basés sur la littérature pour expliquer les résultats obtenus partie I.3.2. Nous souhaitons réaliser ces expériences complémentaires avant de soumettre cet article pour publication.

Enfin, la pénétration *in vivo* des micelles mixtes a également été évaluée sur oreille de souris par application d'un patch. L'évaluation macroscopique de l'étalement sur oreille (Figure 60 a) révèle comme pour les LNC, un film non homogène avec des agrégats et une accumulation dans les sillons. Le mode d'application par patch et la topographie de la peau en sont en parti responsables mais il est également possible que la formulation s'agrége en se déposant sur la peau. La quercétine encapsulée n'est pas en quantité suffisante pour être observée au microscope multiphotons. Le taux de chargement en quercétine dans les MM de 3,6 % est plus faible que celui de LNC de 7,9 % et donc insuffisant. Seul le signal des POx a pu être suivi. Au niveau microscopique (Figure 60 b), le résultat est semblable à celui des LNC (partie I.3.3) avec une couche fluorescente rouge comprenant de petits agrégats qui est séparée du derme. La projection en Z (Figure 60 c) permet de voir les kératinocytes et d'entrevoir les noyaux de forme ronde et plus foncés au centre de certaines cellules. Les MM formulées avec les deux POx ont donc conduit à la même capacité de pénétration que les LNC et les POx seuls. Les MM s'insèrent dans les kératinocytes et diffusent, permettant d'entrevoir la présence de noyaux et ainsi confirmer une pénétration dans l'épiderme viable. En conclusion, **les deux formulations de MM sont capables de traverser le *stratum corneum* et de pénétrer dans l'épiderme viable.** Comme les MM avec $C_{16}POx_{15}$ et $C_{18:2}POx_{15}$ ont conduit au même résultat, seule l'observation de MM $C_{18:2}POx_{15}$ est présentée ci-dessous.

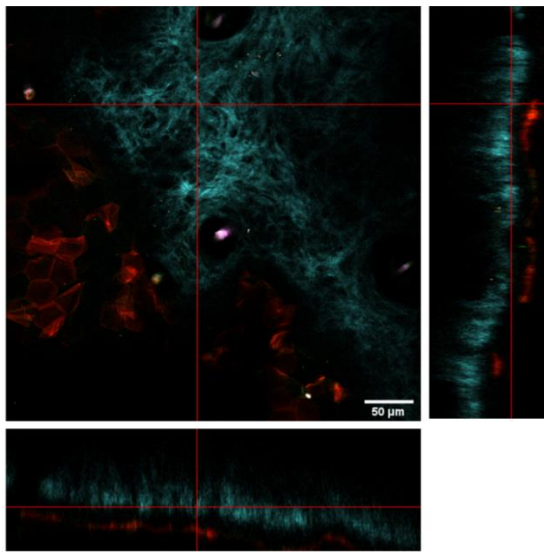
Pour déterminer si les MM sont capables d'assurer *in vivo* sur oreille de souris la délivrance topique d'un principe actif dans les couches de l'épiderme, il est possible d'encapsuler une sonde fluorescente dont le signal sera plus intense que celui de la quercétine. Ainsi, même si le taux d'encapsulation est plus faible que les LNC, il sera possible de le suivre. Par exemple, la sonde DiD (1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine) pourrait être encapsulée.

Pour compléter l'étude de pénétration *in vivo* sur oreille de souris des Q-LNC POx et assurer que la délivrance topique de la quercétine est due à la formulation, il faudra évaluer la pénétration de la quercétine seule, solubilisée dans l'eau. Ce contrôle sera effectué avant la soumission de la publication.

a)



b)



c)

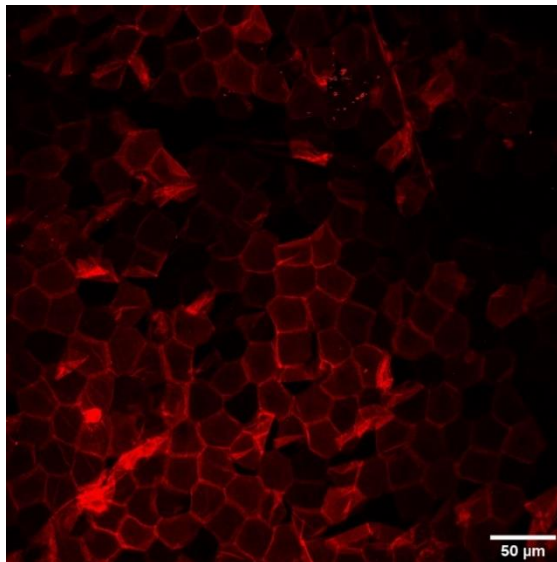


Figure 60 : Pénétration des micelles mixtes de $C_{18:2}POx_{15}$ après 24h d'incubation a) oreille complète, b) vue orthogonale en x, y, z et c) projection en Z

II. Etude préliminaire de pénétration sur explants de peau humaine

Compte tenu de la bonne capacité de pénétration de $C_{16}POx_{15}$ et $C_{18:2}POx_{15}$ en solution et en formulation dans les nanocapsules lipidiques, nous avons évalué leur capacité de pénétration sur des explants de peau humaine. Ces explants ont été fournis par l'entreprise Genoskin® (dans le respect de l'éthique et de la loi française L.1245 CSP) suite à des chirurgies abdominales. Nous avons choisi de travailler avec des explants de peau d'une surface de 1,13 cm² et d'un diamètre de 15 mm, comprenant l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 61). Cette étude *ex vivo* a été possible grâce à une formation à l'histologie et la collaboration avec Mme Chantal Ripoll de l'institut des Neurosciences de Montpellier (INM).



Figure 61 : Explant de peau humaine, Native Skin Medium, Genoskin®

Au cours de cette étude, nous avons étudié plusieurs paramètres : modes d'application de la formulation à la surface de la peau, solutions et formulations de POx et temps d'incubation (Tableau 18). Le polymère $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ a pu être ajouté à cette étude. Chaque lot fourni par le laboratoire Genoskin® est composé de 12 explants provenant du même donneur. Nous avons travaillé à la même concentration (500 mg/L) que pour l'étude sur l'oreille de souris. Pour chaque essai, la quantité de solution déposée était de 45 µL, dans le respect des recommandations du fournisseur, pour avoir le volume nécessaire pour recouvrir toute la surface de l'explant. Le dépôt de gouttes à la surface de l'explant n'ayant pas permis d'obtenir un bon étalement, nous avons appliqué le dépôt par massage et par patch. L'application par massage correspond à une application en cercle avec un doigt ganté sur l'explant pendant 30 secondes. Pour pouvoir suivre nos formulations en microscopie de fluorescence, nous avons chargé les LNC en quercétine et avec une sonde fluorescente, le DiD (1,1'-dioctadécyl-3,3,3',3'-tétraméthylindodicarbocyanine).

Tableau 18 : Conditions testées sur explants de peau humaine

Conditions	Lot n°1	Lot n°2	Lot n°3
Patients	F, 26 ans, Abdomen, phototype 2	F, 53 ans, Abdomen, phototype 3	F, 58 ans, Abdomen, phototype 3
Solutions testées	$C_{16}POx_{15}$ -A, $C_{18:2}POx_{15}$ -A, Q-LNC $C_{16}POx_{15}$ -A, Q-LNC $C_{18:2}POx_{15}$ -A, PBS (contrôle)	$C_{16}POx_{15}$ -A, $C_{18:2}POx_{15}$ -A, $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ -A, DiD-LNC $C_{16}POx_{15}$ -A, DiD-LNC $C_{18:2}POx_{15}$ -A, PBS (contrôle)	$C_{16}POx_{15}$ -A, $C_{18:2}POx_{15}$ -A, $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ -A, DiD-LNC $C_{16}POx_{15}$ -A, DiD-LNC $C_{18:2}POx_{15}$ -A, PBS (contrôle)
Mode d'application	Dépôt goutte	Patch Massage	Patch
Temps d'incubation	6h, 24h, 48h	24h	24h

F : femme, A : sonde fluorescente Alexa 546 greffée, Q : quercétine chargée dans les LNC, DiD : sonde fluorescence chargée dans les LNC

L'étude histologique des explants fournie par Genoskin® permet de s'assurer de l'intégrité du *stratum corneum* avant application des solutions/formulations (Figure 62).

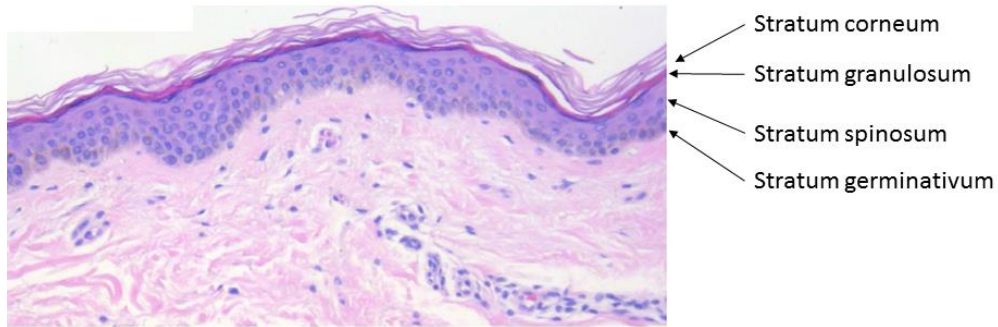


Figure 62 : Coupe d'explant abdomen Genoskin® : identification des couches de l'épiderme (source Genoskin)

Après application des solutions/formulations, incubation et rinçage comme décrit chapitre Matériels et Méthodes partie VI.4, les explants sont congelés suivant la technique cryogénique OCT et des coupes de 16 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat et fixées sur lame. Des explants sont aussi traités avec seulement de l'eau pour évaluer l'impact des différents traitements sur l'état de la peau (contrôle négatif) (Figure 63). Les noyaux sont marqués au DAPI pour pouvoir localiser l'épiderme en fluorescence. Après fixation, les lames sont observées au microscope droit à épifluorescence (Leica Thunder) en fluorescence et lumière transmise.

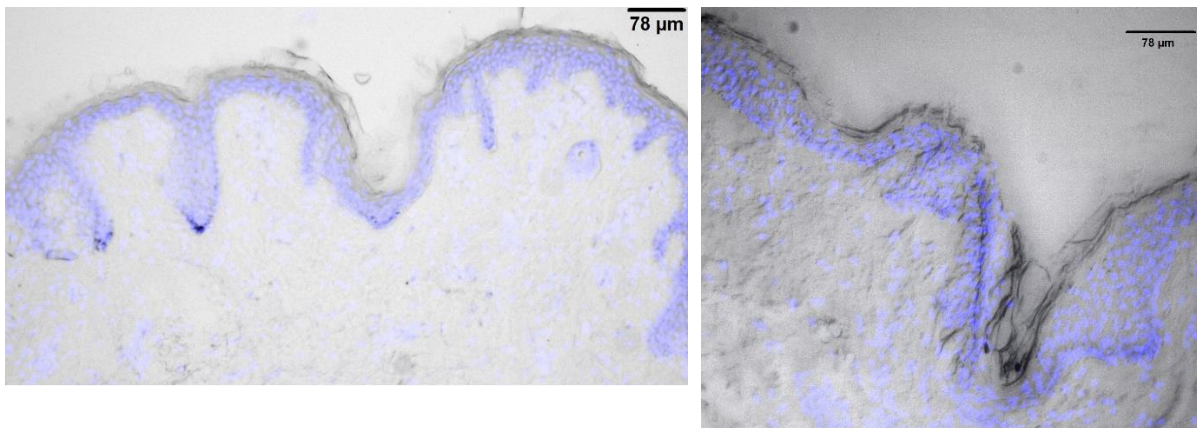


Figure 63 : Coupe d'explant après application de PBS (contrôle négatif), x10 à gauche et x20 à droite

Les explants des contrôles négatifs ne présentent pas d'altération suite aux différents traitements (congélation, coupe) effectués.

Les clichés obtenus pour les trois POx marqués avec la sonde Alexa 546 : $C_{16}POx_{15}$, $C_{18:2}POx_{15}$, $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ sont présentés avec les coupes d'explants (Figure 64). Les trois POx solubilisés dans l'eau (100 % marqués) présentent la même capacité de pénétration au travers de la peau. Tout d'abord, ils ne sont pas restés en surface puisque le signal de fluorescence des POx marqués est détecté, ils ont donc pénétré le *stratum corneum*. Dans le cas contraire, ils auraient été éliminés lors des étapes de rinçages et de séchage. Cependant, ils se situent dans le *stratum corneum* et n'ont pas atteint l'épiderme viable c'est-à-dire la couche du *stratum spinosum*. Il est à noter que la peau de souris

est plus perméable que la peau humaine ; ceci pourrait expliquer en partie la différence de pénétration entre l'oreille de souris et l'explant de peau humaine.

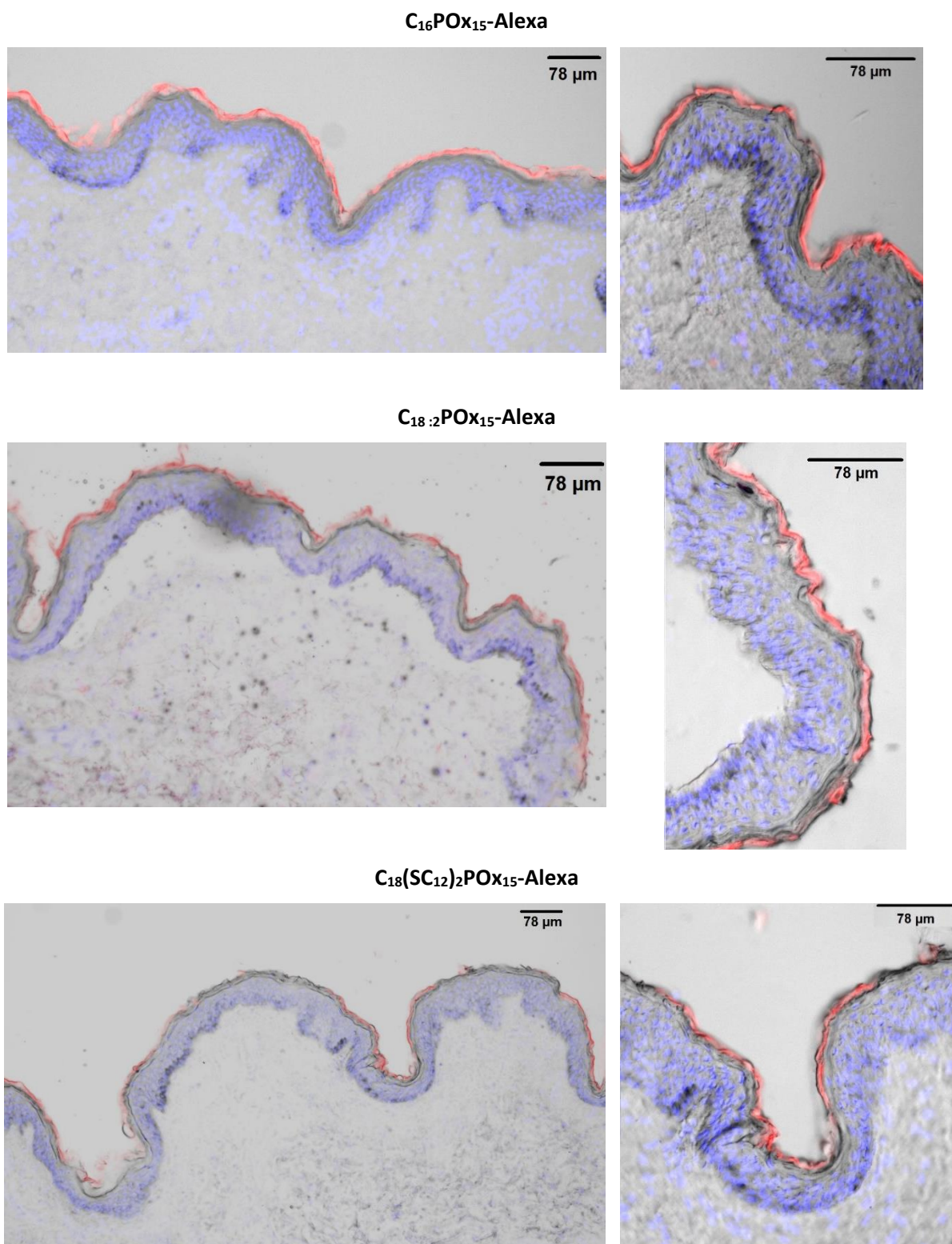


Figure 64 : Coupe d'explants avec les 3 POx marqués, à gauche x10 et à droite x20

Dans le cas des formulations LNC, nous n'avons pas obtenu de signal de fluorescence de l'Alexa greffée aux POx ou de la sonde encapsulée et par conséquent nous n'avons pas pu suivre la pénétration des formulations dans les explants. La concentration en POx marqué de 500 mg/L devait être trop faible

bien que nous ayons travaillé à la même concentration en POx marqué que lors de notre étude avec les POx solubilisés dans l'eau. L'observation de la pénétration des LNC nécessitera donc de réaliser de nouveaux essais à 1 g/L en POx marqué pour obtenir un signal suffisant. Le signal de la quercétine et de la sonde fluorescente DiD (à 1 mg/L dans les LNC) n'ayant pas été détecté, nous augmenterons aussi le chargement en DiD à 10 mg/L. Ces nouvelles mesures devraient aussi nous permettre de vérifier si les LNC restent intacts ou non lors de la diffusion au travers de la peau. En effet, un signal ponctiforme, en agrégat indiquera que les LNC sont intacts et un signal diffus prouvera que la sonde a été libérée dans les tissus et donc que les LNC se sont désintégrées.

Il est difficile de comparer nos résultats avec ceux de la littérature car les études de pénétration sont majoritairement réalisées *ex vivo* sur des cellules de Franz ou *in vivo* par *tape stripping* comme mentionné dans le chapitre 1 partie 5.3. Nous avons voulu, dans un premier temps, trouver une alternative plus simple aux cellules de Franz qui demandent une expertise particulière. Cependant, une nouvelle collaboration va être initiée pour réaliser l'étude avec les cellules de Franz dans le cadre d'un nouveau projet InterCarnot avec l'URCOM (Dr Céline Picard). Concernant le *tape stripping*, une application des formulations sur l'homme *in vivo* semble prématurée sans vérification préalable de l'innocuité des formulations sur peau humaine.

En général, la majorité des études de pénétration sur peau est réalisée avec des nanoformulations et très peu avec les polymères seuls pour évaluer leur capacité de pénétration. Quelques études portant sur le concept de promoteur de pénétration (CPE) ont été appliquées aux polymères sous le terme de « *polymeric penetration enhancer* » (PPE) [29]. Elles ont tout d'abord porté sur les polymères biodégradables et principalement les polyesters : Rancan et al. ont notamment étudié la pénétration de l'acide polylactique sous forme de micelles sur explants de peau humaine par *tape stripping* en suivant le relargage d'une sonde fluorescente lipophile encapsulée et non la pénétration du polymère [30]. Les micelles s'accumulent dans un premier temps dans le SC majoritairement *via* la voie des annexes par les follicules pileux puis la sonde fluorescente diffuse dans la peau. Les polymères amphiphiles PEG et poloxamères dont la balance hydrophile/hydrophobe peut être modulée lors de leur synthèse ont également suscité un grand intérêt. Différentes architectures ont été élaborées sous forme de dibloc [31], de tribloc ou de dendrimère [32]. Les études de pénétration par cellules de Franz basées sur des micelles de ce type de polymères chargées en sonde fluorescente (ou molécule active) ont démontré une amélioration de délivrance topique par comparaison aux mêmes systèmes sans les polymères. Bien qu'une comparaison avec ces systèmes soit impossible à cause des conditions expérimentales trop différentes, notre étude de pénétration des polyoxazolines amphiphiles a mis en avant le potentiel de « *polymeric penetration enhancer* » des POx. Certes, les architectures POx testées ont pénétré uniquement dans le SC mais d'autres architectures avec des chaînes alkyles plus courtes peuvent être élaborées pour optimiser la pénétration.

Des études sur cellule de Franz ont montré la délivrance topique d'antioxydants (resvératrol et curcumin) encapsulés dans des LNC dans l'épiderme de peau humaine *ex vivo* [33]. Il est possible que l'apport du POx conjugué aux LNC conduise à une délivrance d'actif dans l'épiderme de peau humaine. Pour valider cette hypothèse, nous allons faire une dernière étude sur explant de peau avec une concentration en POx marqué et DiD plus forte, comme évoqué précédemment.

Conclusion

Dans un premier temps, cette étude sur la capacité de pénétration des POx seuls a permis de mettre en évidence les différences de comportement induites par la nature de la chaîne alkyle et aussi par les modèles utilisés. Seul le POx avec une chaîne alkyle linéaire saturée (C₁₆) est capable de s'insérer immédiatement dans des membranes lipidiques simples (GUV) à plus complexes (cellulaire). Toutefois, lors de l'étude *in vivo* sur oreille de souris, les deux POx saturé et insaturé traversent la barrière du *stratum corneum* pour atteindre l'épiderme après 24 heures d'incubation. Ce résultat n'a pas été reproduit sur les explants de peau humaine où les POx restent bloqués dans la barrière cutanée du *stratum corneum*.

Dans un deuxième temps, cette étude a été réalisée sur les formulations et plus particulièrement avec les LNC POx chargées en quercétine. Sur oreille de souris, nous avons démontré la capacité des LNC POx à traverser le *stratum corneum* et à délivrer la quercétine dans la couche cible de l'épiderme. Malheureusement la faible intensité du signal de fluorescence de nos formulations n'a pas permis d'évaluer la capacité de pénétration des LNC et micelles mixtes sur les explants de peau humaine.

Références

1. Proksch, E., J.M. Brandner, and J.-M. Jensen, *The skin: an indispensable barrier*. *Experimental Dermatology*, 2008. 17(12): p. 1063-1072.
2. Feingold, K.R. and P.M. Elias, *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2014. 1841(3): p. 280-294.
3. Rinnerthaler, M., et al., *Oxidative Stress in Aging Human Skin*. *Biomolecules*, 2015. 5(2): p. 545.
4. Baudouin, C., et al., *Environmental pollutants and skin cancer*. *Cell Biology and Toxicology*, 2002. 18(5): p. 341-348.
5. Mota, A.H., et al., *Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017. 532(2): p. 710-728.
6. Czajkowska-Kośnik, A., M. Szekalska, and K. Winnicka, *Nanostructured lipid carriers: A potential use for skin drug delivery systems*. *Pharmacological Reports*, 2019. 71(1): p. 156-166.
7. Zhai, Y. and G. Zhai, *Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topical delivery*. *Journal of Controlled Release*, 2014. 193: p. 90-99.
8. Sala, M., et al., *Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018. 535(1): p. 1-17.
9. Heurtault, B., et al., *A Novel Phase Inversion-Based Process for the Preparation of Lipid Nanocarriers*. Vol. 19. 2002. 875-80.
10. Dragicevic, N., J.P. Atkinson, and H.I. Maibach, *Chemical Penetration Enhancers: Classification and Mode of Action*, in *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, N. Dragicevic and H.I. Maibach, Editors. 2015, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 11-27.
11. Ochalek, M., et al., *Characterization of lipid model membranes designed for studying impact of ceramide species on drug diffusion and penetration*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2012. 81(1): p. 113-120.
12. Rolland, A., et al., *Effect of penetration enhancers on the phase transition of multilamellar liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine. A study by differential scanning calorimetry*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1991. 76(3): p. 217-224.
13. Wertz, P.W., et al., *Preparation of Liposomes from Stratum Corneum Lipids*. *Journal of Investigative Dermatology*, 1986. 87(5): p. 582-584.
14. Lorson, T., et al., *Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update*. *Biomaterials*, 2018. 178: p. 204-280.
15. Guillermin, B., et al., *How to Modulate the Chemical Structure of Polyoxazolines by Appropriate Functionalization*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2012. 33(19): p. 1600-1612.
16. Simon, L., et al., *Recent Advances and Prospects in NanoDrug Delivery Systems using Lipopolyoxazolines*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020: p. 119536.
17. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based mixed micelles as PEG free formulations for an effective quercetin antioxidant topical delivery*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019. 570: p. 118516.
18. Simon, L., et al., *Polyoxazolines based lipid nanocapsules for topical delivery of antioxidants*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2020. 579: p. 119126.
19. Portet, T., et al., *Visualization of Membrane Loss during the Shrinkage of Giant Vesicles under Electropulsation*. *Biophysical Journal*, 2009. 96(10): p. 4109-4121.
20. Gibot, L., et al., *A preexisting microvascular network benefits in vivo revascularization of a microvascularized tissue-engineered skin substitute*. *Tissue Eng Part A*, 2010. 16(10): p. 3199-206.
21. Pillet, F., et al., *Importance of endogenous extracellular matrix in biomechanical properties of human skin model*. *Biofabrication*, 2017. 9(2): p. 025017.
22. Ladavière, C., C. Tribet, and S. Cribier, *Lateral Organization of Lipid Membranes Induced by Amphiphilic Polymer Inclusions*. *Langmuir*, 2002. 18(20): p. 7320-7327.
23. Tsuda, S., et al., *Shape Transformations of Lipid Vesicles by Insertion of Bulky-Head Lipids*. *PLOS ONE*, 2015. 10(7): p. e0132963.
24. Luxenhofer, R., et al., *Structure-property relationship in cytotoxicity and cell uptake of poly(2-oxazoline) amphiphiles*. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 2011. 153(1): p. 73-82.
25. Kempe, K., et al., *Multifunctional Poly(2-oxazoline) Nanoparticles for Biological Applications*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2010. 31(21): p. 1869-1873.
26. Schulz, M., A. Olubummo, and W.H. Binder, *Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes*. *Soft Matter*, 2012. 8(18): p. 4849-4864.
27. Hung, C.-F., et al., *Cutaneous penetration of soft nanoparticles via photodamaged skin: Lipid-based and polymer-based nanocarriers for drug delivery*. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. 94: p. 94-105.
28. Mortensen, L.J., et al., *In Vivo Skin Penetration of Quantum Dot Nanoparticles in the Murine Model: The Effect of UVR*. *Nano Letters*, 2008. 8(9): p. 2779-2787.
29. Yang, Y., J. Bugno, and S. Hong, *Nanoscale polymeric penetration enhancers in topical drug delivery*. *Polymer Chemistry*, 2013. 4(9): p. 2651-2657.

30. Rancan, F., et al., *Stability of polylactic acid particles and release of fluorochromes upon topical application on human skin explants*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2012. 80(1): p. 76-84.
31. Xue, B., et al., *Biodegradable self-assembled MPEG-PCL micelles for hydrophobic oridonin delivery in vitro*. Journal of biomedical nanotechnology, 2012. 8(1): p. 80-89.
32. Yang, Y., et al., *Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration*. Biomacromolecules, 2012. 13(7): p. 2154-2162.
33. Friedrich, R.B., et al., *Skin penetration behavior of lipid-core nanocapsules for simultaneous delivery of resveratrol and curcumin*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015. 78: p. 204-213.

Matériels et Méthodes

Pour éviter les redondances avec les parties matériels et méthodes insérées dans les publications, des renvois vers les chapitres et les parties concernées ont été effectués.

I. Synthèses des polyoxazolines

I.1 Linéaire saturé C₁₆POx_n

La synthèse a été décrite dans le **chapitre 3 partie III.3.1**.

RMN ¹H (CDCl₃), δ (ppm) : 0,9 (3H, CH₃), 1,2 (28H, CH₂), 2,1 (45H, CH₃ POx) 3,4 (62H, CH₂ POx).

I.2 Linéaire insaturé C₁₈:2POx_n

L'huile de lin

L'amorceur est synthétisé à partir de l'huile de lin. Son spectre RMN ¹H attribué est présenté **Chapitre 2 partie II**, nous le rappelons ici (Figure 65).

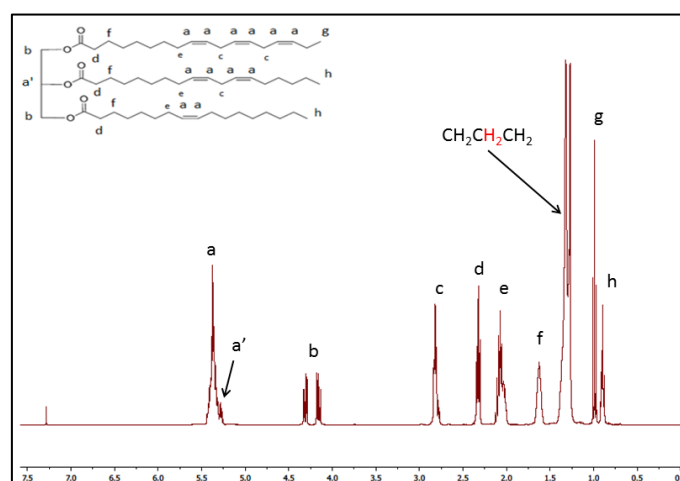


Figure 65 : Spectre RMN ¹H de l'huile de lin (CDCl₃)

Nous allons détailler ici le calcul des insaturations qui commence par le calcul du pourcentage d'insaturations **linoléiques (C18:3)** avec le signal des protons H_g à 1 ppm (intégrale 4,88) : $4,88/3=1,62$ chaînes soit un pourcentage sur les trois chaînes de l'huile de $(1,62/3) * 100=54 \%$.

Le pourcentage d'insaturations **linoléiques (C18:2)** est déterminé avec le signal des protons H_c situé à 2,75 ppm (intégrale 7,37) : $7,37/2=3,69$. Dans les chaînes linoléiques, nous avons ($2*1,62 = 3,24$) soit un reste de $3,69-3,24= 0,45$ chaîne. Le taux d'insaturations linoléiques sur les trois chaînes de l'huile est $(0,45/3) * 100=15 \%$.

Enfin, le pourcentage de chaînes **oléiques (C18:1)** est calculé à partir du signal des protons des insaturations H_{a+a'} à 5,3 ppm (intégrale 13,8 à laquelle on enlève 1 qui correspond au proton H_{a'}) et avec les résultats précédents. Soit x le nombre de chaînes oléiques : $(13,8-1) = 2*x + 4x 0,45 + 6* 1,62$

après résolution x est égal à 0,64 soit un pourcentage sur les trois chaînes de l'huile de $(0,64/3)*100 = 21\%$.

Le pourcentage de **chaînes saturées (C18:0)** restantes est donc $100 - 21 - 15 - 54 = 10\%$.

Le nombre d'insaturations moyen par chaîne est calculée à l'aide de l'équation $\frac{(\int a + a') - 1}{2 * 3}$. Dans le cas de l'huile de lin utilisée, le **nombre moyen d'insaturation par chaîne** est de **2,1**.

Alcool gras

L'huile de lin est réduite en présence d'hydrure d'aluminium (LiAlH_4) en alcools gras comme décrit dans le **chapitre 4 partie III.2.1**.

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (3H, CH_3), 1,2 (14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,5 (4H, HOCH_2CH_2), 2,0 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,5 (2H, HOCH_2), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Amorceur ROMs

L'alcool gras est ensuite mésoylé comme décrit dans le **chapitre 4 partie III.2.1**.

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (3H, CH_3), 1,2 (14H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1,5 (4H, HOCH_2CH_2), 2,0 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,0 (3H, O_3SCH_3), 4,2 (2H, sMOCH_2), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Polymérisation CROP de la MOx par l'amorceur ROMs

La polymérisation à partir de l'amorceur mésoylate a été décrite dans le **chapitre 4 partie III.2.1**.

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,9 (3H, CH_3), 1,0-1,2 (24H, CH_2), 2,1 (45H, $\text{CH}_3 \text{POx}$), 2,7 (2H, $\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}$), 3,4 (62H, $\text{CH}_2 \text{POx}$), 5,3 (4H, $\text{CH}=\text{CH}$).

I.3 Ramifié saturé $\text{C}_{18}(\text{SC}_{12})_2\text{POx}_n$

Alcool gras : $\text{C}_{18:2}\text{OH}$

L'huile de lin est réduite en présence d'hydrure d'aluminium (LiAlH_4) en alcools gras comme décrit dans le **chapitre 4 partie III.2.1**.

Ramification des chaînes grasses par réaction thiol-ène : $\text{C}_{18}(\text{SC}_{12})_2\text{OH}$

L'alcool gras $\text{C}_{18:2}\text{OH}$ (11,8 g, 44 mmol) est dissous dans 150 mL de THF anhydre en présence de dodécane-thiol (53,85 g, 6 éq, 266 mmol) et d'AIBN (1,46 g, 9 mmol, 0,2 éq). Le mélange réactionnel est chauffé à 70 °C pendant 16 heures. Le produit est obtenu avec un rendement de 100 % (Figure 66).

Le taux de ramification est de 92 % en intégrant les protons H_b situés à 2,4 ppm par rapport aux protons H_a situés à 3,5 ppm.

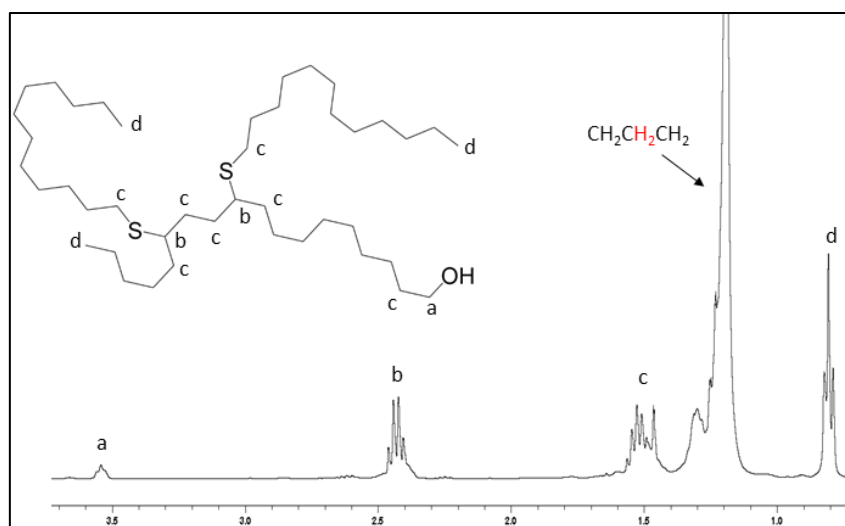


Figure 66 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) de l'alcool gras ramifié

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (9H, CH_3), 1,2 (58H, CH_2), 1,5 (14H, HOCH_2CH_2 , SCH_2 et SCHCH_2), 2,4 (2H, CH_2SCH), 3,5 (2H, HOCH_2).

Amorceur tosylé : $\text{C}_{18}(\text{SC}_{12})_2\text{OTs}$

$\text{C}_{18}(\text{SC}_{12})_2\text{OH}$ (6,3 g, 9 mmol) est solubilisé dans 10 mL de chloroforme anhydre en présence de triéthylamine (2 éq, 1,9 g). Une fois le mélange placé dans un bain de glace, une solution de chlorure de tosyle (1,5 éq, 2,70 g, 14 mmol) dans 10 mL de chloroforme anhydre est ajoutée goutte-à-goutte puis la réaction est laissée sous agitation à 20 °C pendant 16 heures. Les sels sont retirés par filtration et la phase organique est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) puis avec une solution de chlorure de sodium saturée et enfin de l'eau avant d'être concentrée sous vide. Pour retirer l'excès de triéthylamine et de chlorure de tosyle, le produit est solubilisé dans le pentane et purifié sur colonne de silice avec un mélange de pentane/acétate d'éthyle 1/1. Le produit final est ensuite concentré sous vide pour un rendement final de réaction de 71 %. Le spectre RMN du tosylate est présenté Figure 67.

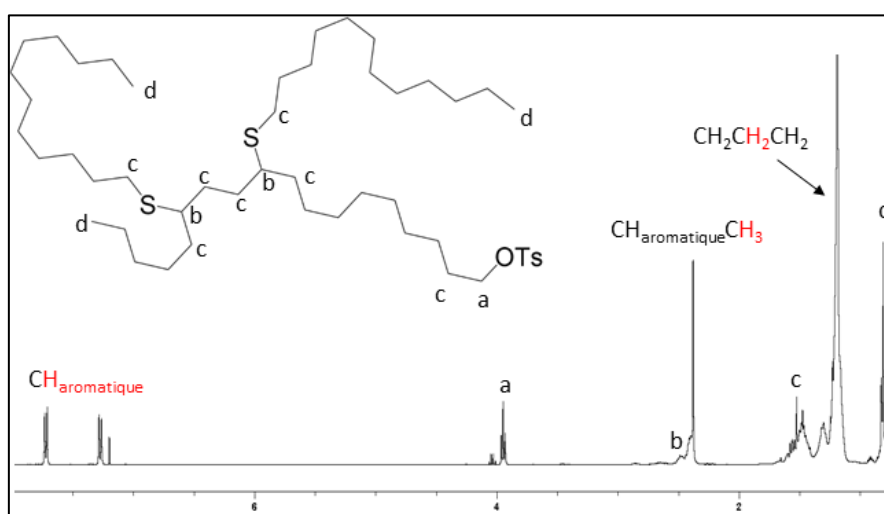


Figure 67 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) du tosylate

RMN ^1H (CDCl_3), δ (ppm) : 0,8-0,9 (9H, CH_3), 1,1-1,3 (58H, CH_2), 1,4-1,7 (14H, $\text{sTOCH}_2\text{CH}_2$, SCH_2 et SCHCH_2), 2,3 (3H, CH_3 tosylate), 2,4 (2H, CH_2SCH), 3,9 (2H, TsOCH_2), 7,3-7,7 (4H, CHaromatique).

Synthèse par CROP du $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$

$C_{18}(SC_{12})_2OTs$ (4 g, 4,9 mmol) et la MOx (15 eq, 6,2 g, 73,5 mmol) sont solubilisés dans le DMF. Un bullage d'azote de quelques minutes est réalisé pour retirer l'oxygène du mélange. La polymérisation microondes est réalisée pendant 30 minutes à 140 °C puis refroidit à 40 °C. La terminaison est effectuée par addition d'une solution d'hydroxyle de potassium dans le méthanol (5 eq, 24,5 mmol, 5 M) et laissé sous agitation à 40 °C pendant 8 heures. Le polymère est obtenu après précipitation dans l'éther et filtration sur papier. Le spectre RMN 1H du $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$ est détaillé Figure 68.

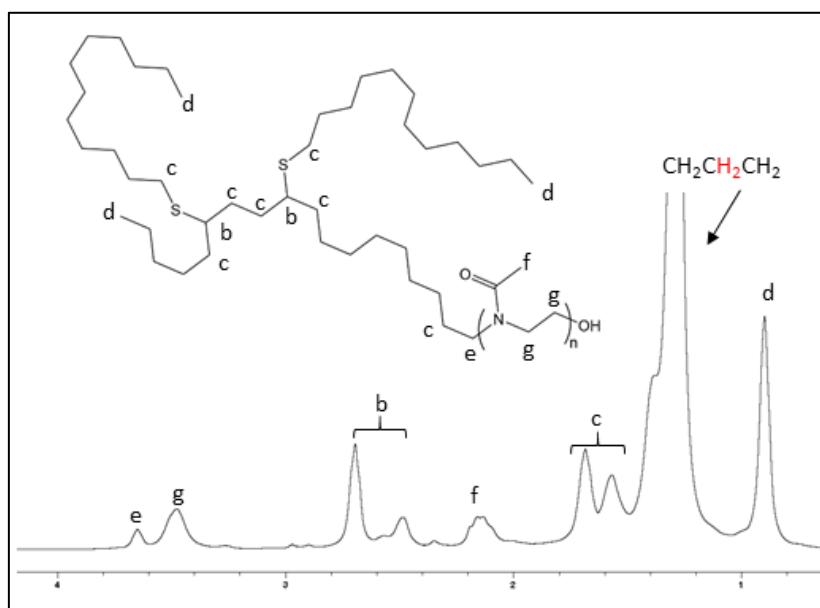


Figure 68 : Spectre RMN 1H ($CDCl_3$) de $C_{18}(SC_{12})_2POx_{15}$

RMN 1H ($CDCl_3$), δ (ppm) : 0,8-0,9 (9H, CH_3), 1,1 (58H, CH_2), 1,5-1,6 (14H, $(POx)CH_2CH_2$, SCH_2CH_2 et $SCHCH_2$), 2,1 (45H, CH_3POx), 2,6 (2H, CH_2SCH), 3,6 (62H, CH_2POx), 3,8 (2H, $(POx)CH_2$).

I.4 Greffage sonde fluorescente

Le greffage de la sonde Alexa 546 NHS sur les POx a été décrit dans le **chapitre 5 partie I.2.1**.

II. Caractérisations des POx

II.1 Détermination de la concentration d'agrégation critique

La mesure de tension de surface pour déterminer la concentration d'agrégation critique (CAC) a été décrit dans le **chapitre 3 partie III.3.3**. La gamme a ensuite été étendue à 2000 mg/L. L'efficacité calculée est égale à la différence entre la valeur de tension de surface obtenue au plateau final et celle du plateau initial.

II.2 Mesure de GPC et viscosité

Les mesures de chromatographie d'exclusion stérique ont été réalisées sur un système composé d'un multi détecteur Varian 390-LC (indice de réfraction stérique, diffusion de lumière et viscosimètre), d'une colonne de garde (Agilent PoLarGel L 8 μ M, 50 \times 7,5 mm) et de deux colonnes PolarGel L (Agilent 5 μ M, 300 \times 7,5 mm) et la phase mobile utilisée est le DMF à 1 % en chlorure de lithium. Le POx testé est solubilisé dans le DMF à 0,1 % de chlorure de lithium à une concentration de 5 mg/L puis passée sur un filtre PTFE à 0,2 μ m ; le volume de solution POx injecté est de 100 μ L. L'analyse est effectuée dans les conditions suivantes : deux colonnes PL-gel mix C ont été utilisées à 40 °C à un débit de 0,8 mL min⁻¹ de solvant DMF (0,1% de LiCl). Les résultats obtenus sont calibrés avec le standard des poly(méthacrylate de méthyle) (1010-68000 g mol⁻¹) en utilisant le logiciel Cirrus V3.3.

Les mesures de viscosité présentées dans le chapitre 4 partie II.2. ont été réalisées sur un rhéomètre de type cône-plan (MCR302, Anton Paar, Autriche) à 25 °C à la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma} = 2$ à 8 s⁻¹.

III. Nanoformulations et caractérisations

III.1 Nanoformulations

III.1.1 Nanoémulsions

Deux phases sont préparées séparément, la phase aqueuse, composée du POx et de l'eau et la phase lipophile constituée du Plurol[®], de l'huile et de la quercétine. Les deux phases sont chauffées à 60 °C jusqu'à solubilisation complète des constituants puis la phase aqueuse est transvasée dans la phase lipophile. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un mini-turrax (Polytron[®] avec l'embout PT-DA 03/2Ef-E050) à vitesse maximale (2 m/s) pendant 15 minutes. La taille des gouttelettes est ensuite réduite par 5 cycles à 12 000 PSI dans l'homogénéisateur à haute pression (HHP) (Microfluidics LV1, USA).

III.1.2 Micelles mixtes

Le protocole de formulation des micelles mixtes a été présenté dans le **chapitre 3 partie III.3.4**.

III.1.3 Nanocapsules lipidiques

Le protocole de formulation des micelles mixtes a été décrit dans le **chapitre 3 partie IV.2.1**.

III.2 Caractérisations physico-chimiques des nanoformulations

L'ensemble des caractérisations physico-chimiques : distribution en taille, encapsulation, stabilité, activité antioxydante a été détaillé dans le **chapitre 3 dans les parties III.3.5 à III.3.11**.

IV. Culture cellulaire

IV.1 Repiquage

Plusieurs types cellulaires ont été étudiés au cours de ces travaux de thèse : les fibroblastes murins (NIH3T3) dont les conditions de culture sont développées dans le **chapitre 3 partie III.3.12**, les kératinocytes humains primaires (NHEK) détaillées dans le **chapitre 3 partie IV.2.9**, les kératinocytes

humains immortalisés (HaCaT), les mélanocytes et les fibroblastes humains dans le **chapitre 5 partie I.2.4**.

IV.2 Tests de viabilité cellulaire

Deux types de tests de viabilité cellulaire ont été menés dont les protocoles sont expliqués **chapitre 3 partie III.3.13** : (i) pour évaluer la cytotoxicité sur une gamme de concentration de POx et (ii) pour déterminer la viabilité cellulaire en présence de quercétine seule en solution et ensuite formulée pour définir la concentration en quercétine optimale pour les tests antioxydants. Ainsi, les tests de viabilité cellulaire ont été effectués sur la quercétine, les formulations vides et chargées.

IV.3 Tests antioxydant cellulaires

Le premier test antioxydant sur les fibroblastes murins utilisant les peroxydes comme source de radicaux a été développé **chapitre 3 partie III.3.14**. Le deuxième a été mis en œuvre sur des kératinocytes humains utilisant les rayonnements UV comme source de radicaux, **chapitre 3 partie IV.2.12**.

IV.4 Analyse statistique

Le traitement statistique de chaque test cellulaire a été mené avec le logiciel OriginPro comme présenté dans le **chapitre 3 partie III.3.15 et partie IV.2.13**.

V. Etude des interactions de surface

Les protocoles de détermination des interactions de surface par mesure d'angle de contact sont expliqués dans le **chapitre 4 des parties III.2.4 à III.2.7**.

VI. Etude de pénétration

VI.1 GUV

L'élaboration des GUV par électroformation et les observations d'insertion sont décrites dans le **chapitre 5 partie I.2.3**.

VI.2 Cellules humaines

La culture cellulaire et l'observation de l'insertion des POx dans les cellules humaines sont détaillées dans le **chapitre 5 des parties I.2.4 à I.2.6**.

VI.3 Oreilles de souris

L'expérimentation animale avec l'observation *in vivo* des oreilles de souris au microscope multiphotons ainsi que l'étude histologique sont expliquées dans le **chapitre 5 partie I.2.7 et I.2.8**.

VI.4 Peau humaine

VI.4.1 Caractéristiques des explants de peau humaine

Les explants de peau humaine ont été fournis par l'entreprise Genoskin® (Toulouse, France) dans le respect de l'éthique et de la loi française L.1245 CSP suite à des chirurgies. Nous avons choisi de travailler avec des explants *NativeSkin*®, comprenant l'épiderme et le derme, d'une surface de 1,13 cm² et d'un diamètre de 15 mm. Les explants provenaient de 3 donneurs différents suite à des abdominoplasties. Les donneurs pouvaient être de sexe, d'âge et de phototypes différents mais devaient avoir une peau saine. Les caractéristiques des 3 donneurs sont présentées chapitre 5 partie II.

Genoskin® a livré pour chaque commande 12 explants (entourés par un anneau en silicone et maintenus dans un insert comprenant une matrice de collagène) ainsi que les milieux de culture à renouveler tous les jours pour leur maintien en survie (Figure 69). Leur transport s'effectue dans des boîtes hermétiques, à température ambiante, où ils sont placés dans des plaques 12 puits contenant 2 mL de milieu. Après réception, le milieu de culture doit être changé et les explants être placés au moins une heure dans un incubateur à 37 °C, 5% CO₂ et 100% d'humidité relative. La durée maximale de maintien en culture sans dégradation de l'explant est de 7 jours. Après chaque livraison, Genoskin® a fourni un certificat de lot confirmant l'origine, l'état de santé du patient et une validation histologique de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme des explants reçus.

VI.4.2 Dépôt des solutions POx et nanoformulations POx

Les solutions testées étaient déposées sur les explants à J0 après l'heure d'incubation. La quantité de solution, choisie sur recommandation de Genoskin®, correspond au volume de solution nécessaire pour recouvrir la surface de l'explant soit 45 µL. Trois modes de dépôt ont été évalués : le dépôt simple de goutte, par patch avec un papier filtre de 8 mm (Smart Praticce, USA) et le massage. L'application par massage équivaut à 30 secondes de rotation par un doigt ganté sur l'explant.



Figure 69 : Photographie d'explants après dépôts simples des solutions testées

Les explants sont ensuite placés dans l'incubateur à 37 °C, 5% CO₂ et 100% d'humidité relative. Plusieurs temps d'incubation ont été testés : 6, 24 et 48 heures avec renouvellement des milieux de culture.

VI.4.3 Fixation et congélation des explants

Après incubation, les explants sont rincés trois fois avec du tampon PBS sous brève agitation circulaire puis la matrice collagène et l'anneau en silicone sont retirés. Une solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS est ajoutée pour fixer les explants à 5 mL/puit, suivi d'une nuit au réfrigérateur à 4 °C. Après retrait de la solution de fixation, trois rinçages au tampon PBS avec 20 minutes d'agitation circulaire ont été réalisés. Les explants étaient ensuite immergés dans une solution de sucrose à 30 % à 5 mL/puit et placés au réfrigérateur à 4 °C.

La suite du protocole a été exécutée au sein de l'institut des neurosciences de Montpellier grâce à une collaboration avec Mme Chantal Ripoll.

Les explants ont été retirés de la solution de sucrose 30% et séchés délicatement avec des lingettes (Kimtech Science®) sans appuyer directement sur les tissus. Les peaux étaient ensuite placées dans des moules et remplis de solution OCT (milieu d'enrobage cryogénique) pour une congélation dans l'isopentane à -80 °C.

VI.4.4 Découpe, marquage des noyaux, montage sur lames et observation

Les explants ont été coupés à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050) à -21 °C avec un angle de découpe de 5° sur une épaisseur de 16 µm. Les coupes étaient déposées par capillarité sur des lames chargées de type Superfrost® Plus (ThermoFisher Scientific, dimensions 25*75*1 mm) à hauteur de trois coupes par lame.

Les noyaux ont été marqués par une solution de la sonde fluorescente DAPI diluée au 10 000^e dans du tampon PBS. 500 µL de solution étaient déposées sur chaque coupe et incubés pendant 10 minutes dans le noir. Les lames étaient ensuite rincées avec du tampon PBS.

La fixation des coupes a été possible grâce à une solution de montage Fluoromount-G® (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Après dépôt de quelques gouttes de solution, une lamelle en verre (Menzel-Gläser, dimensions 24*5 mm) était ajoutée par-dessus. Les lames étaient disposées dans un réfrigérateur à 4 °C pendant 12 heures pour assurer fixation des lames par réticulation du milieu de montage.

Les lames ont été observées avec le microscope à épifluorescence Leica Thunder de la plateforme Montpellier Ressources Imagerie. L'observation a été réalisée avec les filtres de fluorescence DAPI (λ_{ex} 360/40 et λ_{em} 470/40, temps d'exposition 100 ms), filtre GFP (λ_{ex} 470/40 et λ_{em} 525/50, temps d'exposition 50 ms), filtre Cy 3 (λ_{ex} 546/10 et λ_{em} 585/40, temps d'exposition 500 ms), filtre Cy5 (λ_{ex} 620/60, λ_{em} 700/75, temps d'exposition 200 ms) et en lumière blanche (temps d'exposition 50 ms) aux objectifs x10 et x20.

Conclusion

Actuellement, le poly(éthylène glycol) (PEG) est le polymère *gold standard* pour les formulations à usage thérapeutique ou cosmétique [1]. La contrepartie est une surconsommation qui engendre de nombreux problèmes tels qu'une bioaccumulation [1], une hypersensibilité cutanée [2], la production d'anticorps PEG [3], le « *PEG dilemma* » [4] et conduit à une diminution de l'efficacité des formulations. Il est nécessaire de trouver à des alternatives au PEG.

Une alternative de choix parmi les polymères hydrophiles est les polyoxazolines (POx) qui ont des propriétés proches de celles du PEG en terme de biocompatibilité, furtivité, dégradation, tout en répondant aux problèmes de cytocompatibilité, immunogénicité, *PEG dilemma* et de bioaccumulation. Les POx offrent l'avantage supplémentaire d'être facilement fonctionnalisables avec des longueurs de chaîne pré-programmables et ceci grâce un temps de polymérisation réduit par un procédé micro-ondes [5]. Les trois sites de fonctionnalisation des POx se font *via* l'amorceur, le monomère et l'agent de terminaison. Ils ouvrent alors de multiples possibilités de composition (polymères amphiphiles, doubles hydrophiles...) et d'architectures (linéaire, ramifiée). Les POx ont déjà suscité l'intérêt de la recherche pharmaceutique pour des formulations en injection sous cutanée [6] et en IV [7] mais ils n'ont jamais été utilisés pour la voie topique où de nouvelles formulations améliorant le passage de la barrière du *stratum corneum* doivent être développées. Ces travaux de thèse ont donc visé à promouvoir le potentiel des POx pour optimiser la délivrance cutanée d'actifs thérapeutiques.

Dans le cadre de cette recherche ont été étudiés des **polyoxazolines amphiphiles** possédant différentes chaînes alkyle de type lipidique : $C_{16}POx_n$, $C_{18:2}POx_n$ et $C_{18}(SC_{12})_2POx_n$ avec pour chacun, deux DP_n (15 et 35). La chaîne alkyle a été introduite par l'amorceur de la polymérisation qui est soit commercial (C_{16}) soit d'origine biosourcée (huile de lin). L'étude des propriétés physico-chimiques des POx à l'interface air/liquide a mis en évidence leur caractère tensioactif avec une effectivité située entre 20 et 34 mN/m et une CAC d'environ 100 mg/L. L'auto-assemblage des POx en solution reste mal défini et est identifié comme un point d'amélioration de ces travaux. Toutefois, les différences d'architecture macromoléculaire (nature de la chaîne alkyle et DP_n) ne semblent pas impacter la valeur de la CAC.

Les POx amphiphiles ont permis de mettre au point des **nanoformulations** lipidiques stables, de structures et de compositions variées, répondant au cahier des charges. Le choix des nanoformulations lipidiques s'est basé sur des études précédentes réalisées au laboratoire démontrant un fort potentiel pour ce type d'application. Ainsi, des nanoémulsions à base d'huile de ricin stabilisées par des POx (100 nm), des micelles mixtes (MM) de phospholipides/POx (20 nm) et des nanocapsules lipidiques (LNC) (30 nm) composées d'un cœur huileux entouré d'une coque rigide de phospholipides et d'une couronne de POx ont été élaborées.

Dans le cadre de la lutte contre le vieillissement prématuré de la peau favorisant *in fine* l'apparition de cancers cutanés, un antioxydant, la **quercétine**, a été encapsulé dans les nanoformulations POx. L'objectif était de délivrer cet antioxydant dans les couches de l'épiderme viable pour neutraliser les radicaux libres présents en excès dû en partie au stress oxydatif généré par des sources environnementales : radiations UV, pollution, tabac. Les MM et les LNC ont permis de solubiliser la

quercétine à un taux de chargement satisfaisant (3,6 et 7,9 %) pour assurer une action efficace. Une fois formulée, l'activité antioxydante de la quercétine est maintenue et une capacité à diminuer les radicaux *in vitro* a été observée sur fibroblastes murin de 42 % pour les MM et 30 % pour les LNC (pour une même concentration en quercétine à 5 µg/mL). De plus, une comparaison entre les LNC POx et les LNC PEG a montré la possibilité de substituer les PEG par les POx en formulation.

L'évaluation de l'intérêt des POx pour une application pour la voie topique a été menée graduellement sur différents modèles afin de définir tout d'abord les interactions de surface entre les POx et la peau et ensuite évaluer leur pénétration cutanée. Alors que l'étude des POx C₁₆POx₁₅ et C_{18:2}POx₁₅ en solution avait mis en évidence un effet de concentration avec un étalement spontané à 0,5 g/L, l'analyse des **interactions physico-chimiques de surface** entre le film résiduel formé par les nanoformulations POx et la surface d'un modèle mimant la peau a démontré une affinité significative, permettant un bon étalement, principalement due aux phospholipides et peu aux POx. Une cinétique d'interaction plus rapide avec le POx saturé C₁₆POx₁₅ qu'avec le C_{18:2}POx₁₅ (en MM ou en LNC) a été mise en évidence avec l'étalement de goutte spontané, pouvant provenir d'une plus grande flexibilité de chaîne des POx saturés.

Cette modification de comportement selon la chaîne hydrophobe a aussi été mise en évidence lors des études *in vitro* avec plusieurs lignées cellulaires. L'évaluation de la **viabilité cellulaire sur les fibroblastes** a particulièrement mis en lumière la différence entre C₁₆POx₁₅ et C_{18:2}POx₁₅ avec une viabilité 40 fois plus élevée pour les C_{18:2}POx₁₅ ; ceux-ci présentant une valeur d'IC₅₀ de 20,42 g/L contre 0,47 g/L pour les C₁₆POx₁₅. Cette différence a été ensuite confirmée par l'étude d'insertion des POx dans les membranes lipidiques par suivi de fluorescence de la sonde Alexa greffée à l'extrémité du POx. Le C₁₆POx₁₅ a été capable de s'insérer immédiatement dans des **membranes lipidiques simples** (GUV) et **plus complexes** (cellules humaines) alors qu'aucune interaction avec le C_{18:2}POx₁₅ n'a pu être observée dans les mêmes conditions. L'évaluation *in vivo* de la **pénétration sur oreille de souris** a montré, quant à elle, une pénétration dans les tissus et un passage à travers la barrière du *stratum corneum* pour atteindre l'épiderme viable quelle que soit la structure du POx. Ainsi, il semblerait que la nature de la chaîne alkyle du POx n'induit aucune différence en terme de pénétration membranaire, outre un faible effet cinétique. Il sera donc plus intéressant de travailler avec le C_{18:2}POx_n dont l'impact sur la viabilité cellulaire est plus faible. L'étude *in vivo* menée ensuite avec les MM et les LNC chargées en quercétine ayant montré la délivrance topique d'antioxydant dans les couches de l'épiderme viable de la souris, la dernière étape consistait à valider ce résultat sur **explants de peau humaine** en utilisant la même méthode de suivi de fluorescence associée à une étude histologique. Dans ces conditions, les POx seuls ont réussi à pénétrer le *stratum corneum* car le suivi des LNC n'a pas été possible à cause des signaux de fluorescence trop faibles. Cette étape constitue également un point d'amélioration qui pourrait être relevé en travaillant à plus grande concentration en sonde fluorescente ou avec un autre type sonde. En effet, il est possible qu'une faible quantité de POx ait atteint l'épiderme mais qu'elle n'ait pas pu être détectée par la méthode de fluorescence mise en œuvre. L'ensemble des modèles membranaires développés au cours de ce projet nous permet cependant de conclure à une capacité de pénétration des POx et des formulations étudiées.

En **conclusion**, trois POx amphiphiles avec des chaînes alkyle lipidiques variées ont pu être synthétisés. La cytocompatibilité de ces nouvelles architectures macromoléculaires a été validée. Deux nanoformulations de POx, micelles mixtes et nanocapsules lipidiques, ont pu être développées et

répondre au cahier des charges : stabilité, taux de chargement et activité antioxydante de la quercétine encapsulée pour une application topique. Ces nanoformulations permettent de modifier les propriétés physico-chimiques de surface en augmentant leur affinité avec le modèle de peau et leur étalement. La délivrance topique de quercétine ayant été démontrée *in vivo* sur oreille de souris. Le potentiel des POx comme alternatives aux PEG a donc été prouvé tant au niveau de la formulation, de la viabilité cellulaire que de la pénétration lors de ces travaux de recherche.

Certains **points d'amélioration** ont été identifiés, notamment le manque de compréhension du comportement des POx à l'interface air/liquide. Une meilleure connaissance de ce phénomène pourrait permettre l'élaboration de nano-objets de morphologie originale, complexe et de nouvelles formulations par un procédé à faible énergie et donc plus facilement industrialisable. Le suivi de pénétration des formulations dans les tissus par fluorescence peut aussi être amélioré par l'augmentation de la concentration des POx greffés et de la sonde fluorescente encapsulée pour finaliser l'évaluation de la pénétration. La mise en place d'une étude sur cellule de Franz dans le cadre d'un nouveau contrat InterCarnot permettra une analyse quantitative de la délivrance topique de la quercétine avec une réponse précise (dosage HPLC) et une comparaison détaillée avec la littérature. La transposition de la synthèse des POx à l'échelle industrielle semble encore compliquée du fait de l'utilisation de solvants organiques toxiques (acétonitrile ou DMF). Il a toutefois été récemment démontré que les POx peuvent être synthétisés dans l'acétate d'éthyle, solvant moins toxique, sans perte de contrôle des masses ouvrant ainsi vers de nouvelles possibilités [8]. De plus, des entreprises travaillent déjà sur les POx comme dans le domaine biomédical. Par exemple, la société américaine *Serina Therapeutics*[®] développe des traitements contre la maladie de Parkinson. Plus en amont de la filière, une *start up* émergente de l'Université de Ghent et du Prof. R. Hoogenboom propose la commercialisation de POx parfaitement définis et fonctionnalisés sous l'appellation *Ultroxa*[®]. Enfin, le fournisseur d'excipients *CoastSouthWest*[®] a très récemment ajouté dans son catalogue le poly(2-éthyl-2-oxazoline) sous le nom Endicare DP-530S. Il positionne le PEtOx comme alternative au PVP et PVOH dans des gels capillaires.

D'autres **perspectives** de développement pour les POx peuvent aussi être envisagées avec d'autres voies d'administration. En effet, ces travaux de recherche étaient orientés vers la voie topique mais des applications peuvent tout à fait être développées avec la voie intraveineuse. Les LNC POx peuvent par exemple, être injectées par **voie IV** puisque le caractère furtif et non immunogénique des POx a été prouvé. Elles constituent une parfaite alternative aux LNC PEG déjà utilisées pour cette voie. Les **voies nasales et pulmonaires** peuvent également être considérées compte tenu du comportement des POx à la surface de la peau et de leur capacité d'insertion dans les bicouches lipidiques. Les POx peuvent interagir avec la surface et s'insérer dans les muqueuses bronchiques ou nasales *via* leur chaîne alkyle voire, un groupement spécifique ajoutés lors de leur synthèse permettant de cibler spécifiquement les tissus. De plus, les nanoformulations POx ont montré leur capacité à modifier les interactions physico-chimiques de surface pour favoriser leur étalement. Elles peuvent ainsi s'adsorber sur les muqueuses et assurer une délivrance prolongée des principes actifs comme par exemple, les LNC POx qui par leur rigidité maintiennent leur intégrité et sont de précieux réservoirs d'actifs. De nombreuses applications peuvent encore être envisagées avec les POx ouvrant la porte à de nouvelles recherches prometteuses.

Références

1. Knop, K., et al., *Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives*. Angewandte Chemie International Edition, 2010. 49(36): p. 6288-6308.
2. Fisher, A.A., *Immediate and delayed allergic contact reactions to polyethylene glycol*. Contact Dermatitis, 1978. 4(3): p. 135-138.
3. Zhang, P., et al., *Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation*. Journal of Controlled Release, 2016. 244: p. 184-193.
4. Chen, Y., et al., *Intein-mediated site-specific synthesis of tumor-targeting protein delivery system: Turning PEG dilemma into prodrug-like feature*. Biomaterials, 2017. 116: p. 57-68.
5. Wiesbrock, F., R. Hoogenboom, and U.S. Schubert, *Microwave-Assisted Polymer Synthesis: State-of-the-Art and Future Perspectives*. Macromolecular Rapid Communications, 2004. 25(20): p. 1739-1764.
6. Harris, J.M., et al., *Tuning drug release from polyoxazoline-drug conjugates*. European Polymer Journal, 2019. 120: p. 109241.
7. He, Z., et al., *A high capacity polymeric micelle of paclitaxel: Implication of high dose drug therapy to safety and in vivo anti-cancer activity*. Biomaterials, 2016. 101: p. 296-309.
8. Vergaelen, M., et al., *Ethyl acetate as solvent for the synthesis of poly(2-ethyl-2-oxazoline)*. Green Chemistry, 2020. 22(5): p. 1747-1753.

Conception de nanoformulations innovantes à base de polyoxazoline pour la délivrance cutanée d'antioxydants

La peau, principale barrière protectrice face à l'extérieur, est de plus en plus agressée par des sources environnementales (UV, pollution, tabac...). Ces agressions génèrent une surproduction de radicaux libres qui conduit au vieillissement prématuré de la peau et augmente le risque de cancers cutanés. L'objectif de ces travaux de thèse est de neutraliser l'excès de radicaux dans l'épiderme par la délivrance topique d'antioxydants tels que la quercétine *via* l'élaboration de nanoformulations à base de polyoxazolines. Ces polyoxazolines amphiphiles sont une alternative intéressante au poly(éthylène glycol) dont l'utilisation accrue induit des problèmes de santé chez l'homme. Plusieurs architectures macromoléculaires de polyoxazolines ont été synthétisées et deux nanoformulations innovantes ont été mises au point : micelles mixtes et nanocapsules lipidiques. Ces formulations présentent une grande stabilité, un bon taux de chargement et maintiennent l'activité antioxydante de la quercétine encapsulée. La pénétration cutanée des polyoxazolines seuls et formulés a été étudiée sur plusieurs modèles de peau (GUV, modèle non biologique, oreille de souris, explant de peau humaine). Nous avons montré que ces nanoformulations sont capables de modifier les propriétés physico-chimiques de surface du modèle de peau non biologique en favorisant leurs étalements. Les polymères quant à eux ont démontré une capacité de pénétration dans les couches lipidiques de modèles de membranes simples à plus complexes et *in vivo* sur oreille de souris. En conclusion, les polyoxazolines peuvent substituer le poly(éthylène glycol) dans les formulations et permettre la délivrance topique d'antioxydants dans l'épiderme de souris, ouvrant ainsi la voie vers des applications cutanées pour traiter des pathologies comme les mélanomes ou même le psoriasis.

Mots clés : délivrance topique, polyoxazoline, nanoformulation, antioxydant, nanocapsule lipidique, interactions physico-chimiques de surface

Design of innovative nanoformulations based on polyoxazoline for topical delivery of antioxidants

The human skin, considered as the main barrier from the outside, is more and more assaulted by environmental sources (UV, pollutants, tobacco...). These aggressions over generate free radicals within the skin then leading to skin aging and potentially skin cancer. Therefore, nanoformulations based on polyoxazolines for topical delivery of antioxidants were investigated in order to quench the excess of free radicals located in the epidermis. As a side objective, this research project intends to demonstrate the potential of amphiphilic polyoxazolines in formulation as an alternative to poly(ethylene glycol), which overuse has led to clinical awareness. Various macromolecular architectures of polyoxazolines were synthesized and two main nanoformulations were elaborated: mixed micelles and lipid nanocapsules. These last showed a high stability overtime, a good drug loading and maintained the antioxidant activity of the encapsulated quercetin. The skin penetration study of polyoxazolines and polyoxazolines based formulations was conducted on various skin models (GUV, nonbiological skin model, mice ears, human skin explants). Nanoformulations were able to modify physicochemical skin surface properties to enhance their spreading and polyoxazolines penetrated from simple to complex lipids membranes and *in vivo* in mice skin. As a conclusion, polyoxazolines were proved to be an excellent alternative to poly(ethylene glycol) overuse for designing formulations and show promise for delivering topically antioxidants into epidermis creating new possibilities for skin treatment such as psoriasis or melanomas.

Key words: topical delivery, polyoxazoline, nanoformulation, antioxidant, lipid nanocapsule, surface physicochemical interactions