



HAL
open science

Conception, synthèse et caractérisation de matrices hydrogels résistants à la compression pour la libération de principes actifs hydrophobes

Claire Desfrancois

► **To cite this version:**

Claire Desfrancois. Conception, synthèse et caractérisation de matrices hydrogels résistants à la compression pour la libération de principes actifs hydrophobes. Polymères. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2020. Français. NNT : 2020GRALV052 . tel-03246559

HAL Id: tel-03246559

<https://theses.hal.science/tel-03246559v1>

Submitted on 2 Jun 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'UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Sciences des polymères**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Claire DESFRANCOIS

Thèse dirigée par Isabelle **TEXIER-NOGUES** et
codirigée par Rachel **AUZELY-VELTY**

préparée au sein du CEA-Leti et du CERMAV
dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Conception, synthèse et caractérisation de matrices hydrogels résistantes à la compression pour la libération de principes actifs hydrophobes

Thèse soutenue publiquement le 6 novembre 2020
devant le jury composé de :

Monsieur Didier BOTURYN

Directeur de Recherche CNRS, Université Grenoble Alpes, Grenoble,
Président du Jury

Madame Catherine LADAVIERE

Directrice de Recherche CNRS, Université Lyon 1, Lyon, Rapporteur

Monsieur Joël LYSKAWA

Maître de Conférence, Université de Lille, Lille, Rapporteur

Monsieur Nicolas TSAPIS

Directeur de Recherche CNRS, Institut Galien-Paris Saclay, Université
Paris-Saclay, Examineur

Madame Rachel AUZELY-VELTY

Professeur CNRS, CERMAV, Grenoble, co-Directrice de thèse

Madame Isabelle TEXIER-NOGUES

Ingénieur Chercheur CEA, Grenoble, Directrice de thèse



Abstract

The local and sustained delivery of a drug of interest requires the use of a conformable support matrix, able to adjust to patient daily movements. This matrix should be biocompatible, resistant, and should show suitable compressive and stretchable properties. New composite materials for the delivery of hydrophobic active pharmaceutical ingredients (API) have been designed from stretchable hydrogels and lipid nanoparticles able to encapsulate high payloads of hydrophobic drugs. The double encapsulation system – API-loaded lipid nanoparticles embedded in a polymer network with stretchable meshes – could achieve finely-tuned control over drug delivery while improving patient compliance. First, water-soluble polyrotaxanes (PR) were synthesised with a controlled number of threaded cyclodextrins thanks to an original method. These PR were further used as cross-linkers in a photo-crosslinked network of poly(ethylene glycol)-methacrylate. This novel polymeric matrix showed increased compressive properties as demonstrated by mechanical tests. In parallel, new formulations of lipid nanoparticles loaded with two API of interest and their drug release profile were studied, for further inclusion in the stretchable hydrogel matrix.

Résumé

La délivrance locale et prolongée d'un principe actif (PA) ne peut être pleinement efficace sans matrice de libération conformable pour s'adapter aux mouvements du patient imposés par sa vie quotidienne. Cette matrice doit donc être biocompatible, résistante à la fatigue, et présenter des propriétés mécaniques adéquates (résistance à la compression, étirabilité). De nouveaux matériaux composites capables de délivrer des principes actifs hydrophobes ont été conçus à partir de matrices hydrogels résistantes à la compression et de nanoparticules lipidiques encapsulant les molécules hydrophobes. Ce système de double encapsulation du PA dans un réseau avec des mailles étirables permettrait d'assurer un contrôle fin sur sa libération tout en améliorant le confort du patient. Nous avons d'abord synthétisé et caractérisé des polyrotaxanes (PR) solubles dans l'eau grâce à une méthode originale contrôlant le nombre de cyclodextrines enfilées. Ces PR ont ensuite été utilisés comme agents de réticulation dans un réseau de poly(éthylène glycol)-methacrylate photo-réticulé pour obtenir une matrice hydrogel dont les propriétés de résistance à la compression ont été mises en évidence par des essais mécaniques. Un travail parallèle sur la formulation de nanoparticules lipidiques encapsulant deux molécules d'intérêt et leur profil de libération du PA a été mené pour leur inclusion dans les matrices hydrogels.

Remerciements

Ces trois années de thèse auront été l'occasion de nombreuses rencontres, au sein du L2CB au CEA, du CERMAV et au travers de toutes les autres opportunités de partage. Toutes ces personnes ont contribué, directement ou indirectement, à ces travaux et je souhaite sincèrement les en remercier.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes deux directrices de thèse, Rachel et Isabelle, pour la confiance, le soutien et les conseils prodigués ces trois dernières années. Votre complémentarité professionnelle a été un grand atout dans la poursuite du projet scientifique, et a facilité l'organisation de la thèse entre les deux laboratoires. En outre, un grand merci pour la liberté que vous m'avez toujours laissée dans la gestion de mon temps de travail, me permettant de mener de front la thèse et mes nombreux projets dans la photo et la musique.

Merci également à Glyco@Alps pour avoir financé ces travaux mais aussi à Severine Vignoux et Anne Imberty pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leurs laboratoires.

J'adresse ensuite mes remerciements aux membres du jury : Mme. Catherine Ladavière, Mr. Didier Boturyn, Mr. Nicolas Tsapis et Mr. Joël Lyskawa pour l'intérêt qu'ils portent à l'égard de ces travaux de thèse.

Un énorme merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail. Merci tout d'abord à Isabelle Jeacomine pour ta disponibilité et ton aide précieuse avec la RMN. Merci également à Emilie Perroux, Marie Escudé, Dorothee Jary, Dominique Lauro et tous mes collègues de la travée 105 pour votre aide lors du travail sur les lipidots et pour votre soutien lors des galères d'UPLC et d'HPLC. Merci à Denis Mariolle, Daphna Fenel et l'équipe de CLIO pour votre aide remarquable pour obtenir des images de microscopie et dans la réalisation des manips de spectrométrie de masse.

Une pensée toute spéciale pour les collègues brésiliennes, Renata Lopez et Raquel Petrilli en tête, qui m'ont chaleureusement accueillie pendant un mois à Ribeirao Preto dans leur laboratoire pour m'initier aux techniques de tests de diffusion sur cellules de Franz. J'ai été très touchée par le superbe accueil que vous m'avez réservé, merci à toute l'équipe pour votre bonne humeur et votre disponibilité. Merci également à Cliene Labre pour les images de microscopie réalisées sur place.

Un grand merci à Alba Marcellan pour ces conseils et idées dans le travail sur les propriétés mécaniques des gels. Ces discussions ont grandement contribué au recul et à l'angle pris par ce chapitre 3.

Enfin, je terminerai ces remerciements par mes collègues et proches.

Merci aux ami.e.s de l'équipe SMP: Simon, Maxime, Moustoifa, Vanina, Marie-Carole, Cornélia, Raphael, Samuel, Robin, Marlène, Tamiris, Mr Ficus et Jean-Michel Rota' pour toutes nos discussions scientifiques ou non, nos moments en dehors du laboratoire, nos batailles pour les choix de musique dans le laboratoire, nos concours et paris en tout genre et votre soutien dans les moments plus difficiles. Merci également à mes acolytes de montagne et d'escalade de l'équipe glycomat' : Axel, Maeva et Fabien.

Merci aux doctorants et collègues du CEA et en particulier à Mathilde, Prisca, Clémentine, Juliette et Morgane.

Merci, également, aux copains de la musique et de la photo de Grenoble, Valence, Lyon et Paris qui m'ont régulièrement entendus râler contre les aléas de la thèse, qui m'ont permis de décrocher de la science le temps d'un concert ou d'un festival, et d'être de tous ces plans et projets improbables à l'autre bout de la France. Un énorme merci à la team Rasta parisienne et plus particulièrement Béné', pour nos discussions interminables, nos chouettes sorties et nos retrouvailles dans le Vercors.

Un grand merci à Gustave pour ces dernières semaines. Ton soutien et ta présence sur cette fin de thèse auront été inestimables.

Enfin, merci à mes parents, ma sœur, mon frère et ma famille plus généralement de me soutenir au quotidien. Tout cela n'aurait pas été possible sans vous.

Plan général

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Problématique : La délivrance transdermique d'un principe actif hydrophobe depuis une matrice hydrogel étirable	1
1.1. Contexte : besoins liés au traitement des maladies inflammatoires articulaires chroniques.....	4
1.2. Les patchs transdermiques pour la délivrance de principe actifs hydrophobes.....	7
1.2.1. Les patchs transdermiques : généralités.....	7
1.2.2. Lipid nanoparticles-hydrogel composites for drug delivery: a review (Desfrancois & al., <i>Pharmaceuticals</i> 2018 , 11, 118) : article.....	11
1.3. Hydrogels étirables pour les patchs transdermiques	43
1.3.1 Améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels	44
1.3.2 Les polyrotaxanes.....	48
1.3.3 Déclencher la libération du PA par stimulus mécanique.....	56
1.4. Conclusion	60
Références	62
Chapitre 2 : Synthèse <i>one-pot</i> de polyrotaxanes solubles dans l'eau avec un nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées	67
2.1. Contexte.....	69
2.1.1. Objectifs.....	69
2.1.2. Approche : une synthèse <i>one-pot</i> de polyrotaxanes solubles dans l'eau avec un nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées.....	70
2.2. Résultats.....	72
2.2.1. Synthèses des β -cyclodextrines modifiées avec groupements acides carboxyliques.....	72
2.2.2. Functionalizing β -cyclodextrins: a simple strategy to control their threading during polyrotaxane formation: article	77
2.2.3. Résultats complémentaires	109
2.3. Conclusion.....	112
Références	113

Chapitre 3 : Synthèse d'hydrogels hybrides incluant des polyrotaxanes-méthacrylates et caractérisation de leur comportement sous contrainte mécanique	114
3.1. Contexte.....	116
3.1.1. Objectifs.....	116
3.2. Résultats.....	121
3.2.1. Synthèse d'un polyrotaxane avec des stoppeurs à base de cyclodextrines méthylées.....	121
3.2.2. Synthèse d'un polyrotaxane-méthacrylate ((PR-(MA) _{2.4} , 4'')	122
3.2.3. Formation des hydrogels.....	122
3.2.4. Caractérisations mécaniques par tests de compression uni-axiale .	128
3.3. Conclusion.....	137
3.4. Références	138
Chapitre 4 : Les particules lipidiques nano-structurées pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes	139
4.1 Contexte.....	141
4.1.1 Objectifs	141
4.1.2. Approche.....	143
4.2. Particules lipidiques nano-structurées encapsulant de la nicotine (NLC-Nic).....	145
4.2.1 Intérêt de l'encapsulation de la nicotine dans des nanovecteurs	145
4.2.2 Stratégie d'encapsulation de la nicotine dans les NLC : formation de complexe ionique.....	146
4.2.3 Synthèse des NLC-Nic	148
4.2.4 Caractérisation des NLC-Nic	151
4.2.5 Diffusion des NLC-Nic à travers de la peau de porc	153
4.2.6 Discussion des résultats obtenus sur les NLC-Nic	156
4.3. Particules lipidiques nano-structurées encapsulant du thymol (NLC_Thymol) : Formulation of stable thyme essential oil nano-structured lipid carriers and their transdermal diffusion properties (article).....	159
4.4. Conclusion.....	183

Références	185
Chapitre 5: Material and Methods	187
5.1 Materials & General Procedures	189
5.2. Preliminary organic synthesis	190
5.2.1. Modification of reverse pluronic 10R5 (3)	190
5.2.2. Synthesis of β -cyclodextrins modified carboxylic acids.....	190
5.2.3. Synthesis of β -cyclodextrin-pentenamide (2)	194
5.3. Synthesis and characterizations of polyrotaxanes	195
5.3.1. Synthesis (4X).....	195
5.3.2. Characterizations	196
5.4. Gels formation and characterizations.....	198
5.4.1. Preliminary synthesis.....	198
5.4.2. Formation of the gels	201
5.4.3. Characterizations	202
5.5. Lipid nanoparticles synthesis.....	205
5.5.1. Formulation of NLC-Nic and NLC-Thymol	205
5.5.2. Characterizations	206
Conclusion Générale	213

Introduction générale

Ces travaux de thèse entre le CEA-Leti et le CERMAV ont pour objectif de concevoir et de développer un nouveau système de patch transdermique adapté à une utilisation prolongée et répétée pour la délivrance d'un principe actif hydrophobe anti-inflammatoire. L'approche choisie dans ce projet s'appuie sur de travaux menés dans le cadre d'une précédente thèse dans les deux laboratoires et combine l'utilisation d'hydrogels comme matrice de support polymérique au patch transdermique avec des particules lipidiques nano-structurées (NLC) dans lesquelles le principe actif hydrophobe est encapsulé, assurant la libération de la molécule active nécessaire au traitement visé. Les hydrogels ainsi formés sont nommés hydrogels composites.

Le système de double encapsulation à partir d'une matrice hydrogel et des particules lipidiques nanostructurées a le double objectif de solubiliser le principe actif et ainsi d'assurer sa stabilité, et de contrôler sa libération puis sa diffusion à travers la peau de façon locale.

Les travaux précédents ont mis en évidence la possibilité d'une telle combinaison hydrogel – NLC, tout en mettant en lumière le besoin crucial de propriétés mécaniques améliorées de la matrice polymérique, plus adaptées à l'usage du patient. Le développement de l'hydrogel est donc devenu un axe de travail important dans ce projet, afin d'apporter des propriétés mécaniques renforcées au support principal du patch transdermique : résistance aux contraintes mécaniques de compressions et d'étirements, résistance à l'usure, facilité de manipulation. Pour développer ces nouveaux hydrogels, notre choix s'est porté sur l'utilisation de polyrotaxanes en tant qu'agents de réticulation. Les polyrotaxanes sont des molécules composées de molécules cycliques – ici des cyclodextrines – enfilées sur un axe polymérique – ici un poloxamer – et fermées par des groupes encombrants en fin de chaîne. Ils empêchent la sortie des cyclodextrines de l'axe polymérique. Inclus dans une partie du réseau de réticulation d'un hydrogel, ces polyrotaxanes peuvent former des « nœuds glissants » dans le système de l'hydrogel, alors défini comme hydrogel hybride, et améliorer ses propriétés mécaniques.

Le nouveau système conçu et étudié dans cette thèse comporte ainsi trois constituants : (1) des polyrotaxanes inclus en tant qu'agent de réticulation dans (2) un réseau polymérique pour renforcer sa résistance à la compression et faciliter sa manipulation, et (3) des particules

lipidiques nano-structurées embarquant le principe actif hydrophobe. Chaque partie du système est étudiée et développée dans un chapitre de ce travail.

La synthèse des polyrotaxanes décrite dans le chapitre 2 est inédite. Le développement de cette nouvelle voie de synthèse répond au besoin de contrôler le nombre de cyclodextrines enfilées sur l'axe polymérique. La mobilité des cyclodextrines sur le polyrotaxane, et donc la capacité des jonctions mobiles à glisser, étant intimement liées à la densité de cyclodextrines enfilées sur le poloxamer, le nombre de cyclodextrines enfilées est un critère important de la synthèse à contrôler, mais peu étudié dans la littérature scientifique. Grâce à la fonctionnalisation des cyclodextrines et à une étude sur les paramètres de réaction de la synthèse, cette nouvelle stratégie permet l'obtention en une seule procédure de polyrotaxanes solubles dans l'eau et au nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées. La caractérisation des produits finaux y est également détaillée. La RMN ^1H et ^{13}C à une et deux dimensions nous donne de précieuses informations structurales tandis que des images de microscopie à transmission électronique et à force atomique nous permettent de mieux comprendre leur organisation microscopique.

Le chapitre 3 décrit les hydrogels obtenus grâce à la photo-réticulation des polyrotaxanes synthétisés au chapitre 2 avec un réseau de poly(éthylène glycol)-méthacrylate, ainsi que leurs propriétés mécaniques. Leur comportement en rhéologie, gonflement, et sous contrainte compressive a été étudié. Les polyrotaxanes apportent effectivement une meilleure capacité de gonflement, une meilleure résistance à la compression, ainsi qu'un durcissement de l'hydrogel atypique et original aux fortes déformations, semblable au phénomène constaté dans les hydrogels d'origine naturelle. Ce comportement mécanique unique mis en évidence par ces résultats démontre l'intérêt de ces hydrogels hybrides pour leur utilisation en tant que matrice polymérique de support dans des patches transdermiques.

Enfin, de nouvelles formulations de particules lipidiques nanostructurées encapsulant des molécules aux propriétés anti-inflammatoires et au potentiel commercial important (thymol, nicotine) sont présentées dans le chapitre 4. Le profil de diffusion à travers la peau de ces molécules à partir des nanoparticules en solution ou incluses dans les hydrogels, y est également évalué. L'intérêt des formulations à base de particules lipidiques nanostructurées est démontrée pour la modulation de la diffusion de molécules actives à travers la peau.

Chapitre 1 : Problématique : La délivrance transdermique d'un principe actif hydrophobe depuis une matrice hydrogel étirable

Chapitre 1 : Problématique : La délivrance transdermique d'un principe actif hydrophobe depuis une matrice hydrogel étirable	1
1.1. Contexte : besoins liés au traitement des maladies inflammatoires articulaires chroniques.....	4
1.2. Les patchs transdermiques pour la délivrance de principe actifs hydrophobes.....	7
1.2.1. Les patchs transdermiques : généralités.....	7
1.2.2. Lipid nanoparticles-hydrogel composites for drug delivery: a review (Desfrancois & al., <i>Pharmaceuticals</i> 2018 , 11, 118) : article.....	11
1.3. Hydrogels étirables pour les patchs transdermiques	43
1.3.1 Améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels	44
1.3.2 Les polyrotaxanes.....	48
1.3.3 Déclencher la libération du PA par stimulus mécanique.....	56
1.4. Conclusion	60
Références	62

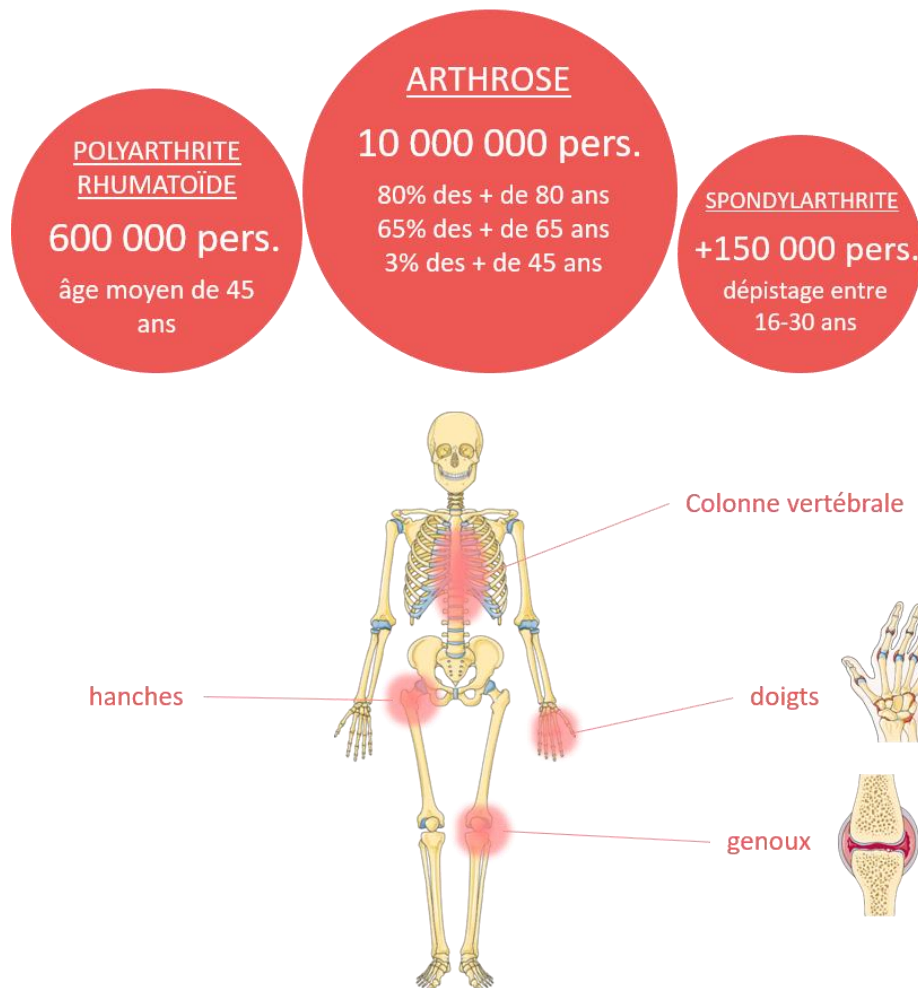
1.1. Contexte : besoins liés au traitement des maladies inflammatoires articulaires chroniques

Les maladies chroniques, également appelées maladies non transmissibles, sont la première cause de décès dans le monde avec 41 millions de victimes chaque année, dont 15 millions entre 30 et 69 ans, d'après l'Organisation Mondiale pour la Santé ^[1]. Contrairement aux croyances populaires, 80% des décès prématurés (entre 30 et 69 ans) à cause de maladies non transmissibles ont lieu dans des pays à revenus faibles ou intermédiaires. Faisant l'objet de nombreuses recherches pour en améliorer les diagnostics et les traitements, les principales maladies chroniques que sont les pathologies cardiovasculaires, les cancers et le diabète sont donc des cibles prioritaires depuis plusieurs décennies pour les scientifiques.

Parmi ces pathologies bien ciblées, les maladies inflammatoires articulaires sont moins médiatisées mais touchent pourtant près de 20% de la population française. D'après un rapport de l'INSERM en 2016, 12 millions de français souffrent de rhumatismes articulaires chroniques, dont 10 millions sont atteints d'arthrose ^[2]. Si la grande majorité des personnes atteintes ont plus de 65 ans, l'arthrose concerne toutefois également 3% des moins de 45 ans. Par ailleurs, parmi les 12 millions de patients atteints de rhumatismes, il y a environ 600 000 cas répertoriés de polyarthrite rhumatoïde, avec un âge moyen des patients autour de 45 ans. On retrouve également plus de 150 000 cas de spondylarthrites, avec un premier diagnostic généralement effectué entre 16 et 30 ans, comme il est rappelé sur la figure 1.1 ^[3-5].

Dans ces 3 pathologies (Figure 1.1), l'un des principaux objectifs du traitement est le contrôle de la douleur et la réduction de l'inflammation, grâce à l'administration répétée d'anti-inflammatoires stéroïdiens (corticoïdes) ou non stéroïdiens (AINS) à doses parfois élevées. La voie d'administration la plus courante de ces molécules est la voie orale, dans certains cas associés à des infiltrations de corticoïdes directement effectuées sur les articulations douloureuses. La prise orale répétée et sur le long terme d'AINS à dose élevée, comme c'est le cas dans le cadre de ces traitements, comporte des risques secondaires, dont le risque d'ulcères gastriques. Il est donc souvent nécessaire de prescrire un protecteur gastrique associé, comme l'oméprazole, et donc d'alourdir la charge médicamenteuse.

LES RHUMATISMES ARTICULAIRES CHRONIQUES



Traitements anti-inflammatoires nécessaires

- par prise orale (corticoïdes, AINS)
- par infiltrations (corticoïdes)
- par patchs transdermiques (AINS)

Figure 1.1 : Rappels sur les rhumatismes articulaires chroniques, d'après [3-5]

Une possible solution alternative est l'utilisation de patchs, de crèmes ou de gels pour l'administration transdermique des AINS. En effet, depuis le début des années 2000, il est connu que l'administration locale d'AINS permet une meilleure biodisponibilité du médicament sur le site inflammé qu'une prise orale équivalente [6-8]. Rolf et al. ont ainsi montré qu'après l'application sur le genou de 30 mg de kétoprofène en emplâtre pendant 5 jours, la concentration de kétoprofène dans le cartilage du genou est 30 fois plus importante

qu'avec une prise orale journalière de 50 mg de kétoprofène pendant 5 jours ^[7]. Dans le cas de patients âgés, l'administration locale est d'ailleurs mieux tolérée que l'administration orale pour le traitement des douleurs chroniques du genou ^[9].

Dans le cadre d'un traitement répété et sur le long terme pour combattre une maladie articulaire inflammatoire chronique, un dispositif de libération transdermique des AINS peut donc devenir une alternative crédible s'il assure une libération prolongée et contrôlée des molécules actives. D'autre part, une proportion importante et grandissante des patients concernés fait partie de la population active. Leur maladie et la prise du traitement associée doivent donc avoir le moins de répercussions possibles sur leurs activités quotidiennes, professionnelles ou de loisirs. A l'heure actuelle, les patchs anti-inflammatoires commercialisés (1.3% de diclofénac, vendus par les marques Voltaren® et Flector®) ont une durée d'action de 12h et embarquent une quantité limitée de molécules actives. Il n'est pas possible d'en appliquer plusieurs en simultané par risque de surdosage, ces patchs ne sont donc pas adaptés au traitement synchrone de plusieurs articulations. Le reste des dispositifs proposés à la vente au grand public concerne des patchs chauffants, uniquement.

Dans ce contexte, le dispositif idéal de patch transdermique délivrant un traitement anti-inflammatoire doit donc posséder les propriétés suivantes :

- Biocompatible et bien toléré pour une application prolongée et répétée sur la peau,
- Résistant aux déformations provoquées par les activités quotidiennes du patient,
- Etirable pour permettre la mobilisation normale de l'articulation du patient,
- Facile à appliquer (pas d'appareil supplémentaire nécessaire, par exemple, pour déclencher la délivrance du principe actif (PA)).

La diffusion de la molécule assurée par le dispositif doit également suivre le comportement idéal suivant :

- Diffusion longue (24h ou plus),
- Diffusion modulable par le patient ou, à défaut, constante sur toute la durée de l'utilisation.

La molécule active embarquée doit également rester stable tout au long de la fabrication du dispositif, de son stockage et de son utilisation.

1.2. Les patchs transdermiques pour la délivrance de principe actifs hydrophobes

1.2.1. Les patchs transdermiques : généralités

L'application locale sur la peau de molécules actives pour un effet local ou systémique n'est pas une méthode de traitement nouvelle et est utilisée depuis des centaines d'années. La voie d'administration transdermique comprend en effet plusieurs avantages comparés aux autres voies classiques d'administration de médicaments, comme la voie orale. Elle permet tout d'abord d'éviter la première réponse métabolique du foie et la destruction de la molécule dans le système digestif, principaux mécanismes de réduction de la biodisponibilité des principes actifs (PA). En comparaison avec des injections hypodermiques, intramusculaires ou intraveineuses, l'administration transdermique est moins invasive, peut délivrer le PA sur une durée plus longue et donc réduire la fréquence des doses et offre une meilleure stabilité de la molécule active. Les risques de sur- ou sous-dosage sont donc réduits. Elle facilite également l'autonomie du patient dans la gestion de son traitement et une meilleure observance de celui-ci. Dans la médecine moderne, il aura pourtant fallu attendre 1979 pour voir apparaître le premier patch transdermique développé par Novartis, libérant de la scopolamine pendant 3 jours, approuvé par la FDA (« Food and Drug Administration »)^[10]. Depuis ce premier dispositif, les patchs ont intégré différentes évolutions pour améliorer leur durée d'action, faciliter la pénétration de la molécule active à travers la peau, ou mieux, contrôler la libération de la molécule.

Prausnitz et Langer ont proposé dans une revue datant de 2008 de séparer en trois générations les différents dispositifs de patchs transdermiques^[10]. La première génération, la plus répandue à l'heure actuelle sur le marché, est celle des dispositifs qui dépendent uniquement des propriétés de la molécule active pour pénétrer à travers les différentes strates de la peau. Le nombre de molécules utilisables de façon efficace dans ces dispositifs est donc limité car seules les propriétés intrinsèques des PA doivent leur permettre de passer à travers la peau. Les exemples les plus courants sont ainsi la lidocaïne (commercialisé par Iomed, Salt Lake City, USA) ou le fentanyl (Janssen Pharmaceutica, Titusville, NJ, USA) pour des actions analgésiques ; des hormones comme la testostérone ou l'estradiol (Novartis) ou encore la nicotine (Novartis). Des alternatives à ces premiers dispositifs existent toutefois, en adaptant la formulation de la couche « réservoir » (hydrogels, sprays, crèmes, films) et en

adaptant la formulation de la molécule active dans la couche « réservoir ». Il existe ainsi des systèmes commercialisés qui délivrent de la testostérone en gels ou de l'estradiol en spray. Les patchs transdermiques de cette génération embarquent seulement une couche support et la couche avec le réservoir contenant la molécule active. En l'état actuel, les dispositifs transdermiques de cette première génération ne sont capables d'administrer que de petites molécules, capables par elles-mêmes de diffuser à travers la peau et avec une libération limitée en quantité et dans le temps.

Dans le but d'élargir le spectre des molécules envisageables, une deuxième génération de dispositifs a été développée. Elle rassemble les patchs qui intègrent l'utilisation de méthodes plus avancées pour améliorer la pénétration de petites molécules à travers la peau (l'ajout d'agent chimiques ^[11-14], l'utilisation d'ultrasons non-cavitationnels ou la ionophorèse ^[15-18]). Cette deuxième génération de dispositifs reste encore limitée à l'utilisation de petites molécules comme des molécules analgésiques. Par exemple, deux patchs transdermiques basés sur le principe de ionophorèse délivrant de la lidocaïne et du fentanyl (figure 1.2) ont été décrits pour un effet anti-douleur local ^[18] ou systémique ^[17]. Ce dernier dispositif a été testé auprès de patients en phase post-opératoire d'une chirurgie orthopédique, abdominale ou thoracique ^[17]. L'administration locale de fentanyl grâce à la ionophorèse et déclenchée par le patient pour un effet analgésique systémique, dans les 24 premières heures post-opératoire et en complément d'un traitement anti-douleur de fond, a apporté des résultats similaires à l'administration intraveineuse de morphine par une pompe contrôlée par le patient.

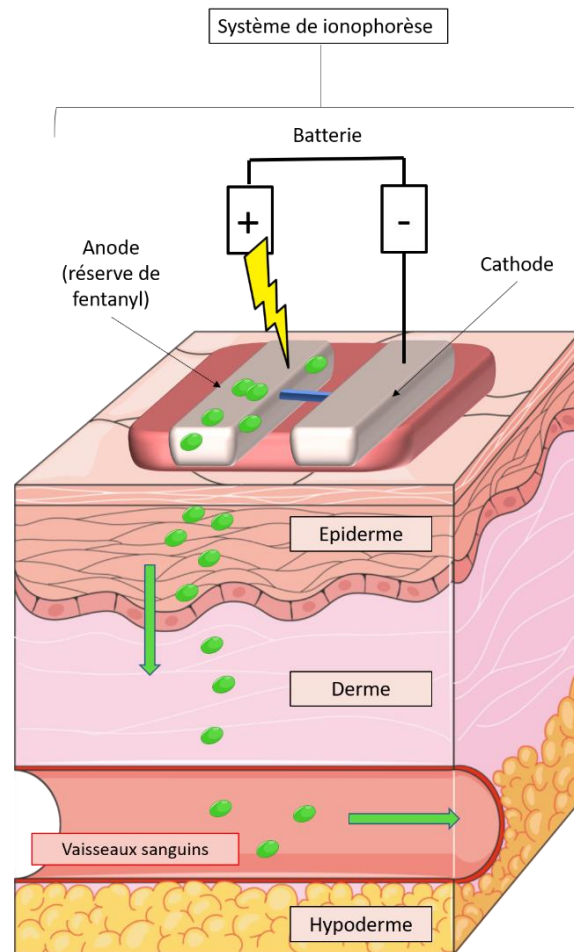


Figure 1.2 : Système de délivrance de fentanyl par ionophorèse, d'après ^[17]. L'application d'un faible courant électrique permet de perturber l'organisation des cellules du stratum corneum et d'ainsi favoriser le transport de molécules actives chargées à travers la barrière de la peau.

L'utilisation d'un tel système est extrêmement intéressant dans le milieu hospitalier : il est moins invasif qu'une pompe intraveineuse de morphine et permet une meilleure gestion par le patient de son traitement analgésique. Il n'est toutefois pas adapté à l'utilisation journalière, au domicile du patient, sans surveillance médicale rapprochée et dans le cadre d'activités quotidiennes avec mouvements.

La troisième génération de dispositifs de patchs transdermiques cible l'amélioration de la pénétration de macromolécules au travers de la première strate de la peau, le stratum corneum, à l'aide de différentes techniques, plus agressives (microdermabrasion ^[19], ablation thermique ^[20,21], électroporation ^[22,23], microaiguilles ^[24], ...). Ces méthodes ont en commun

le fait de micro-perforer le stratum corneum pour créer une voie de pénétration dans la peau pour les molécules embarquées. Le caractère très localisé des micro-lésions créées semble permettre la validation de leur utilisation en toute sécurité. Parmi ces techniques, les microaiguilles sont particulièrement intéressantes pour une délivrance efficace sur une courte durée et sont déjà envisagées pour des applications analgésiques ou l'administration de vaccins [10,24,25].

Les deuxièmes et troisièmes générations de patches transdermiques sont pour l'instant au stade des premiers développements et ne proposent pas de solutions adaptées à un traitement anti-inflammatoire prolongé, non invasif, et facilitant la gestion de manière autonome dans la vie quotidienne du patient. La plupart de ces solutions imposent l'utilisation d'appareils supplémentaires coûteux. Des solutions intéressantes ont par ailleurs été développées à partir de dispositifs de la première génération pour contourner les limitations évoquées précédemment.

Ainsi, l'apparition de dispositifs composites combinant une matrice support, comme un hydrogel, et une formulation compatible avec des molécules lipophiles, comme des nanoparticules lipidiques, a permis d'améliorer la stabilité et la durée de libération de différents principes actifs. La revue suivante leur est consacrée.

1.2.2. Lipid nanoparticles-hydrogel composites for drug delivery: a review (Desfrançois & al., *Pharmaceuticals* 2018, 11, 118) : article

Lipid Nanoparticles and Their Hydrogel Composites for Drug Delivery: A Review

Claire Desfrançois^{1,2}, Rachel Auzély² and Isabelle Texier^{1,*}

¹ CEA LETI MINATEC Campus, University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France;
claire.desfrancois@cea.fr

² CERMAV-CNRS, University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France;
rachel.auzely@cermav.cnrs.fr

* Correspondence: isabelle.texier-nogues@cea.fr; Tel.: +33-438-784-670

Received: 26 September 2018; Accepted: 18 October 2018; Published: 1 November 2018

Abstract: Several drug delivery systems already exist for the encapsulation and subsequent release of lipophilic drugs that are well described in the scientific literature. Among these, lipid nanoparticles (LNP) have specifically come up for dermal, transdermal, mucosal, intramuscular and ocular drug administration routes in the last twenty years. However, for some of them (especially dermal, transdermal, mucosal), the LNP aqueous dispersions display unsuitable rheological properties. They therefore need to be processed as semi-solid formulations such as LNP-hydrogel composites to turn into versatile drug delivery systems able to provide precise spatial and temporal control of active ingredient release. In the present review, recent developments in the formulation of lipid nanoparticle-hydrogel composites are highlighted, including examples of successful encapsulation and release of lipophilic drugs through the skin, the eyes and by intramuscular injections. In relation to lipid nanoparticles, a specific emphasis has been put on the LNP key properties and how they influence their inclusion in the hydrogel. Polymer matrices include synthetic polymers such as poly(acrylic acid)-based materials, environment responsive (especially thermo-sensitive) polymers, and innovative polysaccharide-based hydrogels. The composite materials constitute smart, tunable drug delivery systems with a wide range of features, suitable for dermal, transdermal, and intramuscular controlled drug release.

Keywords: lipid nanoparticles; hydrogels; polysaccharides; solid lipid nanoparticles; nanostructured lipid carriers; chitosan; dextran; cellulose; alginate

1. Introduction

One of the biggest challenge in pharmaceutical technology nowadays remains the design and the complete characterization of a sustainable and targeted drug delivery system, specifically for poorly water soluble or insoluble active compounds. In this context, topical administration of drugs, especially the control and determination of the exact amount of active compound that reaches the different skin layer ^[26], is still a hurdle to be overcome. In the last two decades, the interest for lipid-based formulations for dermal and transdermal drug delivery as well as for other potential drug administration routes has been steadily growing ^[27,28]. Last developments have been focused on improving the low bioavailability of lipophilic drugs and controlling their release ^[29]. Solid lipid nanoparticles (SLN) and lipid nano-emulsions (LNE) have been first developed in the early 1990s ^[30,31]. SLN and LNE are colloidal nanoparticles with a lipophilic core that is respectively in a solid state or in a liquid state at room temperature. SLN and LNE ingredients are most of the time non-toxic and highly biocompatible, thus approved by the FDA (Food and Drug Administration) or the EMA (European Medicines Agency) ^[32]. The lipophilic core is supposed to protect the active molecule entrapped inside from environmental (UV, pH) or physiological (immune system, enzymes) degradations while providing a good solubility for the lipophilic drug and preventing the formation of aggregates. However, SLN and LNE can present some limitations concerning the stability of drug encapsulation. Whereas important drug leakage can be observed for liquid-core LNE ^[31], the crystalline core of SLN can induce phase demixing and drug expulsion ^[32]. A new generation of lipid nanoparticles (LNP) was therefore introduced in the 2000's ^[33]: nanostructured lipid carriers (NLC). Their core structure is composed of a blend of liquid and solid lipids, potentially able to entrap higher payloads of active molecules, while better controlling their release thanks to the blend of lipids ^[30].

The nanometer size of SLN, LNE and NLC is a big asset for targeted delivery purposes. For instance, their efficient uptake in tumor tissues thanks to the Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR) was demonstrated in different models ^[34,35]. However, for some administration routes, such as dermal, transdermal, ocular, and transmucosal, LNP aqueous dispersions are more efficient and easy to apply when they are supported by a semi-solid vehicle. That is why since 2004 ^[36] hydrogel formulations combined with LNP have been tested for these applications ^[37-39].

Hydrogels are defined as 3D networks of polymers that swell in water while retaining their physical integrity. The gelation phenomenon is accounted for by the physical or chemical cross-linking of polymer chains. In most chemically crosslinked hydrogels, the junction points are stable, permanent, covalent bonds. By contrast, in the case of physically crosslinked hydrogels, the networks are held together by molecular entanglements and/or secondary forces, such as ionic, hydrogen-bonding or hydrophobic interactions. Finally, two or more polymer networks can be interlaced on a polymer scale, creating interpenetrating polymer network hydrogels. Hydrogels also have tunable physical and mechanical properties for a wide range of applications in medicine. In this regard, they have already been used as drug delivery systems for several years as they offer a convenient supporting matrix for active ingredients^[40]. However, when it comes to dermal or transdermal delivery of lipophilic drugs, they quickly reach their limits since lipophilic drugs are not well stabilized into the hydrophilic matrix where they can precipitate as aggregates or be released by uncontrolled burst.

Therefore, hydrogels can be advantageously combined with LNP to provide a double encapsulation strategy for the controlled release of lipophilic drugs (Figure 1.3). Lipophilic drugs can be efficiently loaded into lipid nanoparticles for which the lipid core provides a suitable matrix, LNP being themselves encapsulated inside the hydrogel scaffold. The double encapsulation provides an additional level of control over the spatial and temporal release of the drug, while benefiting from the biological properties of the hydrogel. In this review, we provide a comprehensive outlook of the combination of lipid nanoparticles and various types of hydrogels as drug delivery systems with emphasis on polysaccharide-based hydrogels.

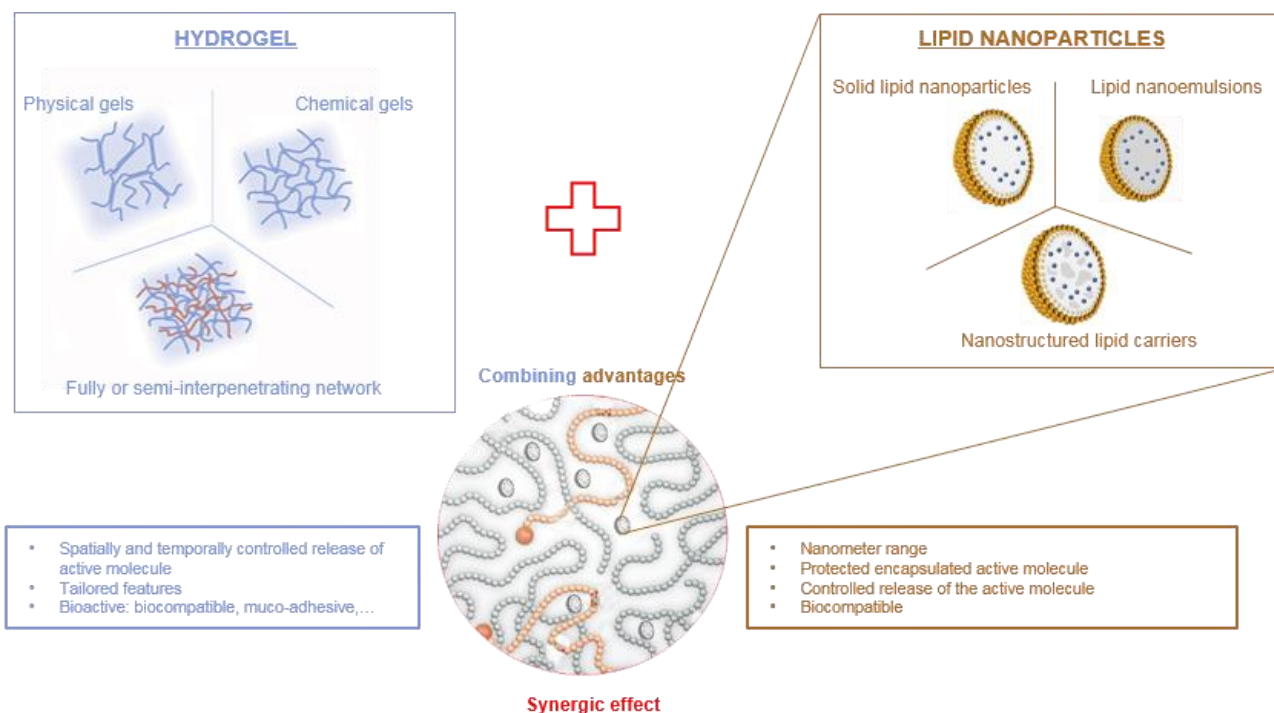


Figure 1.3. Combination of hydrogels and lipid nanoparticles.

2. Lipid nanoparticles

Lipid nanoparticles (LNP) are colloidal lipophilic systems, made of a lipid core stabilized in aqueous media by a single layer of surfactants (phospholipids, poly(ethylene glycol)-based (PEGylated) surfactants,...) (Figure 1.4). LNP thus display a lipophilic core and should not be confused with liposomes composed of an aqueous core stabilized by a surfactant bilayer. As mentioned above, three kinds of lipid nanoparticles are currently used as drug delivery systems: solid lipid nanoparticles (SLN), lipid nano-emulsions (LNE) and nanostructured lipid carriers (NLC). While all three types of LNP include lipids in their formulation, they can be differentiated by their core structure as described in Figure 1.4. Lipid nanoparticles used in drug delivery systems have an average size in the nanometer range. The ingredients entering the LNP composition are on their majority FDA and EMA approved, lipid composition remaining alike to lipophilic physiological molecules but being adapted to fit the active molecule encapsulated. They are non-toxic and biodegradable.

LNP are used as drug delivery systems, protecting and stabilizing hydrophobic active molecules in aqueous solutions. Their first and foremost advantage is the improvement of the bioavailability of drugs, specifically lipophilic molecules that can be better solubilized into

the lipid core than in aqueous environment. The lipophilic core of lipid nanoparticles entraps active ingredients while the surfactant membrane, generally consisting solely or partially of phospholipids, ensures the stability of LNP in hydrophilic environment. LNP are particularly fitted for transdermal drug delivery. Indeed, lipid nanoparticles are known to create a monolayer film onto the skin, limiting water evaporation and improving skin hydration [41].

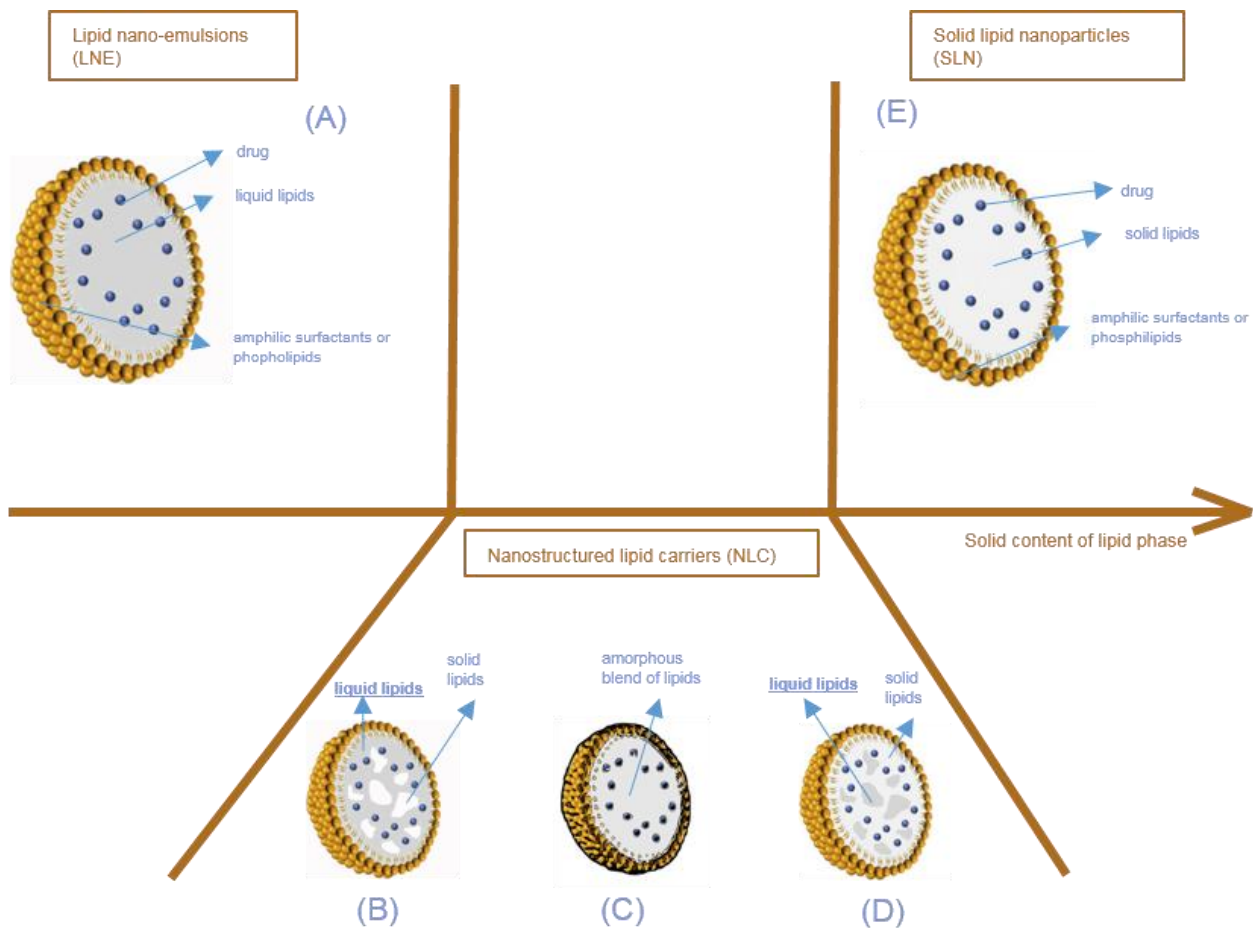


Figure 1.4. Structure of lipid nanoparticles, from lipid nano-emulsions to solid lipid nanoparticles.

2.1. Composition and structure

Two parameters are usually used to quantify the active molecule content encapsulated into LNP. The first one is the entrapment efficiency (E_e) defined as:

$$Ee = \frac{W_t - W_f}{W_t} \quad (1)$$

where W_t is the total amount of active compound added and W_f is the free amount of active compound remaining in the supernatant after purification and separation from LNP. Finally, it defines the ratio between the weight of active compound actually encapsulated into the LNP and the weight of active compound added to the lipid phase for particle production.

The second parameter is the loading capacity (L_c), defined as:

$$Lc = \frac{W_t - W_f}{W_t - W_f + W_l} \quad (2)$$

where W_l is the weight of lipids in the formulation. L_c thus expresses the ratio between the weight of active compound entrapped in LNP and the weight of lipids.

E_e and L_c vary with the lipophilic property of the active molecule, the composition and the ratio of the solid and liquid lipids, the phospholipid types and amount, and the production methods.

As described earlier, three types of lipid nanoparticles have been used as drug delivery systems since the beginning of the 2000's (Figure 1.4). The first one consists of lipid nano emulsions (LNE), the core of which is composed of liquid lipids (Figure 1.4A). Limited by the very fast diffusion of the drug from their lipid core, and their very poor stability, LNE have not been extensively used in drug delivery application except for parenteral nutrition. In some cases, a solid shell to obtain lipid nano-capsules can be designed ^[42]. The second type consists of solid lipid nanoparticles (SLN) (Figure 1.4E) which differs from the third one, called nanostructured lipid carriers (NLC), by the lipid core composition. Simply described, SLN only have a core with lipids in a solid state at room and body temperature. However, in NLC, the lipid core is a heterogeneous mixture (Figure 1.4B and 2D), or an amorphous phase (Figure 1.4C) composed of solid and liquid lipids.

SLN were the first model used to better understand drug encapsulation in lipid nanoparticles. There are commonly three different models for describing the incorporation of active drugs into SLN ^[30]: homogeneous drug lipid matrix, drug-enriched core, drug-enriched membrane.

The obtained type of system depends on the formulation used (lipids, active compound, phospholipids, surfactants) and of the method of production (hot or cold homogenization) [30].

In the homogeneous SLN matrix, there is no phase separation between the active molecule and the lipid core. This is achieved when SLN are produced by hot homogenization and encapsulate very lipophilic drugs. This type of particles provides a long and sustainable release of the compound, that can length several weeks [30].

However, drugs cannot always be solubilized at high payloads in solid lipid matrix. During the cooling and solidification of particle core, the concentration of the active drug in the remaining liquid lipid phase can keep increasing, leading to the crystallization of an active drug-enriched shell. This results in phase separation between the poorly drug-loaded core lipid phase and the active molecule mainly located at the particle surface. If the active molecule presents a limited solubility in the melted lipids, this surface drug enrichment provides a fast drug release. This type of release kinetics may be highly desired in transdermal drug delivery to improve the skin permeation of the active molecule thanks to the monolayer formed by the SLN [30]. On the contrary, when the active drug phase starts cooling and crystallizing first, the shell is deprived of active compounds. The kinetics of drug release then fits Fick's law of diffusion [30]. Of course, these models are ideal. Most of the time, SLN architectures are closer to complex hybrid models.

In nanostructured lipid carriers (NLC) (Figures 1.4B, C and D), the core is composed of a mixture of liquid and solid lipids. Blending two types of lipids, very different in their physical states, creates imperfections (i.e. non crystallization) in the lipid core. These imperfections provide additional spaces where the active compound can fit in, enabling a bigger amount of drug to be loaded when compared to perfect crystalline structures. With NLC again, there are several architecture models that can be examined.

The first situation is multiple NLC type (Figures 1.4B and 1.4D). Separated, liquid -at room and body temperature-, lipid pockets are entrapped into a solid lipid matrix (Figure 1.4D) or solid lipid matrix domains are encapsulated into a liquid core (Figure 1.4B). This happens when the concentration of liquid lipids in the solid lipids is higher than their solubility. When the lipid mixture cools down during the production process, phase separation occurs,

creating liquid lipid droplets or crystalline zones of solid lipids. This type of NLC is particularly interesting to increase the content of the active molecule when the latter is more soluble in either the selected oil or in the solid lipids. This is the case for a majority of NLC described in the literature ^[43].

The second possibility is that the lipid mixture can form an amorphous blend (Figure 1.4C). This situation happens when the lipid mixture does not recrystallize during the production process, but still forms a solid matrix at room and body temperature ^[44] (i.e. homogeneous, amorphous and very viscous). This situation improves the very short term and long-term stability of NLC: as the recrystallization is limited, less active compounds will be expelled from the NLC.

2.2. Stability of LNP: physicochemical properties

The LNP shelf-life stability is determined mainly by two different sets of parameters. The first one is directly related to the particle physical properties (size, size distribution, zeta potential, crystallinity profile) whereas the second set of parameters rather evaluate the stability of the encapsulated ingredient over time.

The average diameter and the size distribution of lipid nanoparticles are the most checked parameters during LNP studies from the first development steps to the preclinical and clinical trials. They are known to affect body absorption, biodistribution and excretion of nano-objects ^[45].

Dynamic light scattering (DLS) is the most widely used technique to monitor these two parameters. DLS is easy and fast to implement and is one of the only nanometer range suitable analysis method where International Standard guidelines have been edicted by the NCL (Nanomedicine Characterisation Laboratory) and the EUNCL (European Nanomedicine Characterisation Laboratory) and described ^[46]. DLS informs about two parameters: the average hydrodynamic diameter of the nanoparticle population, and the polydispersity index (PDI). However, it is a low-resolution method that is not able to detect small aggregates and small changes in particle size distribution caused by physiological conditions. Similarly, it cannot be used to resolve the particle size distribution of polydisperse solutions ^[47].

Alternative methods exist such as nanoparticle tracking analysis (NTA) and Field Flow Fractionation coupled with Multi Angle Light Scattering (FFF-MALS) ^[47]. NTA is based on the same principle than DLS, namely light scattering and Brownian motion. The difference lies in data analysis. In NTA, each single particle movement is tracked, the software calculating the diffusion coefficient of individual nanoparticles. This allows differentiation between slightly different nanoparticles. It is thus a high-resolution method. Sometimes, the refractive index of the LNP mixture does not allow for accurate light scattering measurements.

A fractionation step prior to the analysis can greatly improve the quality of the obtained size distribution profile. These fractionation systems such as asymmetric flow FFF (shortly named A4F) or size exclusion chromatography are usually associated with detectors (DLS or MALS). The whole system can resolve very complicated samples, giving a very precise outlook on the properties, behaviour and stability of nanoparticles in biologically relevant environment ^[47].

Concerning the analysis of the physical state of the lipid core, different techniques are available. Differential Scanning Calorimetry (DSC) is the most common method used to detect any changes in the crystallinity of LNP as a function of the temperature. In that regard, it generally helps to determine two parameters: 1) the physical status of encapsulated lipids (liquid, solid, or a mixture) and 2) the physical state of the loaded active molecule. By comparing the DSC profiles of bulk materials with those of nanoparticles, information about the physical state of the mixture of liquid and solid lipids can be deduced. Usually, a mixture of two lipids or a mixture of lipid and active molecules displays lower melting temperature and lower enthalpy of the melting peak than the pure compound ^[48]. For example, Casadei and al. described that the melting point of SLN encapsulating ibuprofen was 58°C, whereas the melting point of pure ibuprofen was 76°C (Figure 1.5), demonstrating interactions between the lipid core and the active molecule ^[48]. Furthermore, empty SLN display a melting point at 54°C, whereas the melting point of pure Precirol (solid lipid used in the formulation) was 55°C ^[48]. This decrease was due to the interaction of Precirol with surfactants, namely sodium cholate and Pluronic F68.

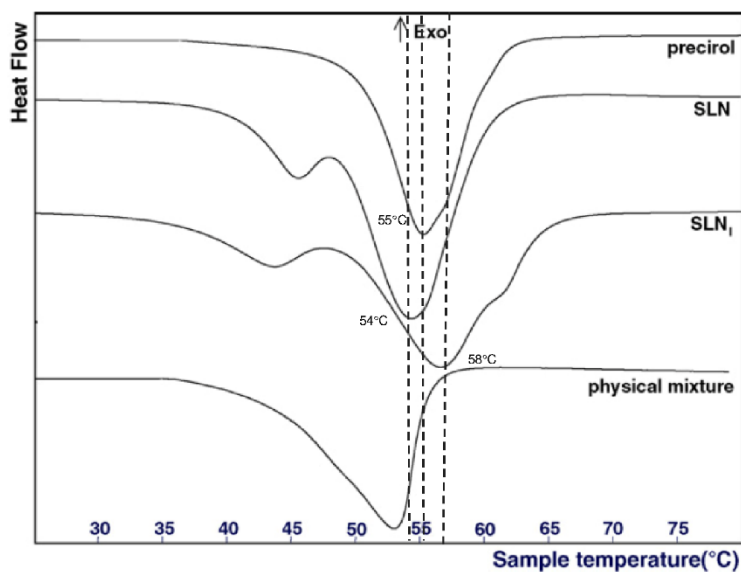


Figure 1.5. DSC profiles of pure precirrol, empty SLN, ibuprofen-loaded SLN (SLN_i) and a mixture of precirrol and ibuprofen. Adapted from [48].

Another method to characterize the physical state of the lipid core is X-ray Diffraction (XRD). XRD gives information on the crystallinity state of LNP lipid core, which can be compared to that of bulk ingredients entering the particle composition. Behbahani and al., compared XRD patterns of pure curcumin, bulk lipids entering the LNP composition, and of empty and loaded LNP [49]. They concluded that curcumin was completely dissolved in the lipid matrix and stabilized in amorphous form. Lower intensity of empty and loaded LNP patterns when compared to bulk lipid patterns also showed a lower degree of crystallinity of these lipids in LNP. These results endorsed the idea that the lipid matrix was less ordered in LNP [49].

To quantify and assess the stability of active ingredients entrapped inside the LNP core over the shelf-life time, the common analysis method is High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) coupled with appropriate detectors. Small aliquots of the studied sample are regularly withdrawn, dialyzed or passed through ultrafiltration or solid phase extraction (SPE) to separate the free drug from the encapsulated drug, then LNP are destroyed with organic solvent and the final sample is injected in HPLC [50] [44]. This method is substance specific, offering the possibility to identify the substance thanks to the retention time, to quantify it thanks to pre-acquired calibration curves and to differentiate it from

other compounds or impurities. This method can however be limited by the fractionation process required prior to the HPLC analysis: substances can remain adsorbed on the dialysis or filtration membrane depending on their surface charges, their sizes and the buffer used. Dilutions prior separation and analysis can moreover provoke undesired drug release and introduce a bias in the result ^[47].

Compared to HPLC, Analytical Ultracentrifugation (AUC) is an alternative method, still in development. AUC principle is to calculate the sedimentation coefficient of each particle to deduce its diameter and its molecular weight ^[47]. In a fast and easy way, AUC gives information on the particle size distribution profile and the free/bound weight ratio of the active molecule. It combines separation, concentration, and analysis steps in one experiment.

Casadei and al. used ¹H NMR (Nuclear Magnetic Resonance of protons) to quantify the ibuprofen content of SLN ^[48]. Without any further treatments before measurements, they quantified the free ibuprofen contained in the aqueous phase of the formulation thanks to calibration with an internal standard. From the free ibuprofen weight, they were then able to deduce the drug encapsulation efficiency inside the nanoparticles ($52 \pm 3\%$) ^[48]. Prior studies showed that ibuprofen contained in the solid lipid core did not appear on the ¹H NMR spectrum at room temperature ^[48]. However, this method is limited to the active molecule encapsulated in SLN. If the lipid core is not completely homogeneous, encapsulated ibuprofen may appear on the NMR spectrum. NMR can also be used to get an insight into the drug localization inside the LNP structure ^[31,44,51]. For instance, Delmas and al. used ¹H NMR NOE spectra to gain information on Nile Red spatial proximity with NLC lipid core components. In this case, the ability of Nile Red to present environment-sensitive fluorescent properties confirmed the localization obtained by NMR, and allowed the quantitative analysis of dye distribution between particle core and surfactant shell ^[51].

2.3. Controlling drug release

One major interest of using LNP is their ability to control drug release kinetics. The drug delivery kinetics from LNP depends on their composition, the nature of the active molecule,

and its localization inside the nanoparticle. The interactions between the active molecule and the liquid and solid lipids are specifically crucial. *In vitro* tests have shown that LNP dispersions generally provide a prolonged release of loaded drugs [32]. The constraints of *in vivo* environment can however require some adaptations to the design of LNP. To improve the blood half-life of the particles, PEG based-surfactants can be included as membrane ingredients. Adding PEG chains on the surface of the nanoparticle allows to prolong systemic circulation time and decrease immunogenicity [52,53].

While LNP provide stability and enhance the solubility of hydrophobic active molecules, drug release from LNP still, sometimes, displays a characteristic profile of burst effect. It is especially the case when the active molecule is both located in the core and at the membrane of the lipid nanoparticle [30]. This specific kinetics can be desired for transdermal delivery: it creates a mono-layer of the active ingredient on the skin, improving the drug permeation through the *stratum corneum* [54,55]. However, it is also often seen as undesirable because of its contribution to local or systemic drug toxicity and because it also reduces the blood half-time of the drug. It may lead to a poor delivery of the active ingredient and a poor therapeutic outcome.

Moreover, when LNP are used for dermal, transdermal or ocular drug delivery, they need to be dispersed in a 3D mechanical matrix to remain at the administration site to prevent undesired systemic and local side-effects (irritation, inflammation). The encapsulation of LNP inside a suitable delivery vehicle could prevent such negative features. Indeed, a double encapsulation system—drug loaded into LNP, themselves entrapped into a vehicle material—could bring a spatial and temporal control over drug delivery. Moreover, the vehicle, such as is the case for certain hydrogels, can display interesting properties such as muco-adhesion and enhanced biocompatibility [56]. The use of a viscous gel formulation is an interesting technical solution, as it often allows a more convenient handling of the sample and a greater compliance of the patient. Combining lipid nanoparticles and hydrogels is then a good solution to achieve a better control over the release kinetics of the active molecule. This composite system will display both component advantages: the protection and the improvement of the solubility of the active molecule in lipid nanoparticles, while retaining the good rheological properties of hydrogels and improving the release of the active molecule (Figure 1.3).

3. Hydrogels as drug delivery scaffolds

Hydrogels are commonly defined as 3D networks of chemically or physically cross-linked polymers that swell in water while retaining their physical structure integrity. They are hydrophilic, biocompatible and simple to process by different methods to achieve a large variety of 2D (coatings, films) and 3D (bulk gels, aerogels) scaffolds. They also offer a wide range of tailored features by well-known and well-controlled chemical modifications and add a possibility to control the drug release spatially and temporally. The degree of cross-linking, the concentration, and the nature of the polymers (either synthetic or natural) are the three key parameters influencing the porosity and the degree of swelling of hydrogels. These two features (porosity and degree of swelling) are controlling the passive diffusion kinetics of active molecules, biomolecules, or nanoparticles loaded inside the matrix ^[57]. Structure-function relationships of the hydrogel scaffolds play the major part of the drug release behavior. The chemical composition of hydrogel scaffolds can be tuned to respond to an environmental trigger and to degrade after a desired lifetime, allowing researchers to control the gelation process as well as the degradation process. These two possibilities are the key features determining the spatially and temporally targeted drug release. Two main types of drug release mechanisms from hydrogels have been found: diffusive release -based on the second Fick's law of diffusion- and degradation-based release.

Two main issues remain unaddressed when hydrogel constitutes the only material of the drug delivery system. Because of the large size of gel pores and its high content of water, small and water-soluble drugs quickly escape from the network, leading to a burst release effect and a reduced bioavailability. The stable incorporation of hydrophobic drugs within the hydrogel network is also not easy to achieve. Due to the incompatibility between the hydrophobic drug and the water-swollen hydrogel matrix, such molecules tend to precipitate or to rapidly escape from the material ^[58]. To overcome these limitations, lipid nanoparticles, as presented in the first part of this review, are prime candidates to promote good solubility of lipophilic entrapped active molecules by double encapsulation process.

In the last twenty years, researchers have used different types of polymers to create hydrogel scaffolds. From synthetic polymers to natural polysaccharides, they all display useful properties. The statistical bibliography analysis performed for this review classifying the LNP-

hydrogel hybrid drug delivery systems by polymer type is presented in Figure 1.6 and Table 1.1. Results are extracted from a bibliography research performed on Scopus with roughly 125 relevant papers. A large majority of LNP-hydrogel drug delivery systems use cheap, commercially available and ready-to-use formulations of poly(acrylic) acids (commonly named Carbopol®) (26%). The main component of the hydrogel may even not be specified (39%), as these polymers are mainly used as spreading vehicle to give the formulation the convenient viscosity for *in vitro* and *in vivo* characterizations, and dermal topical delivery. In these cases, the non-specified polymer also very often reveals to be Carbopol® polymer.

However, to face drug delivery challenges imposed by specific physiological conditions, developing smart hydrogels sensitive to changes in their immediate environment has become crucial. Other synthetic polymers, such as poloxamers –thermosensitive synthetic block polymers described in Table 1.1- were also used (9% of occurrence). Finally, the biological properties of polysaccharides, especially the very high biocompatibility, have strongly attracted researchers to use them as LNP scaffolds for more advanced systems (24% of occurrence). Polysaccharides constitute the third most-used polymer family in LNP-hydrogel composites engineering (Figure 1.6).

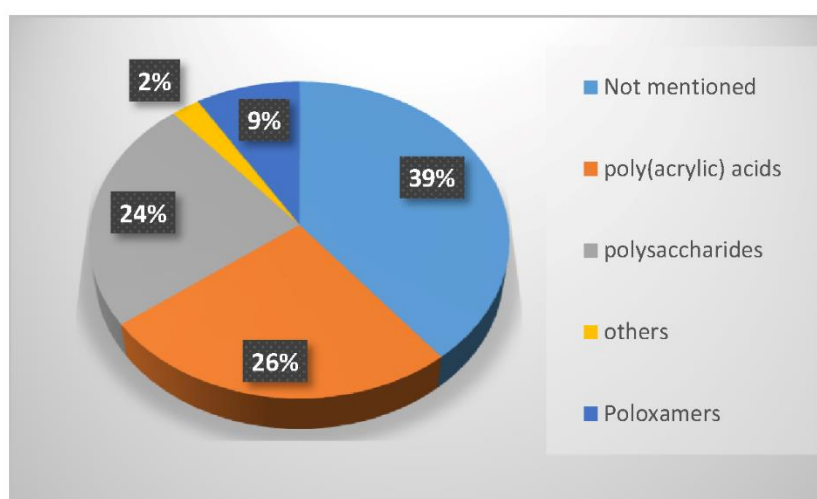
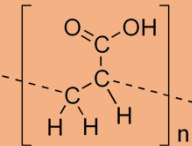
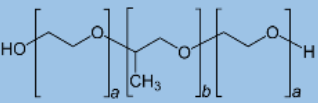


Figure 1.6. Percentage of occurrence of the different types of polymers used to form hydrogels entrapping LNP in the last twenty years.

Table 1.1.: Type of hydrogels used for LNP-hydrogel combination in the past 5 years.

Polymer	Chemical structure	Type of chain interactions	Properties
Poly(acrylic) acid polymers (ex: Carbopol®)		Entangled chains	Easy-to-use rheological properties and biocompatibility
Ploxamers (ex: Pluronic®)		Physical gels	Thermo-sensitivity and biocompatibility
Polysaccharides (ex: cellulose, alginate, ...)		Mainly chemical crosslinking	Bioactivity and biocompatibility

3.1. Synthetic polymers: poly(acrylic) acids-based hydrogels

As demonstrated in Figure 1.6, 26% of the hydrogels used to entrap lipid nanoparticles are synthetic anionic poly(acrylates) with a high molecular weight, more commonly known under the name Carbopol®. Their general chemical structure is described in Table 1.1. 39% of hydrogel users do not explicitly detail the chemical component of their formulation, but it often reveals to be a derivative of poly(acrylate) as well. Poly(acrylate) are usually crosslinked with components such as allyl ethers of pentaerythritol, or allyl ethers of sucrose allowing a very wide range of molecular weights to be commercially available [59,60]. Generally, less than 1% w/v of Carbopol® powder in solution is necessary to obtain a formulation with the appropriate viscosity for a topical use. When simple hydrogels, not responsive to their surrounding environment, are needed, they provide ready-to-use, cheap and biologically well tolerated formulations. Despite the hydrogel network being charged due to the acrylate moieties, LNP, being positively or negatively charged, do not interfere with the hydrogel network [38]. The zeta potential of the whole system is governed by the surface charges of the hydrogel [38,61]. The facility to homogeneously disperse LNP in the pre-hydrogel solution

before starting the gelation process ensures an optimized controlled drug release. To formulate a Carbopol® hydrogel, the solid powder needs to be neutralized up to neutral pH (between 5.7 and 7^[62]) to free the bound alkali ions associated with the carboxylic moieties. Usually, electrolytes such as sodium hydroxide are added. With hybrid LNP-hydrogel systems, their use should however be avoided, as the alkali ions disrupt the ionic balance, leading to the aggregation of the LNP^[38,43]. As an alternative, non-ionic neutralizers can be added, such as triethanolamine or ethylenediamine.

In one recent study^[38], Carbopol®, xanthan, and hydroxypropylcellulose were compared as hydrogel support for nitrendipine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. As described earlier, the zeta potential (around -15 mV) and the size of the nanoparticles (around 200 nm) were not influenced by the hydrogel types. As displayed in Figure 1.7 for SLN, the drug release rate profile was similar for all the hydrogels types, but carbopol® gels displayed a higher final cumulative release rate of 54% after 24h for SLN and 64% after 24h for NLC. Finally, the Carbopol® gel was selected to carry out the *in vitro* (rat skin permeation) and *in vivo* tests (pharmacokinetics of nitrendipine and efficacy of hydrogels for treating hypertension in rats) because of its optimum rheological properties and thermal stability^[38].

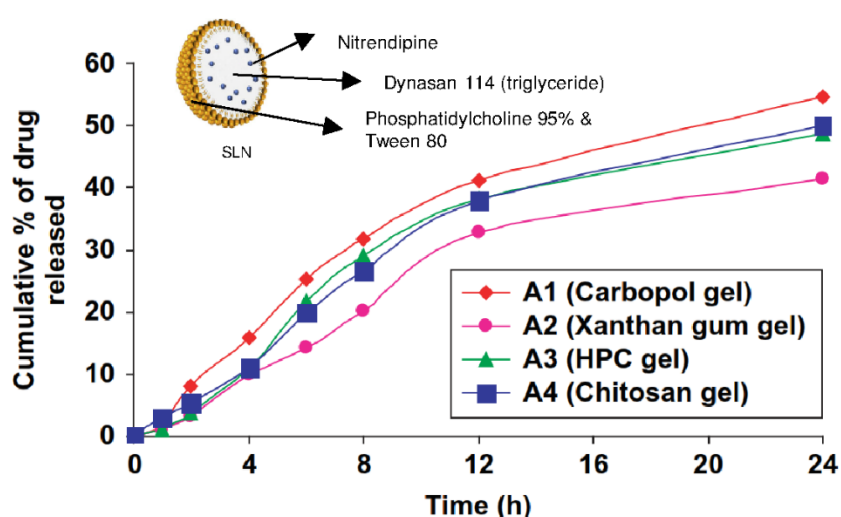


Figure 1.7. Cumulative time-release profile of nitrendipine-loaded SLN from different hydrogels. Adapted from^[38].

Another recent study confirmed the interest of dual systems composed of LNP and Carbopol® hydrogels. Four different dual delivery systems were developed for the sustainable release of voriconazole (a recent anti-fungal agent) [63]. By comparing microemulsions, nanostructured lipid carriers (NLC) and their combination with Carbopol®, the authors pointed out the benefit of the hybrid NLC-hydrogel system. The nanostructured lipid carriers were shown to prolong and control the release of the drug and to improve the permeation through the skin, while the Carbopol® hydrogels confirmed their ability to also slow down the release rate of voriconazole. The synergy between NLC and Carbopol® was clearly demonstrated by the higher quantity of drug permeating through the skin up to the dermis with the NLC-hydrogel hybrid system, closely followed by the NLC aqueous dispersion.

3.2. Thermo-responsive system: the use of poloxamer-based hydrogels

Stimuli-responsive hydrogels have gained much attention in the last ten years. They can be useful in many pharmaceutical applications: targeted and controlled drug delivery systems [64,65], tissue engineering [66], wound dressings [66,67] and smart diagnostic assays [67,68]. Their sol-gel transition can be triggered by several kinds of stimuli: change in pH and temperature [64–66,68,69], applying UV light [64,67], an electric or a magnetic field [67].

Among these, thermo-responsive hydrogels are very interesting for injectable drug delivery systems. In such case, the gelation process happens when the environment temperature raises from room temperature to body temperature. Poloxamers are FDA and EMA approved triblock copolymers composed of a central hydrophobic poly(propylene) oxide (PPO) unit flanked by hydrophilic poly(ethylene) oxide (PEO) units, depicted in Table 1.1. Thanks to their well-characterized thermo-reversible gelation process at specific concentration and temperature, poloxamers have been the most used components to synthesize biocompatible thermo-sensitive hydrogels. Two main poloxamers are usually found in these compositions: poloxamer 188 (commercialized under the name Pluronic® F68 by BASF) and poloxamer 407 (commercialized under the name Pluronic® F127 by BASF). Their chemical structures are respectively PEO₈₀-PPO₃₀-PEO₈₀ and PEO₁₀₆-PPO₇₀-PEO₁₀₆.

In that context, thermo-sensitive materials using poloxamers and lipid nanoparticles have been increasingly studied for specifically sensitive delivery routes: injectable [66,70], ocular [70,71] or rectal drug delivery [37]. These drug delivery systems allow a spatial and temporal

controlled and sustainable drug delivery at the site of application. As previously mentioned, lipid nanoparticles also improve the bioavailability of the encapsulated drug, an effect maintained in the case of association of LNP and hydrogels.

Hao and al. developed a thermosensitive hydrogel embarking Resina Draconis-loaded solid lipid nanoparticles for ocular drug delivery [70]. Ocular drug delivery is one of the most challenging type of topical drug delivery. The blinking reflex, the rapid tear turnover, the nasolacrimal drainage effect and the mechanical barrier constituted by the cornea, explain the low bioavailability of the drug after the delivery into the eyes [72]. Using the central composite factorial method [70], the authors determined the optimal concentrations of poloxamer 407 and poloxamer 188 used for the synthesis of a polymer gelling at the most suitable temperature. The results were 27.8% (w/v) of poloxamer 407, 3.55% (w/v) of poloxamer 188 for a gelling temperature comprised between 33.4°C and 35°C. The physical and biological characterizations gave an insight into the molecular interactions in the drug delivery system. LNP size strongly increased from 150 nm to 450 nm after incorporation in the hydrogel. This important modification could be due to the adsorption and entanglement of the poloxamer 188 chains onto the surface of the lipid nanoparticles. The association of LNP and hydrogels showed promising biological results: the whole system did not trigger any *in vivo* irritation to the cornea, and improved the trans-corneal delivery of lipophilic drugs [70].

In one recent study, Din and al. used a double thermo-responsive drug delivery system [37]. By associating a mixture of poloxamer 407, poloxamer 188 and Tween 80 with thermo-responsive irinotecan-loaded lipid nanoparticles, they created a system homogeneous at 25°C, but displaying two phases at 36.5°C. As displayed in Figure 1.8, lipid nanoparticles have a neat circular shape and an average hydrodynamic diameter of 178 nm at 25°C. The hydrogel is still in a liquid state. At 36.5°C, lipid nanoparticles display larger size, as well as fuzzier edges on TEM images. LNP seem to be in a liquid state, while the hydrogel already underwent its sol-gel transition. The system also showed improved pharmacokinetic parameters: the irinotecan release rate was delayed and the maximal concentration of released drug decreased giving a controlled and sustainable drug delivery profile. Irinotecan being a potent and highly toxic anticancer agent, its systemic side effects are harmful for the patient. In that regard, the fact that irinotecan plasma concentration remained at a rather low level longer

than all the other tested systems was a very good pharmacokinetics indicator. Moreover, contrary to other drug delivery systems presently available for intramuscular delivery, the *in situ* gelling did not initiate any irritation or local damage to the surrounding muscular tissues after injection. Poloxamer/irinotecan-LNP therefore appears as a very good tool in the treatment of metastatic colorectal cancers. This system would be a promising sustainable material for intramuscular delivery with reduced side effects.

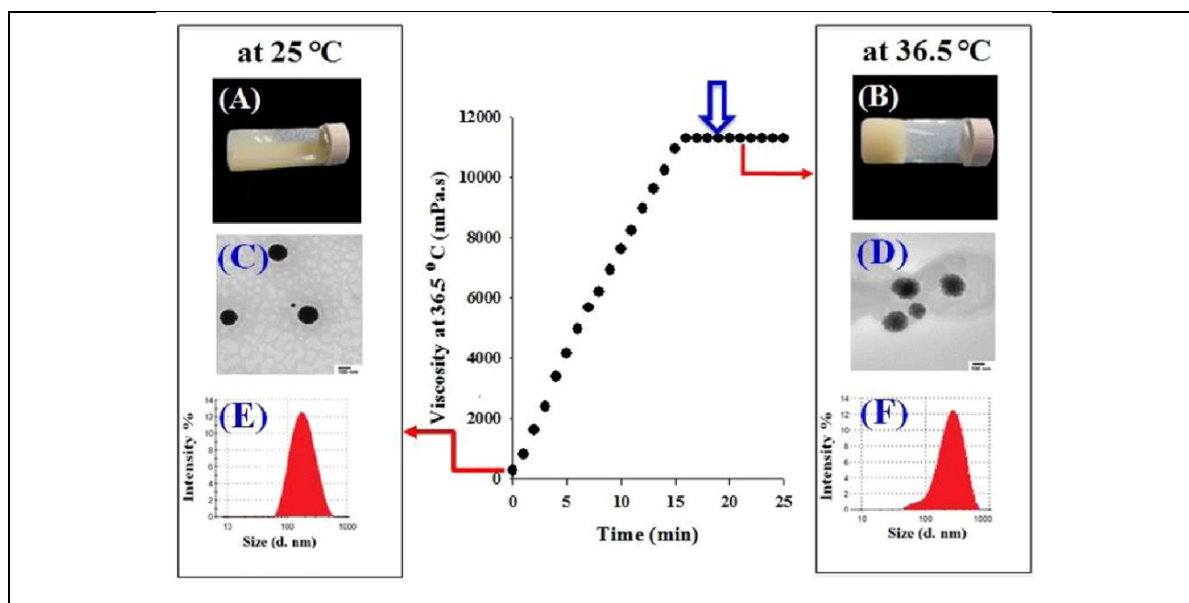


Figure 1.8. Schematic representation of the irinotecan-loaded SLN-hydrogel system behaviour at 25°C and 36.5°C. Adapted from [37].

Synthetic poloxamers however display one major drawback when it comes to pharmaceutical applications. They lack adhesiveness, in particularly regarding biological tissues such as skin, nasal or lung mucosa for instance. Therefore, Lee and al. added to a LNP-poloxamer hydrogel formulation a small amount of xanthan, a biocompatible polysaccharide known for its bio-adhesion properties as well as its ability to considerably delay drug delivery [73]. In this recent study, curcumin-loaded lipid nanoparticles were added to an aqueous solution of 23% (w/w) mixture of poloxamer (407 and 188), 0.05% to 0.20% (w/w) xanthan, and double-distilled water, to create a hydrogel for transdermal drug delivery. The skin temperature being 32°C, different amount of poloxamer 407 (P407) and poloxamer 188 (P188) were tested to obtain a tailored gelling temperature. At a ratio of 10:90 (P407/P188), the hydrogel underwent its sol-gel transition a bit under 30°C. The inclusion of curcumin-loaded LPN in poloxamer/xanthan (P/XG) hydrogels did not significantly influence their physical

parameters. The authors also compared the drug release behavior and the adhesiveness of the system LNP - P/XG hydrogel and of the system LNP – P hydrogel. While the drug release rate remained close for both hydrogels, the adhesiveness was higher and stronger with the addition of xanthan, as expected. As previously reported in other studies mentioned above [37,70], the association of LNP with the P/XG hydrogel slowed down the release rate of the active ingredient, and decreased the maximal concentration of released drug. The addition of a polysaccharide successfully added biological properties to the transdermal, thermo-sensitive, double drug delivery system.

3.3. Polysaccharide based hydrogels

In the biomedical field, polysaccharides have sparked the interest of researchers because of their attractive properties [74]. They are composed of long chains of monosaccharide units bound together by glycosidic linkages. Their advantages in the synthesis of hydrogels for medical applications lie in several features. They are naturally abundant, biocompatible, mucoadhesive, biodegradable, have a high affinity toward water and allow for a wide range of chemical modifications [74–76]. Moreover, the chemistry involved in their structural modifications can generally be carried out in mild conditions, which is a great asset for future medical applications.

Used in their natural state, polysaccharide hydrogels display rather poor mechanical properties. For example, they can be too brittle or too fragile or even start to degrade at physiological pH. Two strategies can be used to overcome these limitations. They consist in modifying the polysaccharide backbone, or in combining polysaccharides with other synthetic polymers. These two strategies have been used to design hybrid LNP-polysaccharide-based hydrogel systems. Table 1.2 summarizes different combinations of polysaccharide-based hydrogels and LNP, which are discussed in the following sections. Figure 1.9 displays the percentage of the different polysaccharides used over the last 10 years in combination with LNP. The statistical bibliography analysis was carried out on the database Scopus, yielding 30 relevant results. Three most used polysaccharides in combination with LNP can thus be highlighted: chitosan (27% of occurrence), cellulose (23%) and xanthan (27%). Dextran (10%) and alginate (10%) are also quite importantly represented. Xanthan

was mainly used for its viscosity enhancing properties and generally plays a role in LNP-hydrogel formulation similar to that previously described for poly(acrylic acid) in section III.1. It will not be further discussed in this review. Following sections focus on the different other polysaccharides.

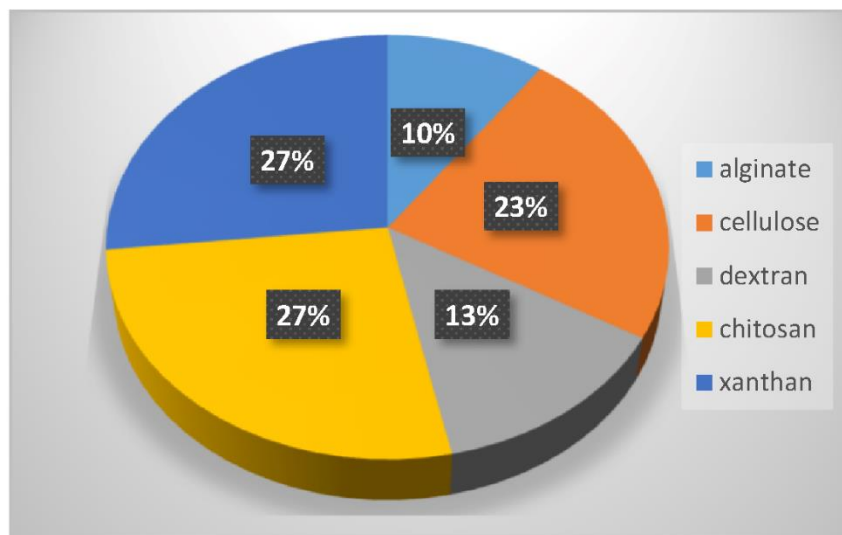
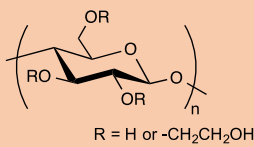
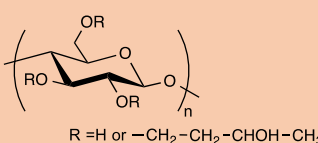
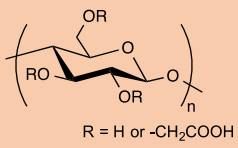
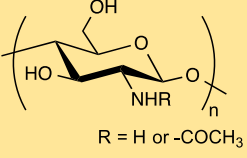
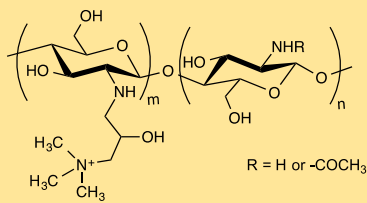
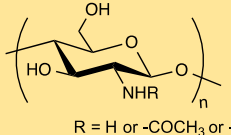
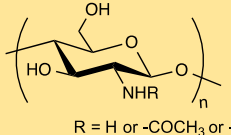
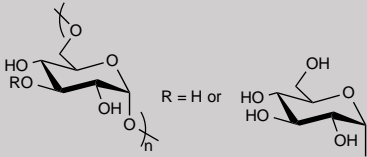
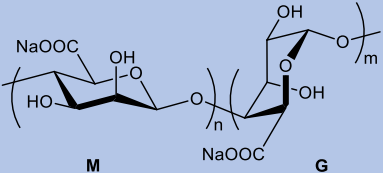
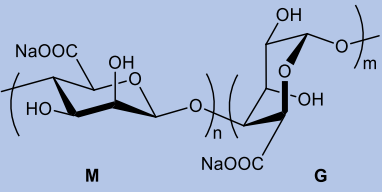


Figure 1.9. Percentage of the different polysaccharides used in the last 10 years in combination with LNP.

Table 1.2.: Combination of LNP and polysaccharide-based hydrogels in the past 5 years

Polysaccharide	Associated polymer	Type of LNP/drug	Reference
Hydroxyethylcellulose  $R = H \text{ or } -CH_2CH_2OH$		NLC ($\approx 120 \text{ nm}$) // Topotecan LNE ($\approx 280 \text{ nm}$) // Copaiba oil	[77,78]
Hydroxypropylmethylcellulose  $R = H \text{ or } -CH_2-CH_2-CHOH-CH_3$		SLN ($< 100 \text{ nm}$) // Avanafil	[79]

<p>Carboxymethylcellulose</p>  <p>R = H or -CH₂COOH</p>		<p>SLN (≈140 nm) // 5-Fluorouracil</p>	<p>[80]</p>
<p>Chitosan</p>  <p>R = H or -COCH₃</p>	<p>PEG</p>	<p>NLC (50 nm and 120 nm) // Dil</p> <p>SLN (≈200 nm) // Nitrendipine</p> <p>LNE (≈280 nm) // Copaiba oil</p> <p>NLC (≈ 120 nm) // Topotecan</p> <p>SLN (< 100 nm) // avanafil</p>	<p>[81]</p> <p>[38,77–79]</p>
<p>Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan</p>  <p>R = H or -COCH₃</p>	<p>Pluronic® F127</p>	<p>NLC (≈150 nm) // Ibuprofen</p>	<p>[39]</p>
<p>Carboxymethyl chitosan</p>  <p>R = H or -COCH₃ or -CH₂COOH</p>	<p>Hyaluronic acid</p>	<p>Sponge scaffold // Andrographolide</p> <p>NLC (≈65 nm) // Dexamethasone</p>	<p>[82]</p> <p>[72]</p>
<p>Carboxymethyl chitosan</p>  <p>R = H or -COCH₃ or -CH₂COOH</p>	<p>Pluronic® F127</p>	<p>NLC (≈75 nm) // Quercetin</p>	<p>[83]</p>

<p>Dextran</p> 		<p>SLN (130-270 nm) // Ketoconazole</p>	<p>[48,84,85]</p>
<p>Alginate hydrogel</p> 		<p>NLC (\approx 85 nm) // Amphotericin B</p>	<p>[86]</p>
<p>Alginate beads</p> 		<p>LNE (<100 nm) // \emptyset</p>	<p>[87]</p>

3.3.1. Hydrogel-lipid nanoparticle systems based on cellulose derivatives

Cellulose is the most abundant of natural biopolymers, as it can be found in plants and all kinds of natural fibers. It fulfills two key features that explain its common use in biomedical applications: it is biocompatible and biodegradable. However, due to its structure (Table 1.2) and numerous hydrogen bonds created between polymer chains, cellulose is highly rigid and semi-crystalline: it is not soluble in water and in most common organic solvents. To overcome these issues, hydroxyl groups from the glucose units of cellulose are generally chemically modified through esterification or etherification ^[88]. In the pharmaceutical field, the most used cellulose derivatives, also called cellulose derivatives, are hydroxyethylcellulose (HEC), hydroxypropylcellulose (HPC), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), and sodium carboxymethylcellulose (CMCNa) ^[89]. They are all water-soluble and commercially available with various molecular weights, degrees of substitution and positions of the substituents. These parameters determine the physico-chemical properties of the cellulose ethers such as

their viscosity in solution, their surface activity, their sensitivity to biodegradation and to oxidative stress.

A first way to control the release profile of a drug from a cellulose-based material is to design the complete drug delivery system based on surface charge interactions. Pure hydrogels of cellulose were used to entrap lipid nanoparticles loaded with 5-fluorouracil ^[80] and topotecan ^[77] (two hydrophilic chemotherapeutic agents active against carcinoma), avanafil ^[79] (a hydrophobic molecule active in the erectile dysfunction) and nano-emulsified copaiba oil ^[78] (anti-inflammatory essential oil).

Khallaf and collaborators tested three different hydrogels to introduce 5-Fluorouracil-loaded LNP with a size of 140 nm ^[80]. They tested chitosan (a positively charged biopolymer), hydroxypropylcellulose (neutral, hydrophilic polymer) and sodium carboxymethylcellulose (negatively charged polymer). The best permeation parameter, defined as the cumulative amount of drug permeated after 24h per unit area and measured thanks to a modified Franz cell, was obtained with CMCNa. This result was explained by the electrostatic interaction between the positively charged lipid nanoparticles and the negatively charged CMCNa network ^[80]. In the study of the kinetics of release of avanafil from neutral LNP embedded in hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films, a neutral cellulosic network ^[79], LNP-loaded HPMC films also showed a better cumulative diffusion of avanafil compared to the LNP-loaded chitosan films, after the initial release phase. The release kinetics of LNP from HPMC films followed the Fick's second law diffusion model and, in this context, neutral HPMC films seemed more adapted to the diffusion of LNP compared to the positively charged chitosan films.

In another case ^[78], lipid nanoparticles containing copaiba oil were also synthesized with positive and negative surface charges. In this recent study, after testing three different hydrogels (chitosan, Carbopol 980 and hydroxyethylcellulose), HEC hydrogel was the only one tested that did not show any interference in the stability parameters for both positive and negative LNP. The study also showed that the anti-inflammatory effect of the complete system remained successfully equivalent to that of ketoprofen (a well-known non-steroidal anti-inflammatory drug). Venancio and collaborators ^[77] also pointed out that the neutral charge of HEC films encapsulating topotecan-loaded LNP allowed the lipid nanoparticles to

be more retained in the *stratum corneum* and in the deeper layers of the skin, when compared to LNP-loaded chitosan films. Because of its neutral charge, HEC polymer was then proven to have a wide range of application as LNP host.

A second way to control the release of the drug loaded in LNP-hydrogel systems is to play with the density of the hydrogel network. A hybrid hydrogel has been developed by Racine and collaborators^[81] thanks to a UV photo-activated thiol-ene cross-linking reaction. Adding a second polymer in the hydrogel network makes easier to precisely modulate the density of cross-links. Alkene-functional CMC and poly(ethylene)-bis(thiol) concentrations were then modified to obtain three different hydrogels with various degrees of crosslinking defined by the ratio R of the thiol moiety concentration divided by the alkene group concentration ($R=[SH]/[=]$). Gels with $R=0.2, 0.5$ and 1 were formulated. LNP of different surface charges and diameters were then included in the hydrogels. The influence on the release rate of the fluorescent molecule (used as a drug model) of the gel rheological behavior and swelling ratio was tested. The presence of the LNP did not affect the mechanical properties of the gels. Even a high LNP/CMC payload (50% w/w_{CMC}) did not influence the gelation kinetics. On the other hand, the particle charge and the concentration of cross-links changed the release kinetics. As expected, the softest hydrogel ($R=0.2$) showed the higher release rate. A smaller crosslinking degree led to a looser network, facilitating the diffusion out of the hydrogel for the lipid nanoparticles. The release profile followed once again the Fick's second law of diffusion model. It was possible to model the behavior of the LNP into the network, taking into account steric hindrance and electrostatic interactions. Aside from the nanoparticle and hydrogel network surface charges, it is then possible to play on the concentration of the hydrogel cross-links to modulate the long-term LNP release rate.

3.3.2. Hydrogel-lipid nanoparticle systems based on chitosan derivatives

Chitosan owns unique physico-chemical and biological properties justifying its common use in biomedical applications^[90]. Aside from being highly biocompatible and biodegradable, it possesses hemostatic properties that makes it an attractive biopolymer building-blocks for the design of wound dressings. The specific physico-chemical properties of CS offer many ways of

processing it in the form of sponges, films, and hydrogel networks with specific features such as injectability and stimuli-responsiveness [81].

However, when used as the main component of the hydrogel network, chitosan also displays some disadvantages for LNP composite hydrogels. First, it is generally accepted that chitosan is insoluble in neutral or alkaline aqueous solutions. The brittleness of chitosan hydrogels is also not adapted to dermal, transdermal or wound dressing applications [82].

Moreover, it has already been reported that contrary to cellulose derivatives, chitosan influences the LNP parameters after their inclusion into the hydrogel network. Lucca and al. [78] described an increase in the droplet size of lipid nanoemulsion (LNE) from 247 nm to 524 nm and in the polydispersity index (PDI) values from 0.051 to 0.489 after their inclusion in a chitosan gel. Among the different causes, the interactions between the protonated amine group of the chitosan network and the surface charges of LNE may trigger the aggregation of small droplets, explaining the increase in PDI values [78]. In addition, the strong electrostatic interactions between chitosan polar groups and the LNE surface charge prevent most of LNE from crossing the first skin barrier [77] explaining why less LNE remain on the *stratum corneum* after material application compared to cellulosic-based LNE-hydrogel formulation [78]. However, LNE have been found in deeper layers of the skin when LNE-loaded chitosan hydrogels were used in comparison to cellulosic-based hydrogels. The polar groups of the chitosan might be able to open the tight junction between membranes of deeper skin layers, leading to further penetration of some LNE.

As described earlier, topical drug delivery into eyes is challenging. Thermo-sensitive synthetic polymers such as poloxamer 407 (Pluronic® F127) display interesting *in situ* gelling properties, improving the pre-corneal residence time of the drug without creating irritation. As already mentioned, one main drawback of such synthetic polymers is that they lack bio-interactions. On the contrary, chitosan is a good candidate to enter ocular delivery formulations since it displays very interesting bio-adhesion properties. The amino groups of the chitosan network are known to form secondary chemical bonds (hydrogen bonds or electrostatic interactions) with the negatively charged sialic acid moieties of mucins [39]. Therefore, one of the main solutions suggested to prolong the residence time of the drug into the eyes is to use thermo-sensitive chitosan-based hydrogels. By combining chitosan with a synthetic block copolymer

such as poloxamer 188 [39,83] or with β -glycerophosphate [72], the hybrid system retained the biological properties of chitosan while being thermo-responsive, as shown in Figure 1.10. In a liquid state at room temperature, these gels underwent a sol-gel transition at a tunable temperature to become a semi-solid system. Almeida and collaborators demonstrated that a hybrid drug delivery system of ibuprofen-loaded LNP in a 1% chitosan and 20% of poloxamer 407 dispersion was suitable for ocular drug delivery [39]. The system displayed appropriate rheological and mucoadhesive properties at pH=7.4, minimal influence on LNP parameters, respecting the physiological limits of particle size and zeta potential before causing ocular irritation, no burst release effect (only 25% of ibuprofen released after 3h), and a prolonged pre-corneal residence time.

Modification of chitosan backbone can also be carried out, either to bring new properties to the drug delivery system such as pH sensitivity, or to further improve biological properties. In that respect, two chitosan derivatives have been used in combination with the same thermo-sensitive poloxamer 407. Carboxymethyl chitosan (CMCS) is a water-soluble chitosan derivative that exhibits pH sensitivity in addition to biocompatibility and bio-adhesion. Mixing CMCS with poloxamer 407 and crosslinking the whole mixture with genipin [83], created a hybrid hydrogel displaying pH- and thermo-sensitivity. The resulting network successfully integrated quercetin-loaded NLC to form a biocompatible, smart and sustainable system designed for ocular drug delivery. After 72h under physiological conditions (i.e. at 35°C and pH=7.4), 20% of the encapsulated quercetin remained in the hydrogel [83]. Hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan (HAAC) is a partially quaternized water-soluble chitosan derivative used by Tan and collaborators to synthesize a thermogel undergoing *in situ* sol-gel transition at 35°C, in combination with β -glycerophosphate [72]. Thanks to its cationic quaternary amino group, HAAC is able to strongly bind to the negatively charged surface of the cornea. It is thus viewed as a promising permeation enhancer for the paracellular way of absorption. Dexamethasone, a potent glucocorticoid anti-inflammatory agent, was successfully entrapped within lipid nanoparticles embedded in this thermogel [72]. This thermo-sensitive gel then appeared suitable for ocular drug delivery under physiological conditions.

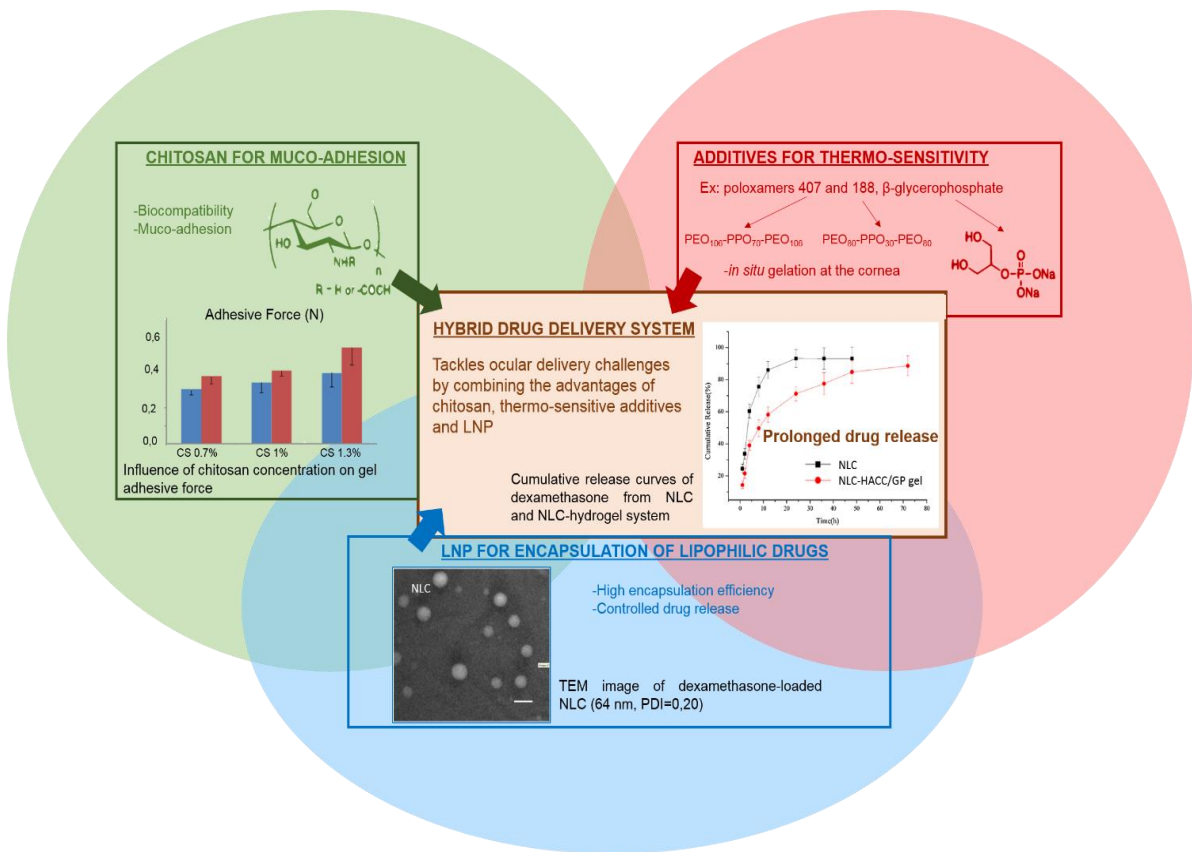


Figure 1.10. Advantages of combining several components to formulate an innovative drug delivery system that meets ocular administration route expectations. Adapted from [39,72,78].

A novel 3D scaffold integrating nanostructured lipid carriers was used recently [82]. Synthesized from hyaluronic acid and chitosan, these highly porous sponges showed a controlled but fast release of the encapsulated drug. Andrographolide (a wound healing agent shortly called AND) loaded in NLC was totally released after 48h at physiological pH. Interestingly, the presence of NLC in the sponge network slightly decreased its swelling behavior after 1, 4 and 7 days. H-bonding and hydrophobic interactions between the NLC coating surfactant, polyoxyethylene 20 cetyl ether, and the chitosan structure, could be at the source of this phenomenon. Wound healing activity of the AND-NLC-scaffolds was enhanced when compared to the controls (NLC dispersion and empty scaffold) [82]. The HA-chitosan scaffold alone displayed a certain anti-inflammatory and antioxidant activity, explaining the better results when both NLC and hydrogels components were joined together in the final system [82].

3.3.3. Hydrogel-lipid nanoparticle systems based on alginate derivatives

Alginate is a naturally occurring anionic polysaccharide extracted from brown algae. It is a copolymer composed of 1-4-linked β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid units that undergoes a conformation change in the presence of divalent cations to quickly form a gel [75]. Alginate hydrogel is commonly used in pharmaceutical applications because of its biocompatibility, its easy processing and the low costs to produce gel beads. In that regard, alginate seems to be a good candidate to encapsulate lipid nanoparticles in gel beads.

One of the first challenges to address is to evaluate the integrity of LNP after their encapsulation in the calcium alginate beads. Beside size measurements, few techniques give information about the state of lipid nanoparticles within alginate beads. Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used by Strasdat and collaborators to measure the influence of several bead production methods (electrostatic droplet generation method or spraying method) and processes (freezing and lyophilisation) on the structure and quantity of lipids constituting the core of LNP (with a diameter < 100 nm) embedded in alginate capsules (with a diameter from $45 \mu\text{m}$ to 1.3 mm). They concluded that the electrostatic droplet generation method was mainly harmless to the LNP, producing alginate beads from circa $300 \mu\text{m}$ to $1000 \mu\text{m}$. Smaller alginate beads of $45 \mu\text{m}$ were possible to obtain thanks to the spraying method. However, this method was found to degrade the LNP melting pattern. The shear forces applied during the producing process as well as the drying process must put an important strain on LNP structure altering the lipid state. When it comes to the purification step, freezing of LNP-loaded alginate beads is interestingly possible with the addition of a sufficient amount of cryogenic protector. It is also not a surprise that lyophilisation intensely altered the state of the incorporated lipids [87].

One of the key features of these gel beads are their sensitivity to pH. At low pH, the hydrogel swelling ratio is low, the hydrogel keeping its structure integrity. At pH around 7, the hydrogel starts to swell and to degrade [86]. This particularity has been exploited by Senna and collaborators, to encapsulate LNP in calcium alginate beads for oral drug delivery [86]. The resistance of the calcium alginate beads at low pH enabled the protection of the encapsulated LNP through the very aggressive environment of the stomach. Then, the increase of the hydrogel swelling ratio due to the higher intestinal pH caused the release of the beads content

in the intestinal track, where it was best absorbed by the body. The influence of the alginate mass ratio and the calcium concentration of gelling solutions was studied. Densifying the hydrogel network by increasing the alginate mass and the concentration of the crosslinking agent improved the pH sensitivity of the hydrogel beads [86].

3.3.4. Hydrogel-lipid nanoparticle systems based on dextran derivatives

Contrary to the other widely used polysaccharides such as alginate, chitosan or hyaluronic acid, dextran does not possess chemical functional groups allowing easy further chemical modifications. On the other hand, it displays an excellent biocompatibility. Once modified, it is possible to use it for a wide range of applications. For instance, dextran can act as promoter of epithelial cell adhesion, or as anti-inflammatory molecule [91,92]. One of the first examples of a drug delivery composite system composed of solid lipid nanoparticles (SLN) and hydrogels has been developed with methacrylate-modified dextran (dextran-MA) [48]. UV photo-activation of the methacrylate moieties of the dextran allowed the formation of the hydrogel in a short time, entrapping the SLN already dispersed in the aqueous solution within the polymeric network. The process of formation of the hydrogel did not damage the structure of the SLN. After 2h of incubation in a 0.1M HCl solution, simulating the gastric transit, only 40% of the ibuprofen encapsulated in the SLN was released. On the contrary, other systems (ibuprofen-dextran-MA, ibuprofen-loaded SLN) typically showed burst release profiles [48]. This example constitutes one of the first occurrences of a composite system with SLN entrapped in hydrogel compatible with a controlled release of the active molecule in an oral formulation [48]. Later on, the system was tested with a more sensitive anti-fungal molecule called ketoconazole [84]. The complete system still showed promising results during the characterization of the release profile, as well as satisfactory stability of the drug itself. This molecule being known to be influenced by the environmental conditions [93], Paolicelli and collaborators tested its efficiency at different pH. The whole loaded SLN-dextran system was as effective as the commercial cream (Nizoral) at pH=5 and pH=7, displaying its ability to retain the activity of the encapsulated molecule. This system was also able to be modified to obtain the right rheological properties needed for a convenient use from the patient. Tailoring the derivatization degree and dextran concentration could easily change from a semi-solid consistency, a good spread-ability or a rigid hydrogel that remained at its site of application

[85]. Densifying the hydrogel network by increasing the polymer concentration and the derivatization degree did not influence the release rate of the ibuprofen, the drug still being much smaller than the size of the meshes [84].

Conclusion

Different LNP-hydrogel hybrid materials have been designed and studied as drug delivery systems for dermal, transdermal, ocular, intramuscular and transmucosal delivery routes. The combination of LNP and hydrogels have given promising results, as hybrid materials combine the properties of both types of drug delivery systems. The biocompatibility, the dramatically improved stability of the encapsulated drug and the possibility to precisely control the drug release kinetics, both spatially and temporally, make these hybrid systems versatile, tunable and suitable for a wide range of applications. New findings on the analytical methods to evaluate LNP stability have allowed researchers to get a better understanding of the interactions between the nanocarriers and hydrogel networks, leading to a better control of drug release. These successful formulations can specifically improve the ocular, dermal, and oral routes, which are particularly challenging.

In the recent years, emphasis has been put on the development of smart hydrogels, able to respond to an external stimulus such as pH changes, temperature changes or mechanical triggers. They not only act as scaffold for the LNP aqueous dispersion, but also play an active role in the spatial and temporal control of the drug release. For example, poloxamers have been extensively studied for their thermo-responsive properties. In this context, polysaccharide-based hydrogels have shown exceptional properties. Specifically, their high biocompatibility and their simple and easy-to-control chemical modifications make them attractive building blocks for the development of such hydrogels. The combination of several polysaccharides or the combination of polysaccharides with synthetic polymers have yielded the design of original hybrid systems, able to critically tune the drug release.

Despite the significant progresses made in the last two decades, further studies are still to be carried out on the thorough characterization of these hybrid systems. Mechanisms of drug release control are still not very well understood and need further investigations. Mechanical properties are not yet systematically evaluated, rendering system performance comparison not always appropriate and the overall outlook of such technology shallow. The wide range of

features that smart polysaccharide-based hydrogels offer is yet to be fully explored and this type of materials would benefit from further researches.

If the clinical potential of such LNP-hydrogel drug delivery systems have been demonstrated with multiple *ex vivo* and *in vivo* trials, the market development of LNP-hydrogel hybrid systems is not as fast as it could be expected. There is still a large gap between academic research studies and the use of materials in the clinics. However, the interesting properties and advanced functionalities of LNP-hydrogel hybrid systems should yield to the development of innovative drug delivery solutions in dermal, transdermal, ocular and oral delivery routes in the future. In this context, it will also be interesting to collect more data on the long-term effects of these materials in the frame of clinical studies.

Funding: C. Desfrancois thanks the “Investissements d’avenir” program Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) of the French National Research Agency for PhD funding.

Acknowledgments: LETI/DTBS and CERMAV are supported by the French National Research Agency in the framework of the “Investissement d’avenir” program Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) and Arcane Labex (ANR-12-LABX-003).

Conflicts of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

1.3. Hydrogels étirables pour les patchs transdermiques

Comme il a été évoqué précédemment, le patch transdermique pour la libération contrôlée de molécules anti-inflammatoires doit idéalement combiner biocompatibilité, stabilité de la matrice et du principe actif, robustesse et capacité d'extension pour faire face aux activités quotidiennes du patient. La revue précédente (partie 1.2.2) a présenté des solutions pour améliorer la stabilité de composés hydrophobes, comme les molécules anti-inflammatoires, au sein des hydrogels et contrôler leur libération. Le paragraphe suivant va s'intéresser aux propriétés mécaniques des gels et plus particulièrement, leur capacité d'extension. Ainsi, le dispositif de libération transdermique doit être biocompatible tout en présentant une souplesse semblable à celle de la peau.

Les matériaux dédiés à la libération de principes actifs sensibles aux stimuli mécaniques du corps humain exploitent trois types de forces appliquées de façon interne ou externe : les forces de traction (ou étirements), les forces de compression et les forces de cisaillement. Elles sont générées par les mouvements des articulations, des muscles internes, de la circulation cardio-vasculaire ou encore par une action extérieure et volontaire du patient.

On trouve des forces de traction imposées par les mouvements à différentes localisations du corps humain : au niveau des différents muscles, de la peau, des tendons et des articulations osseuses. La variation de l'amplitude des forces exercées par ces contraintes est grande. Des forces de tractions cellulaires (~ 100 nN ^[94]) au forces maximales exercées par un muscle (675 ± 120 N ^[95]), il peut y avoir jusqu'à 9 ordres de grandeurs. Ces forces imposent des déformations aux tissus biologiques. Ainsi, le cerveau et la colonne vertébrale doivent être capables de se déformer jusqu'à 20% de leur forme initiale, les muscles jusqu'à 30% et la peau entre 40 et 80% ^[96]. Par exemple, la flexion du genou déforme la peau de l'articulation jusqu'à 50% ^[97]. La peau humaine est par ailleurs constituée de trois couches (l'épiderme, le derme et l'hypoderme) qui en font un matériau hautement hétérogène et anisotrope. Il est ainsi difficile de décrire de façon absolue ses propriétés mécaniques ^[98]. Les valeurs globales de module de Young retrouvées dans la littérature varient jusqu'à 3 ordres de grandeur (de 7 kPa à 1,1 MPa) et dépendent fortement de l'âge, du site anatomique et du degré d'hydratation ^[99].

Les forces de compression internes au corps humain proviennent des tensions entre les cartilages et les os au sein des articulations. Le patient peut également décider de

volontairement appliquer une pression des doigts sur une zone ciblée en particulier pour déclencher la libération d'un principe actif.

Les forces de cisaillement sont surtout générées par les mouvements de la circulation cardiovasculaire.

Parce qu'elles sont facilement exécutées par tous types de patients et qu'elles se combinent bien avec le contrôle temporel et spatial d'administration des molécules thérapeutiques à travers la peau ainsi que leurs dosages, les forces de tractions et de compression extérieure volontaires seront les premières exploitées dans le cadre de la conception de patches transdermiques sensibles à leur environnement.

La matrice polymérique doit donc être capable de résister à de grandes déformations exercées par étirement. De la même façon, elle doit présenter une certaine résistance à la compression et à la fracture pour ne pas être détériorée lors de l'utilisation quotidienne par le patient. Les sections suivantes feront l'état de l'art d'une part sur les stratégies pour renforcer les propriétés mécaniques des hydrogels (section 1.3.1) avec un zoom sur les polyrotaxanes et leur utilisation dans les « slide-ring » gels (section 1.3.2), et d'autre part sur les stratégies de déclenchement de la libération du PA par un stimulus mécanique (section 1.3.3).

1.3.1 Améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels ...

Les polymères utilisés dans les patches transdermiques à libération passive sont majoritairement d'origine synthétique : on trouve ainsi les poly(éthylène glycol) (PEG) réticulés, les poly(acides acryliques) (PAA) notamment sous les noms commerciaux d'Eudragit et Carbomer, ou encore les alcools polyvinyliques ^[100]. Dans ces deux derniers cas, l'ajout de plastifiants comme du dibutyl phtalate est souvent nécessaire pour obtenir les propriétés mécaniques adéquates à l'utilisation sur la peau. L'utilisation des PEG impose également l'ajout d'agent réticulant, suivant la méthode chimique utilisée pour la réticulation. Du côté des polysaccharides, l'hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) a été utilisée pour la confection d'une matrice dans un patch transdermique de propanolol ^[101], mais forme des films difficilement manipulables (cassants et fragiles).

L'ajout d'agents plastifiants ou réticulants n'étant pas approprié à la synthèse d'hydrogels pour des applications qui nécessitent une biocompatibilité stricte, c'est alors dans la

conception de l'architecture de l'hydrogel qu'il faut chercher des alternatives pour améliorer les propriétés mécaniques.

1.3.1.1. ... Par l'introduction d'interactions secondaires au sein du réseau

Une première stratégie envisageable est de renforcer le réseau en ajoutant des liaisons secondaires sacrificielles. Ces interactions faibles offrent la possibilité aux liaisons interchaînes de se réorganiser plus facilement que des liaisons covalentes. Ainsi, grâce à l'énergie dissipée lors de la cassure et reformation des liaisons non covalentes, elles améliorent les propriétés d'extension, de résistance à la fracture, voire apportent des propriétés d'auto-réparation aux hydrogels. Les interactions physiques utilisées pour ce mécanisme de renforcement sont habituellement les interactions électrostatiques ^[102,103], les liaisons hydrogènes ^[104], les interactions de Keesom ^[105] et les interactions hydrophobes ^[106]. Les propriétés mécaniques obtenues avec ces méthodes sont très intéressantes, atteignant jusqu'à plusieurs dizaines de MPa en module de Young ^[105] (dans le cas des hydrogels basés sur les interactions entre dipôles) ou des capacités d'extension jusqu'à 1800% ^[104] (dans le cas des hydrogels basés sur des liaisons hydrogènes comme présenté dans la figure 1.11A). Les interactions physiques sont toutefois particulièrement sensibles à leur environnement, notamment en conditions physiologiques. Par exemple, les propriétés mécaniques des hydrogels basés sur des réticulations ioniques (Figure 1.11B) sont fortement dépendantes de la force ionique du milieu ^[107]. De la même façon, la formation de liaisons hydrogène peut-être concurrencée par les molécules d'eau du solvant, amenuisant les propriétés mécaniques de l'hydrogel synthétisé par Zhang et al. (Figure 1.11A) ^[104].

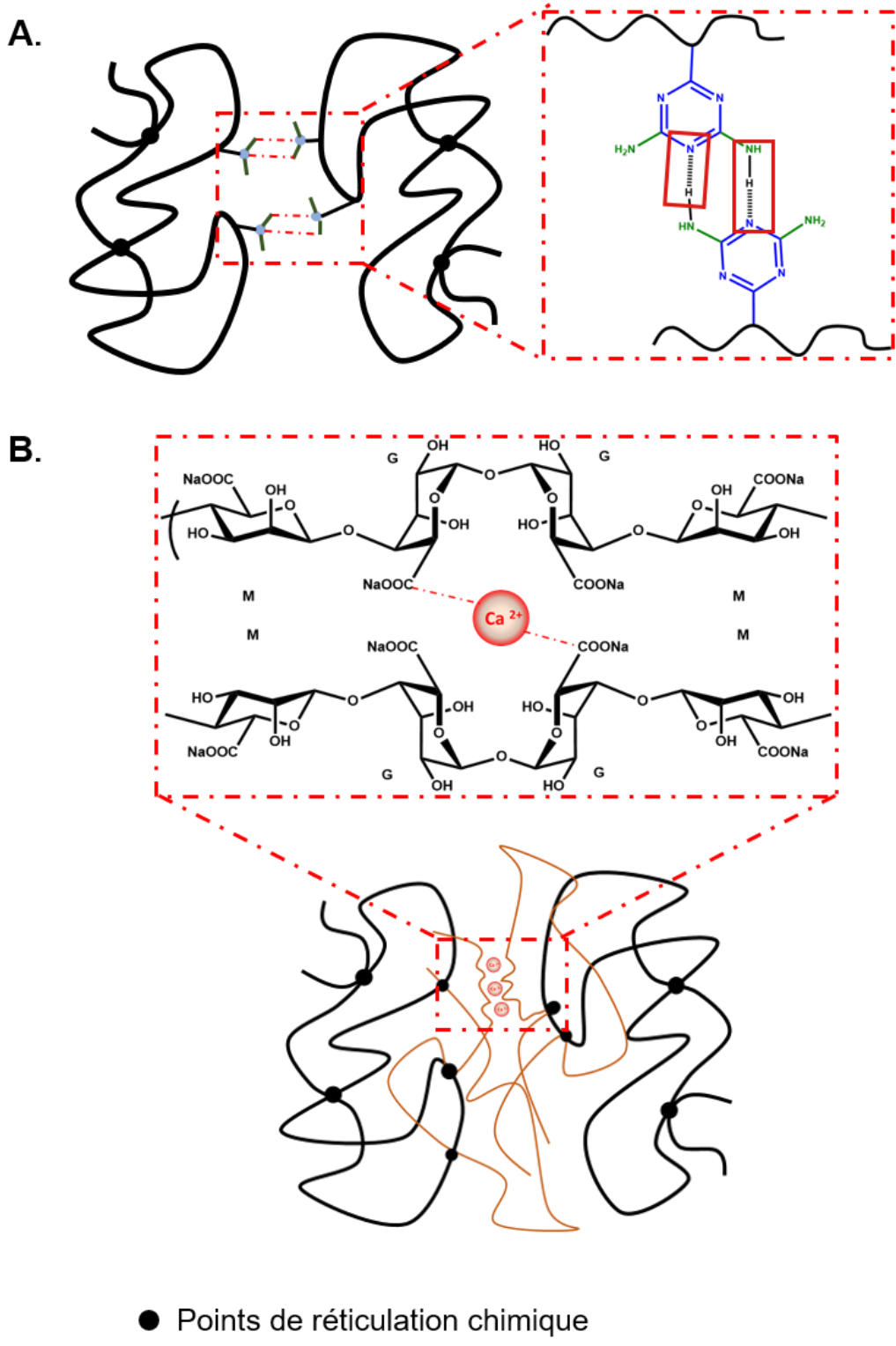


Figure 1.11 : Deux exemples d'hydrogels associant réticulation chimique et réticulation physique avec des liaisons hydrogènes (A, adaptée de ^[104]) ou avec des liaisons ioniques (B, adaptée de ^[102]).

1.3.1.2. ... Par l'amélioration de l'homogénéité du réseau

La réticulation grâce à des liaisons covalentes est plus forte (l'énergie de dissociation d'une liaison covalente C-C est 347 kJ/mol ^[108] alors que celles pour des interactions secondaires est 10 à 100 fois plus faible ^[109]) et donc moins soumise directement aux variations de conditions du milieu physiologique. Toutefois, l'inhomogénéité du réseau augmente également avec le degré de réticulation ^[110]. Cette inhomogénéité structurale affaiblit les propriétés mécaniques de l'hydrogel. La deuxième stratégie pour renforcer l'hydrogel face aux contraintes mécaniques consiste donc à rendre le maillage de l'hydrogel le plus homogène possible, en choisissant judicieusement son architecture. Par exemple, en utilisant des poly(éthylène glycol)-4-bras (avec des bras symétriques de la même taille) avec des fonctions réactives, un réseau remarquablement homogène est formé. Ainsi, Sakai et al. ont synthétisé un hydrogel grâce à deux PEG à 4 bras distincts, fonctionnalisés avec des amines et des esters de succinimidyle respectivement en condition stœchiométriques 1:1, capable de supporter des charges jusqu'à 2.5 MPa en compression uniaxial ^[111]. Le respect des conditions stœchiométriques est un élément déterminant dans l'uniformité du maillage de l'hydrogel et donc de ses propriétés mécaniques, ce qui rend sa synthèse délicate.

1.3.1.3. ... Par l'introduction de points de réticulation mobiles au sein du réseau

Une autre possibilité est l'utilisation de points de réticulation mobiles, comme les polyrotaxanes -des macromolécules comparables à des colliers moléculaires où plusieurs molécules cycliques sont « enfilées » sur une chaîne polymérique linéaire (Figure 1.12) ^[112]. Lorsqu'elles sont réticulées, la capacité des molécules cycliques à glisser le long de la chaîne polymérique leur permet d'équilibrer les tensions dans le réseau de l'hydrogel lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée (Figure 1.13), gommant ainsi les imperfections dans son architecture dues aux réticulations covalentes. Les polyrotaxanes peuvent représenter le principal constituant de l'hydrogel, comme c'est le cas dans ce premier exemple cité ci-dessus, mais aussi être utilisés en tant qu'agents réticulant. Ils sont alors importés dans un réseau polymérique de support ^[113], dont les propriétés mécaniques et de biocompatibilité peuvent être sélectionnées de façon optimum par rapport à l'application visée, comme la délivrance transdermique contrôlée de principes actifs. C'est cette dernière technique qui a été retenue pour ce projet, elle sera donc développée plus en détails dans le paragraphe 1.3.2.

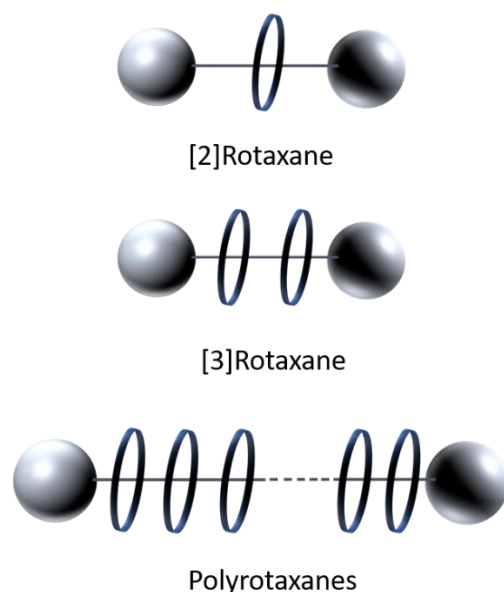


Figure 1.12 : Structure des polyrotaxanes

1.3.2 Les polyrotaxanes

1.3.2.1. Définition et propriétés

Les polyrotaxanes (PRX, Figure 1.12) ont été décrits pour la première fois dans les années 1990 par Harada et ses collègues ^[114–118]. L'une des caractéristiques remarquables de la structure des polyrotaxanes est le fait de ne pas avoir de liaisons covalentes entre la molécule cyclique (molécule hôte) et la chaîne polymérique linéaire (molécule invitée) bouchée par des groupes encombrants en fin de chaîne. Cette liberté structurale permet aux composés circulaires de glisser le long de l'axe ou de tourner autour (Figure 1.12) ^[119]. Cette particularité structurale a été exploitée dans la conception de nouveaux matériaux pour leur conférer des propriétés mécaniques dynamiques attractives ^[113,120]. Les cyclodextrines (CD) sont les composés cycliques les plus souvent utilisés car elles sont capables d'accueillir un large spectre de molécules invitées et sont biocompatibles ^[121].

Les deux modes de déplacement des cyclodextrines enfilées ont été avantageusement exploités dans des champs d'application très différents. Dans le cas de cyclodextrines modifiées avec des ligands, leurs mouvements le long de l'axe leur permettent ainsi d'augmenter leurs interactions avec les protéines cibles. Ce fut le cas pour des PRX obtenus à partir de cyclodextrines fonctionnalisées avec des unités de maltose. Ces macromolécules ont démontré une affinité avec la lectine végétale *Concanavalin A* trois fois supérieure à celle d'un

acide poly(acrylique) greffé avec un nombre similaire d'unités de maltose ^[122]. L'amélioration de l'affinité protéique a été reliée aux mouvements des CD-maltose. D'autres sondes biologiques efficaces ont été développées sur le même modèle, avec par exemple l'ajout de biotine ou de peptide sur les cyclodextrines ^[123,124].

Par ailleurs, Bin Imran et al. ont utilisé la liberté de mouvements des cyclodextrines pour influencer les propriétés mécaniques d'un nouveau type de gel, les « slide-ring » gels (Figure 1.13) ^[113]. Le poly(*N*-isopropylacrylamide) réticulé avec les PRX par leurs cyclodextrines forme ainsi un hydrogel où les points de réticulation sont mobiles. En effet, les cyclodextrines réticulées retiennent leur capacité à tourner ou glisser le long de l'axe polymérique et ainsi améliorent grandement la capacité d'extension du matériau.

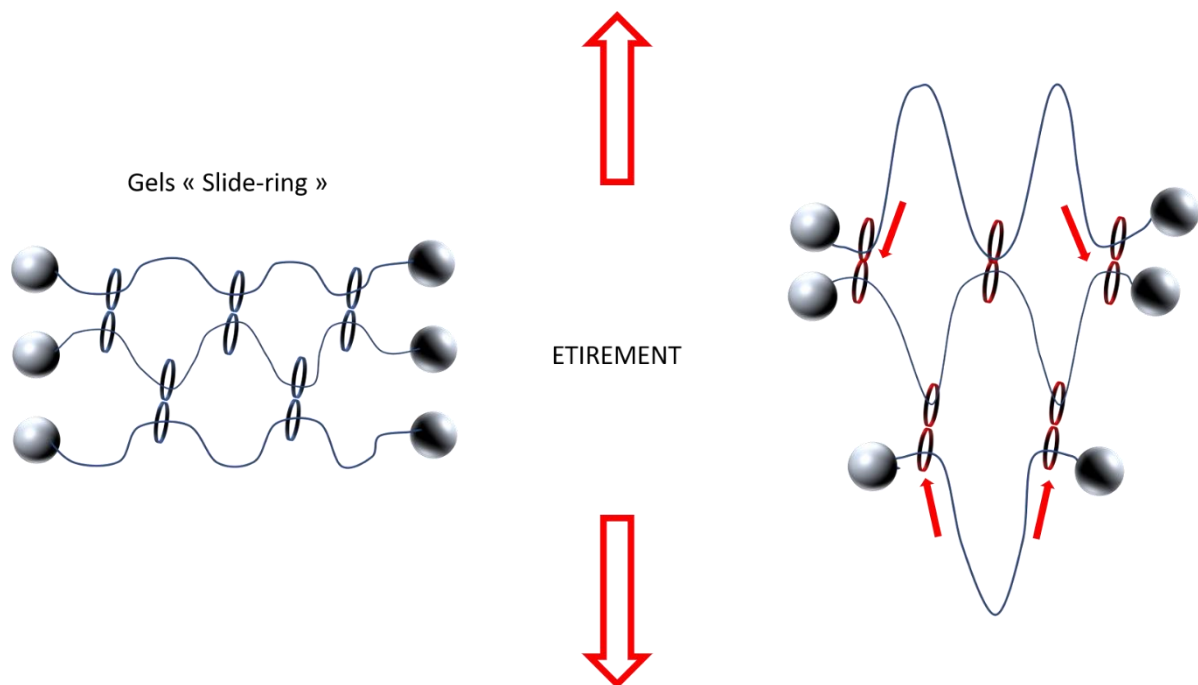


Figure 1.13 : Structure des gels « slide-ring » et mécanisme de dissipation de la contrainte mécanique dû à un étirement

1.3.2.2 Du polyrotaxane au gel

Comme l'exemple précédent le montre, la mobilité de mouvements des cyclodextrines dans les polyrotaxanes peut être particulièrement intéressante lorsqu'elle est exploitée dans le cas d'un réseau hydrogel. Lorsque cette mobilité est assurée par la faible densité de cyclodextrines enfilées, elle confère en effet des propriétés mécaniques dynamiques de gonflement et d'extension uniques au matériau.

On distingue dans un premier temps deux façons de concevoir des hydrogels contenant des polyrotaxanes dans leur réseau : 1) ceux dont les polyrotaxanes sont le principal constituant du réseau, et 2) ceux dont les polyrotaxanes n'agissent qu'en tant qu'agent de réticulation au sein d'un autre réseau polymère.

Les gels à réticulation physique

Historiquement, les premiers hydrogels avec polyrotaxanes appartenaient à la première catégorie. Li, Harada et Kamachi ont mis à profit en 1994 l'auto-association de plusieurs poly(éthylène glycol) de grande masse molaire (> 10 000 g/mol) partiellement complexés avec des α -cyclodextrines naturelles ^[125]. Les interactions secondaires intermoléculaires entre α -cyclodextrines enfilées sur les chaînes de poly(éthylène glycol) réticulent le réseau pour former un hydrogel dont les caractéristiques (temps de gélification, température de dissociation) dépendent fortement de la concentration et de la masse molaire de chaque précurseur. Ce mécanisme de réticulation a été mis en avant grâce à l'apparition de micro-domaines cristallins sur les diffractogrammes des différents gels étudiés par diffraction de rayons X. Ces micro-domaines cristallins correspondent aux zones où les α -CD enfilées sont réticulées les unes aux autres et donc ordonnées (Figure 1.14). La réticulation est dans ce cas uniquement due à des interactions physiques de type liaisons hydrogène. Le gel obtenu montre des propriétés mécaniques relativement faibles, et se redissout en solution à plus haute température (entre 40°C et 80°C suivant la concentration en PEG et en α -CD).

Ce premier système comporte toutefois plusieurs désavantages : outre la non-dégradabilité dans le corps humain des PEG à haute masses molaires qui limite son utilisation dans des applications biomédicales, le matériau a aussi une durée de vie réduite en milieu physiologique du fait de la solubilité des chaînes de PEG dans l'eau. Li et al. ont donc fait évoluer le système en remplaçant la longue chaîne de poly(éthylène glycol) par des copolymères à trois blocs PEG-poly(propylène glycol) (PPG)-PEG (aussi appelé poloxamer ou Pluronic®) ^[126]. Les copolymères ainsi sélectionnés forment des hydrogels en solution aqueuse, à température ambiante (22°C) et à basse concentration en polymère (13 wt%) lorsqu'ils sont ajoutés à une solution d' α -CD (9,7 wt%). La combinaison des interactions secondaires entre les CD et des interactions hydrophobes entre les segments de poly(propylène glycol) renforce la cohésion de l'hydrogel ainsi formé.

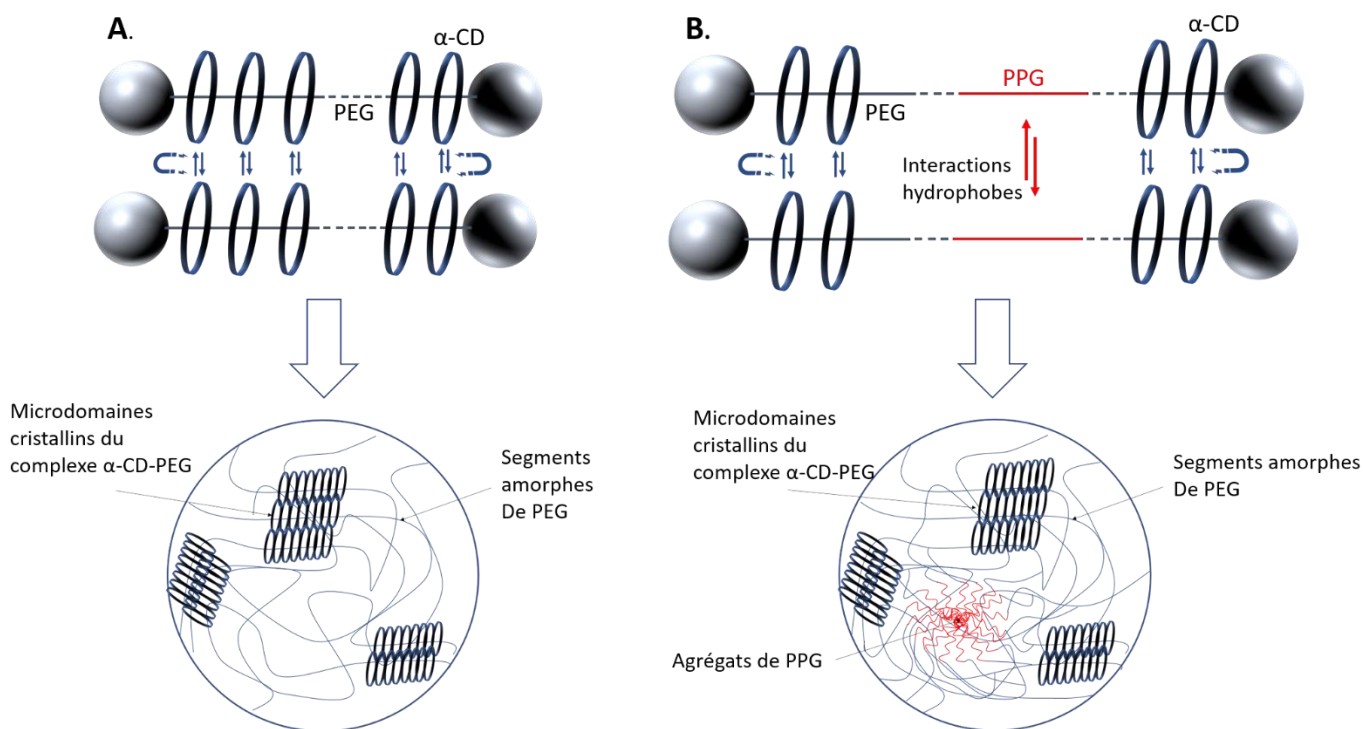


Figure 1.14 : Illustrations schématiques d'un gel à réticulation physique dans le cas du complexe α -CD-PEG (A, ^[125]) et dans le cas du complexe α -CD-PEG-PPG-PEG (B, ^[126])

Plusieurs autres variantes d'hydrogels physiques à partir de polyrotaxanes ont aussi été décrites dans la littérature. Ainsi, l'influence de la méthylation des α -cyclodextrines sur les conditions de formation de PRX avec une chaîne de PEG et de sa gélification a été étudiée par Kataoka et al. ^[127]. La solution aqueuse de Me-PRX gélifie à plus basse température que son équivalent non modifié (PRX composé d'un complexe α -CD naturelle-PEG). De tels systèmes réversibles ont également été développés. En ajoutant une molécule invitée (bromure de 1-[p-(phenylazo)benzyl]pyridinium, abrégée Azo-C1-N⁺) en compétition avec la chaîne polymérique de PEG, Liao et ses collègues ont synthétisé un hydrogel physique photosensible à partir de pseudo-polyrotaxanes ^[128]. Une fois obtenue la formation spontanée du gel par réticulation physique entre les α -CD enfilées sur les chaînes, l'ajout d'Azo-C1-N⁺ provoque la dissociation des complexes CD-PEG au profit des complexes CD-Azo-C1-N⁺ et la dissolution du gel. L'irradiation sous UV permet de revenir à l'état initial d'hydrogel. La réversibilité du processus est assurée par le fait que les cyclodextrines peuvent s'enfiler et sortir de la chaîne linéaire en l'absence de groupes encombrants de fin de chaînes.

Les interactions secondaires sur lesquelles les réticulations de ces hydrogels physiques reposent ne sont pas assez stables pour être exploitées dans certaines applications

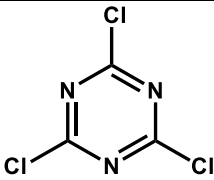
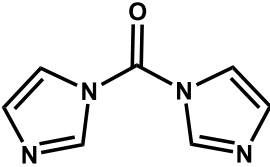
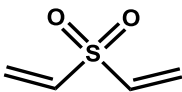
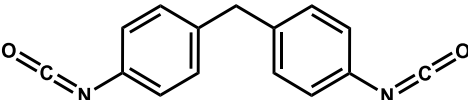
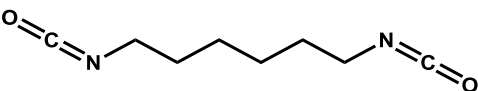
nécessitant des propriétés mécaniques renforcées. De par leurs relativement faibles propriétés mécaniques et leur sensibilité au milieu extérieur (température), les gels ainsi formés seraient trop facilement dégradés. Les systèmes suivants ont donc été développés dans l'objectif de stabiliser et renforcer ces interactions secondaires. L'ajout d'agents de réticulation chimiques a ainsi permis l'exploration d'un nouveau type d'hydrogels à base de polyrotaxanes : les gels topologiques ou gels « slide-ring ».

Les « slide-ring » gels

Okumura et al. rapportent ainsi en 2001 la synthèse d'un gel à base de PRX avec des capacités d'extension uniques, une faible viscosité et une grande capacité de gonflement ^[112]. L'ajout de chlorure cyanurique à température ambiante dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à 1 mol/L comme agent chimique a permis la réticulation chimique sélective des groupes hydroxyles des α -cyclodextrines entre les chaînes de PRX. Le gel ainsi formé est transparent et démontre des capacités de gonflement hors du commun. Les auteurs estiment que le gel peut ainsi absorber en eau jusqu'à l'équivalent de 400 fois son poids à sec. Les changements de volumes sont réversibles et ne provoquent pas de modifications sur la surface des gels. Ces propriétés hors du commun pour de tels gels ont été expliquées par l'effet « poulie ». Avec cette méthode de réticulation chimique, les points de réticulation entre les chaînes du réseau sont uniquement situés sur les cyclodextrines enfilées et donc mobiles. Lorsqu'une contrainte mécanique est appliquée sur la structure (comme un gonflement important ou une élongation), les cyclodextrines « glissent » ou tournent autour de l'axe polymérique du polyrotaxane pour atteindre leur position optimale, où la contrainte est équitablement répartie sur l'ensemble des chaînes du réseau de l'hydrogel ^[112,129-131]. La comparaison de la poulie pour ces cyclodextrines vient donc de ce phénomène d'équilibrage des tensions mécaniques. Ces « slide-ring » gels ont d'ailleurs été confirmés ^[132] comme la réalisation pratique de la prédiction théorique de de Gennes en 1999 ^[133]. Le détenteur du prix Nobel de physique avait en effet théoriquement décrit le comportement mécanique de gels dont les points de réticulation seraient mobiles, détaillant alors la comparaison avec le fonctionnement d'une poulie, deux ans avant leur première occurrence pratique par Okumura et al en 2001 ^[112].

Différents agents chimiques de réticulation ont été utilisés pour réaliser des « slide-ring » gels, tous ciblant les groupements hydroxyles des α -cyclodextrines. Ils sont répertoriés dans le Tableau 1.3 ci-dessous.

Tableau 1.3. : Agents de réticulations utilisés pour la préparation de gels topologiques

Agents de réticulation	Structure	Conditions de la réaction de réticulation	Réfs
Chlorure cyanurique		NaOH à 1M, t.a., 3h	[112]
N,N'-Carbonyldiimidazole		DMSO sec, t.a.-50°C	[130]
Divinyl sulfone		NaOH 0,1-1M, t.a., qq's minutes	[134]
4,4'-diisocyanate de diphénylméthylène		CHCl ₃ , en présence de dilaurate de dibutylétain (cat.), t.a., <1 min	[135]
Hexaméthylène diisocyanate		DMSO sec, 60°C, 18h	[136]

Ces travaux réalisés avec différents agents de réticulation ont mis en évidence l'influence de la charge ionique de l'agent de réticulation et du milieu aqueux, sur les capacités de gonflement des hydrogels. L'utilisation d'agents réticulants non ioniques s'est donc développée avec l'arrivée des dérivés diisocyanates ^[137].

De par leurs propriétés mécaniques attractives, l'intérêt pour ces « slide-ring » gels grandit de plus en plus dans le domaine des matériaux pour les applications biomédicales. Une étape cruciale de leur développement est le transfert de cet effet de « poulie » à d'autres réseaux

polymériques. Par exemple, une des difficultés principales à l'utilisation commerciale d'hydrogels sensibles à leur environnement (température, pH, reconnaissances de protéines) est leurs propriétés mécaniques non compatibles avec leur utilisation dans des propriétés biomédicales (ils sont pour la plupart cassants et fragiles). Comme il a été décrit dans le paragraphe 1.3.1, les différentes méthodes de renforcement des gels ne sont pas faciles à transposer dans un autre réseau polymérique. Elles soulèvent notamment des difficultés supplémentaires au moment de la synthèse (ajout d'un réseau secondaire, changement de réactifs chimiques, perturbation de la charge ionique du matériau pouvant affecter la sensibilité à l'environnement). Utiliser les polyrotaxanes en tant qu'agents de réticulation permettrait de transférer cette propriété unique de points de réticulation mobiles dans un réseau polymérique autre dont les propriétés sont déjà optimisées, comme mentionné ci-dessus. Cela permettrait notamment de conserver les propriétés mécaniques intéressantes des slide-ring gels décrits dans ce paragraphe, tout en les combinant avec d'autres propriétés nécessaires pour leur utilisation dans les applications médicales (sensibilité au pH, à la température, biodégradabilité contrôlée, ...).

Les matériaux inspirés des « slide-ring » gels

Une des possibilités étudiées actuellement est l'inclusion des polyrotaxanes comme agent de réticulation dans un réseau polymérique secondaire. Le premier exemple de cette adaptation des polyrotaxanes, arrivé très tôt dans le développement des gels de PRX, est l'étude portée par Ichi et ses collègues en 2001 ^[138]. Ils ont en effet développé un gel dont l'hydrolyse en milieu aqueux est contrôlable. Un réseau support de poly(éthylène glycol) est réticulé grâce à des polyrotaxanes. Les PRX, dans ce cas, sont constitués de chaînes de poly(éthylène glycol) sur lesquelles sont enfilées des α -CD et bouchées par des groupes de fin de chaînes encombrants reliés par des fonctions esters, hydrolysables (Figure 1.15). En mesurant le temps d'érosion de différentes variantes de ce système, les auteurs ont constaté un résultat étonnant : le ralentissement de l'érosion du gel -et donc de l'hydrolyse des fonctions esters- avec l'augmentation du gonflement du gel par absorption d'eau. L'hypothèse retenue pour l'expliquer est que le gonflement a provoqué le glissement des cyclodextrines vers les fonctions esters et donc l'inclusion des dites fonctions dans la cavité des cyclodextrines ^[138]. Leur stabilité est donc améliorée.

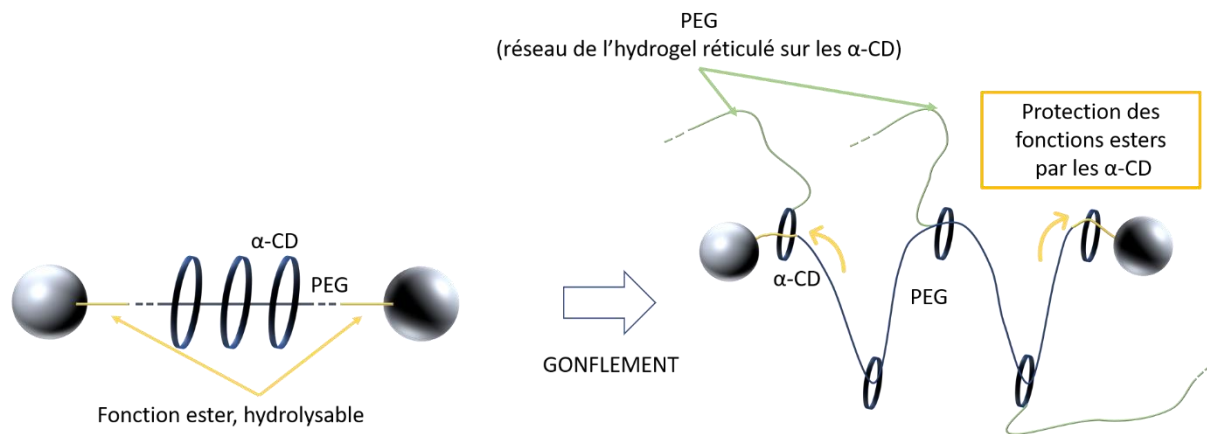


Figure 1.15 : Représentation schématique du glissement des cyclodextrines sur les fonctions esters lors du gonflement de l'hydrogel

Un autre exemple de transfert de l'effet « poulie » des cyclodextrines à un autre réseau polymérique est l'obtention par Bin Imran et al. d'un gel thermosensible extrêmement résistant et extensible ^[113]. Ici encore, les PRX ont été utilisés en tant qu'agent de réticulation pour la formation d'un hydrogel de poly(*N*-isopropylacrylamide). La conservation de la thermo-sensibilité et de la sensibilité au pH des hydrogels obtenus est couplée à l'amélioration notable de leurs propriétés d'extension et leur résistance (Figure 1.16). Ces dispositifs peuvent être extrêmement intéressants pour des applications de libération contrôlée de PA, d'ingénierie tissulaire, ou leur utilisation dans des muscles artificiels.

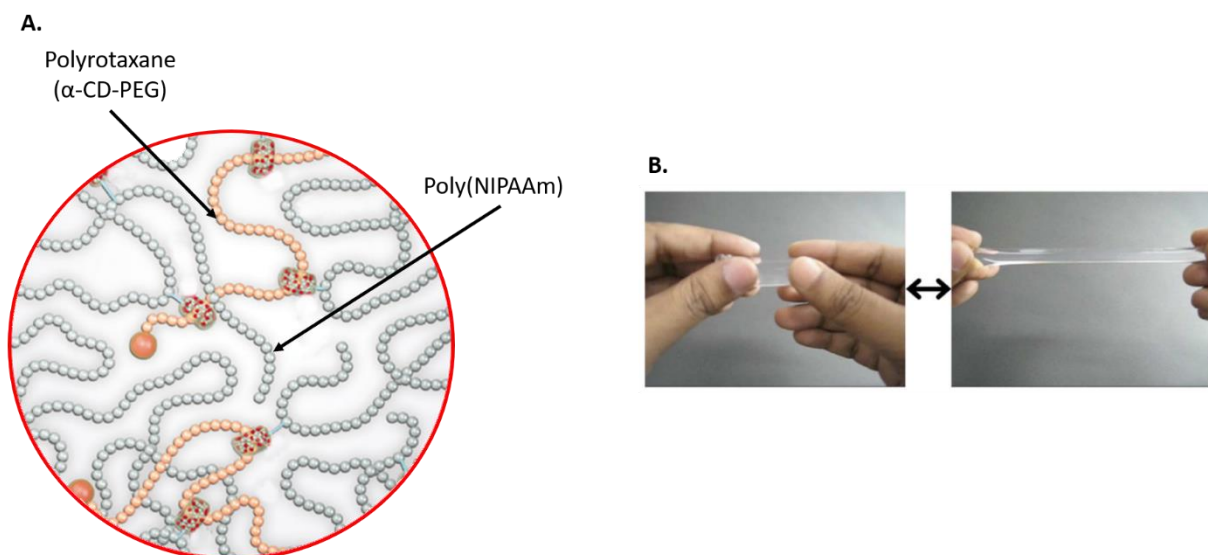


Figure 1.16. **A.** Structure de l'hydrogel développé par Bin Imran et al. **B.** Etat allongé de l'hydrogel ainsi obtenu. Adaptée de ^[113].

Les cyclodextrines enfilées sur les polyrotaxanes offrent des possibilités de fonctionnalisation très larges. Elles constituent donc des éléments de base intéressants pour la synthèse des polyrotaxanes, comme agent de réticulation dans des systèmes très divers pour en améliorer les propriétés mécaniques. C'est notre choix dans le projet de thèse : les polyrotaxanes viendront apporter les propriétés mécaniques adaptées à une délivrance transdermique de principes actifs.

1.3.3 Déclencher la libération du PA par stimulus mécanique

L'un des leviers possibles pour améliorer l'efficacité des traitements délivrés par la voie d'administration transdermale est de mieux contrôler la libération du PA dans le temps, l'espace, et en termes de dosage. Il existe de nombreuses possibilités de stimuli générés par le corps humain détectables et exploitables pour déclencher la libération des molécules thérapeutiques : pH, redox, glucose, enzymes, ... et mécaniques. C'est cette dernière solution qui est facilement mise en place, comme il a été rappelé dans le paragraphe d'introduction de la partie 1.3. De nouveaux systèmes de délivrance de PA ont donc été développés, conçus pour être sensibles aux stimuli mécaniques du corps humain.

1.3.3.1 Introduction de micro-dépôts d'hydrogels dans une matrice élastomère

Une méthode exploitée depuis quelques années est de créer des micro dépôts en forme de demi-sphères d'un hydrogel sur une matrice support en élastomère. Di et son équipe ont ainsi conçu un système de libération de molécule active sensibles aux étirements ^[139,140]. La force de traction exercée par la flexion d'une articulation (comme un doigt) augmente la surface de diffusion des principes actifs stockés dans les micro gels et provoque une compression sur l'ensemble du dispositif liée à la différence de coefficient de Poisson de la matrice élastomère et des micro dépôts hydrogels. La molécule active est alors libérée des micro-dépôts et diffuse au travers de la peau. Après un premier test concluant avec de la doxorubicine (DOX, une molécule antibactérienne et anticancéreuse), l'équipe a combiné ce dispositif avec des micro-aiguilles (Figure 1.17), améliorant ainsi la pénétration de la molécule au travers de la peau, pour la délivrance d'insuline à un modèle de souris diabétique de type 1. Une série de 10 étirements du dispositif a permis le relargage de l'insuline à travers les micro dépôts et les micro-aiguilles, et donc le contrôle du niveau de glucose dans le sang des souris.

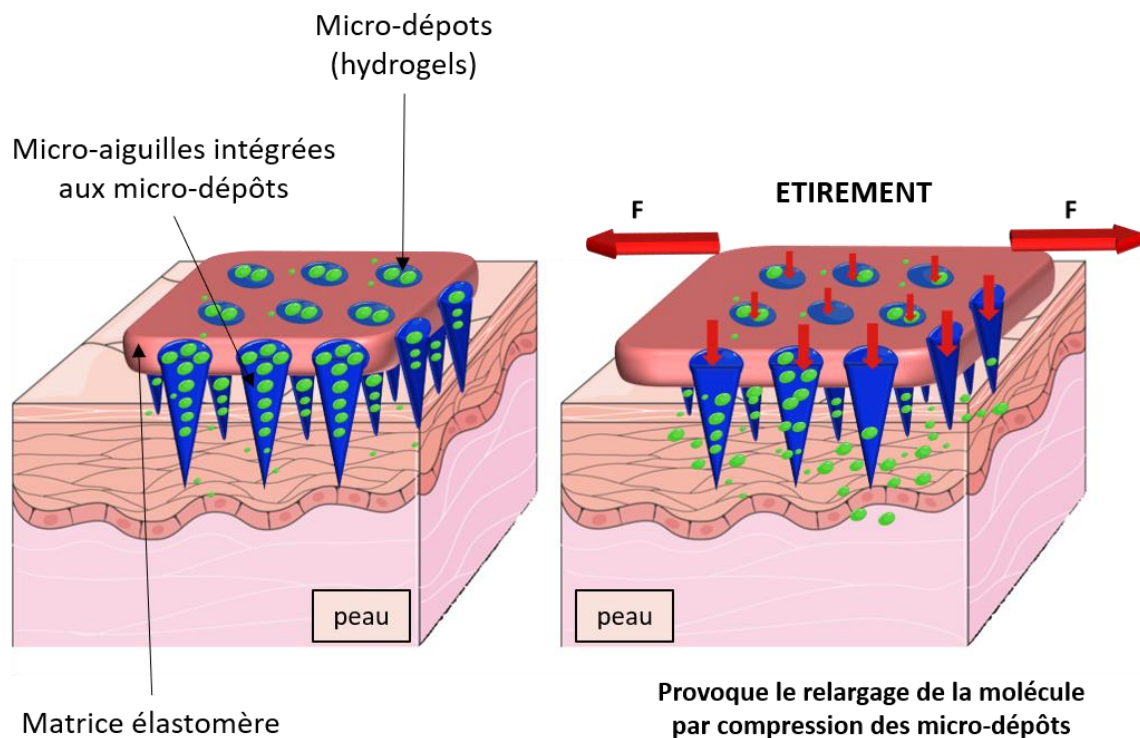


Figure 1.17. Délivrance de l'insuline contrôlée par étirement grâce à un dispositif transdermal qui associe micro-dépôts hydrogels et micro-aiguilles. Adaptée de ^[139]

1.3.3.2 Utilisation de nanovecteurs liés au réseau polymérique

Créer des liaisons chimiques, covalentes ou non, entre le réseau polymérique de support et le vecteur qui transporte les principes actifs est une première façon d'apporter aux patches transdermiques une sensibilité aux stimuli mécaniques. La déformation macroscopique de la matrice provoquée par la contrainte mécanique va également induire une déformation des vecteurs transportant les molécules d'intérêt. Ainsi, Izawa et ses collègues ont créé un dispositif qui repose sur le principe de liaisons covalentes entre le vecteur médicamenteux et le réseau principal de la matrice ^[141]. Des dérivés de β -CD, complexés avec de l'ondansetron (ODN, une molécule antiémétique), ont été introduits dans un hydrogel d'alginate de calcium par liaisons covalentes. Une compression -ou un cycle de 5 compressions-relaxations-modérées (50% de la taille initiale), qui simule la pression de la main par le patient, déforment les cavités de β -CD. Cette déformation suffit à perturber l'équilibre du complexe entre la β -CD et la molécule invitée, provoquant ainsi le relargage sporadique de l'ondansetron, synchronisé sur les actions mécaniques sur le gel.

Xiao et ses collègues ont développé en 2012 le premier dispositif de délivrance actionnable par stimulus mécanique en créant des liaisons covalentes entre des micelles formées à base

de copolymères à blocs (appelées BCMs pour *block copolymer micelles*) et le réseau polymérique principal de poly(acrylamide) ^[142]. La déformation (réversible, 200%) appliquée sur le réseau polymérique s'est propagée au BCMs sans dégrader l'intégrité du réseau polymérique. Des cycles (jusqu'à 6 répétitions) de déformation de 30 et 60% ont également permis la libération « pulsatile », et donc contrôlée, de molécules de styrène encapsulées à l'intérieur (Figure 1.18). Un peu plus tard, ce même système de BCMs, encapsulant cette fois-ci de la dexaméthasone (DEX, une molécule anti-inflammatoire), a été appliqué par la même équipe à un réseau d'acide hyaluronique (HA) pour le traitement de patients atteints d'arthrose du genou ^[143]. Cette fois-ci, l'action compressive, similaire à celle que l'on retrouve dans l'articulation du genou, a déclenché la libération de la DEX et son action anti-inflammatoire synergique avec les éléments solubles du HA. Ce genre de dispositif pourrait donc être intégré dans la conception de cartilage de synthèse.

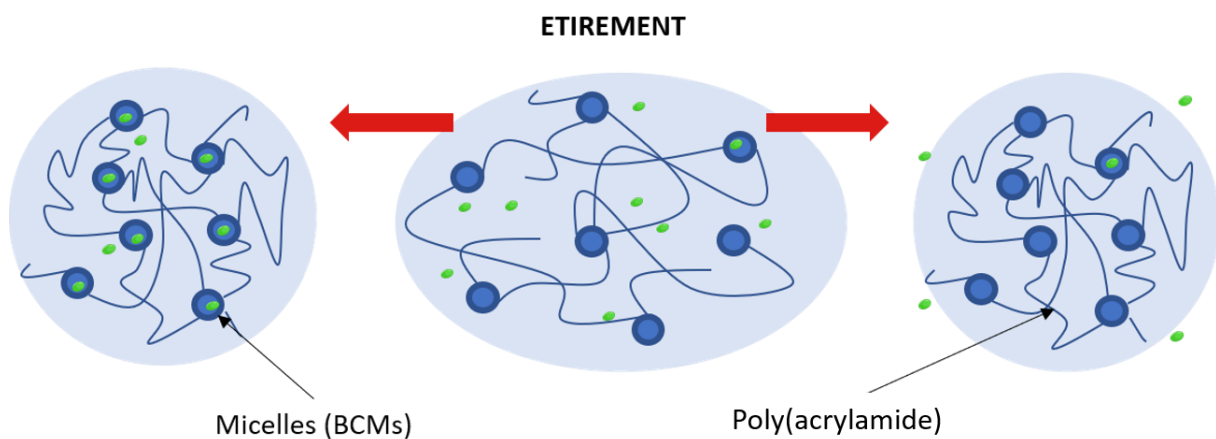


Figure 1.18. Comportement des micelles au sein de la matrice de poly(acrylamide) sous étirement. La déformation est réversible. Adaptée de ^[142]

Dans les exemples précédents, le choix de molécules actives à embarquer reste restreint. Lorsqu'elles sont encapsulées dans les nanovecteurs présentés ci-dessus (BCMs, β -CD, micro-dépôts) c'est la molécule elle-même qui est relarguée. Elle doit donc, grâce à ses propriétés intrinsèques, pouvoir passer les barrières successives des micelles, des micro dépôts, des micro-aiguilles et celles de la peau, pour avoir une action efficace. Par ailleurs, dans le cas des systèmes de délivrance dérivés de β -CD, les molécules actives doivent être complexées avec les cyclodextrines pour être embarquées dans la matrice hydrogel, ce qui réduit le nombre de principes actifs pouvant être délivrés par ces systèmes. Le fait, donc, de garder un nano-

vecteur (comme les nanoparticules lipidiques) libre de diffuser dans la matrice permet de favoriser la stabilité des principes actifs jusqu'à leur arrivée à la surface de la peau. La stratégie développée dans ce projet de thèse privilégie donc leur emploi, ainsi que des modifications directes sur les mailles du réseau hydrogel pour en favoriser la diffusion lors de stimuli mécaniques.

Aussi, les matrices de support qui supportent l'étirement provoqué par le mouvement de l'articulation sont en polymère synthétique (élastomère, poly(acrylamide)) à la biocompatibilité limitée, surtout dans le cadre d'un usage quotidien et sur une longue durée de ce genre de dispositifs. L'une des possibilités pour contourner ce problème serait d'améliorer les propriétés mécaniques de l'unique matrice utilisée dans un patch transdermique, pour ne pas recourir à une deuxième couche de polymère. Dans ce cadre, l'utilisation des polyrotaxanes comme agents de réticulation au sein d'un réseau polymérique de support biocompatible, comme présentée dans le paragraphe précédent, apparaît comme une piste prometteuse...

1.4. Conclusion

Les modalités de traitements pour les maladies inflammatoires articulaires évoluent très lentement. La prise orale plurijournalière, et sur une longue période, d'anti-inflammatoires reste le premier axe du traitement médicamenteux, visant à réduire la douleur et l'inflammation, malgré ses effets secondaires non négligeables. Pourtant, l'administration locale par voie transdermique a montré plusieurs avantages depuis les premières commercialisations de tels dispositifs en 1979. L'évolution constante des systèmes de délivrance de principe actifs hydrophobes à action locale a eu pour principaux objectifs d'assurer la stabilité de la molécule active tout en améliorant le contrôle temporel, spatial et quantitatif de sa libération. Ces évolutions ont pour but concret de réduire la dose et la fréquence d'administration de la molécule grâce à une délivrance mieux contrôlée et de réduire au maximum les effets secondaires. Le tout, finalement, dans le but d'améliorer le confort du patient.

Dans ce cadre, les hydrogels se sont très vite révélés être des candidats prometteurs pour la libération contrôlée de PA et ont constitué les supports principaux de la première génération de patchs transdermiques. Des combinaisons particulièrement intéressantes avec d'autres systèmes de délivrance de molécules actives, comme les nanoparticules lipidiques, ont également été développées et plus précisément présentées dans cet état de l'art. Toutefois, cet état des lieux a permis de mettre en évidence des limites s'appliquant à ces systèmes à double encapsulation. Les différentes méthodes de renforcement des propriétés mécaniques d'hydrogels ont alors été présentées, ainsi que celles pour déclencher la libération de molécules actives par stimulus mécanique. Le constat après cet état de lieu est le suivant : l'apport simultané, lors de la conception de la matrice hydrogel, à la fois des propriétés mécaniques et des propriétés dynamiques de contrôle de libération de PA adaptées pour la délivrance transdermique, est encore un challenge ardu.

Depuis trois décennies, l'intérêt porté aux polyrotaxanes est croissant, grâce aux propriétés dynamiques qu'ils apportent dans des matériaux aux applications très variées. C'est notamment dans le domaine des hydrogels qu'ils sont beaucoup utilisés. Leur utilisation en tant qu'agent de réticulation dans un réseau polymérique secondaires aux propriétés adaptées paraît, dans ce cadre, extrêmement prometteuse. L'utilisation de polyrotaxanes

comme agent réticulant dans un réseau polymérique support devrait permettre en effet d'améliorer de façon importante les propriétés d'extension, de compression et de résistance à la rupture du matériau. Cela constitue un des points les plus originaux de ce travail qui sera détaillé dans le chapitre suivant. Cet hydrogel combiné aux nanoparticules lipidiques assurant la stabilité de l'encapsulation du principe actif hydrophobe dans la matrice propose un matériau à l'architecture innovante. Ce travail de thèse se propose d'étudier dans quelle mesure il répond au cahier des charges exigeant de la délivrance transdermique : biocompatibilité, capacité d'étirement, résistance aux chocs, capacité d'encapsulation et de délivrance prolongée du principe actif hydrophobe

Références

- [1] Organisation mondiale de la santé, *Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2010*, World Health Organization, Geneva, **2011**.
- [2] “1 Français sur 2 souffre de douleurs articulaires,” can be found under <https://presse.inserm.fr/1-francais-sur-2-souffre-de-douleurs-articulaires/25303/>, **2016**.
- [3] “Arthrose,” can be found under <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/arthrose>, **n.d.**
- [4] “Spondyloarthrites,” can be found under <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/spondyloarthrites>, **n.d.**
- [5] “Polyarthrite rhumatoïde,” can be found under <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/polyarthrite-rhumatoide>, **n.d.**
- [6] I. Tegeder, U. Muthselbach, J. Lotsch, G. Rusing, R. Oelkers, K. Brune, S. Meller, G. Kelm, F. Sorgel, G. Geisslinger, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **1999**, *65*, 357–368.
- [7] C. Rolf, B. Engstrom, C. Beauchard, L. D. Jacobs, A. Le Liboux, *Rheumatology* **1999**, *38*, 564–567.
- [8] C. A. Heyneman, C. Lawless-Liday, G. C. Wall, *Drugs* **2000**, *60*, 555–574.
- [9] M. Underwood, D. Ashby, P. Cross, E. Hennessy, L. Letley, J. Martin, S. Mt-Isa, S. Parsons, M. Vickers, K. Whyte, *BMJ* **2008**, *336*, 138–142.
- [10] M. R. Prausnitz, R. Langer, *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1261–1268.
- [11] A. C. Williams, B. W. Barry, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 603–618.
- [12] H.-Y. Thong, H. Zhai, H. I. Maibach, *Skin Pharmacol Physiol* **2007**, *20*, 272–282.
- [13] A. Kogan, N. Garti, *Advances in Colloid and Interface Science* **2006**, *123–126*, 369–385.
- [14] K. B. Sloan, S. C. Wasdo, J. Rautio, *Pharm Res* **2006**, *23*, 2729–2747.
- [15] A. K. Banga, *Electrically Assisted Transdermal and Topical Drug Delivery*, Taylor And Francis, London :, **1998**.
- [16] Y. N. Kalia, A. Naik, J. Garrison, R. H. Guy, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 619–658.
- [17] S. Mayes, M. Ferrone, *Ann Pharmacother* **2006**, *40*, 2178–2186.
- [18] W. T. Zempsky, J. Sullivan, D. M. Paulson, S. B. Hoath, *Clinical Therapeutics* **2004**, *26*, 1110–1119.
- [19] T. O. Herndon, S. Gonzalez, T. Gowrishankar, R. R. Anderson, J. C. Weaver, *BMC Med* **2004**, *2*, 12.
- [20] G. Levin, A. Gershonowitz, H. Sacks, M. Stern, A. Sherman, S. Rudaev, I. Zivin, M. Phillip, *Pharm Res* **2005**, *22*, 550–555.
- [21] A. V. Badkar, A. M. Smith, J. A. Eppstein, A. K. Banga, *Pharm Res* **2007**, *24*, 1389–1395.
- [22] S. Li, J. Cutrera, R. Heller, J. Teissie, Eds. , *Electroporation Protocols: Preclinical and Clinical Gene Medicine*, Humana Press, **2014**.
- [23] A.-R. Denet, R. Vanbever, V. Préat, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, *56*, 659–674.
- [24] M. R. Prausnitz, J. A. Mikszta, M. Cormier, A. K. Andrianov, in *Vaccines for Pandemic Influenza* (Eds.: R.W. Compans, W.A. Orenstein), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2009**, pp. 369–393.
- [25] Y.-C. Kim, J.-H. Park, M. R. Prausnitz, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 1547–1568.
- [26] M. Schäfer-Korting, W. Mehnert, H.-C. Korting, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 427–443.

- [27] C. Puglia, P. Blasi, L. Rizza, A. Schoubben, F. Bonina, C. Rossi, M. Ricci, *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *357*, 295–304.
- [28] R. H. Müller, R. Shegokar, C. M. Keck, *Current Drug Discovery Technologies* **2011**, *8*, 207–227.
- [29] C. Puglia, F. Bonina, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2012**, *9*, 429–441.
- [30] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *25*.
- [31] N. Anton, J.-P. Benoit, P. Saulnier, *Journal of Controlled Release* **2008**, *128*, 185–199.
- [32] R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, *Eur J Pharm Biopharm* **2000**, *50*, 161–177.
- [33] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *242*, 121–128.
- [34] H. Maeda, *Journal of Drug Targeting* **2017**, *25*, 781–785.
- [35] A. Karageorgis, S. Dufort, L. Sancey, M. Henry, S. Hirsjärvi, C. Passirani, J.-P. Benoit, J. Gravier, I. Texier, O. Montigon, M. Benmerad, V. Siroux, E. L. Barbier, J.-L. Coll, *Scientific Reports* **2016**, *6*, 21417.
- [36] E. B. Souto, S. A. Wissing, C. M. Barbosa, R. H. Müller, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2004**, *58*, 83–90.
- [37] F. ud Din, D. W. Kim, J. Y. Choi, R. K. Thapa, O. Mustapha, D. S. Kim, Y.-K. Oh, S. K. Ku, Y. S. Youn, K. T. Oh, C. S. Yong, J. O. Kim, H.-G. Choi, *Acta Biomaterialia* **2017**, *54*, 239–248.
- [38] K. Bhaskar, C. K. Mohan, M. Lingam, S. J. Mohan, V. Venkateswarlu, Y. M. Rao, *Drug Dev Ind Pharm.* **2009**, *35*, 98–113.
- [39] H. Almeida, *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2016**, *12*.
- [40] J. L. Drury, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4337–4351.
- [41] S. Wissing, A. Lippacher, R. Müller, *J Cosmet Sci* **2001**, *52*, 313–324.
- [42] N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier, J. P. Benoit, *International Journal of Pharmaceutics* **2009**, *379*, 201–209.
- [43] S. Doktorovova, E. B. Souto, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2009**, *6*, 165–176.
- [44] T. Delmas, A.-C. Couffin, P. A. Bayle, F. de Crécy, E. Neumann, F. Vinet, M. Bardet, J. Bibette, I. Texier, *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *360*, 471–481.
- [45] W. H. De Jong, W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips, R. E. Geertsma, *Biomaterials* **2008**, *29*, 1912–1919.
- [46] “ISO 22412:2017 - Particle size analysis -- Dynamic light scattering (DLS),” can be found under <https://www.iso.org/standard/65410.html>, **n.d.**
- [47] S. Gioria, F. Caputo, P. Urbán, C. M. Maguire, S. Bremer-Hoffmann, A. Prina-Mello, L. Calzolari, D. Mehn, *Nanomedicine* **2018**, *13*, 539–554.
- [48] M. A. Casadei, F. Cerreto, S. Cesa, M. Giannuzzo, M. Feeney, C. Marianecchi, P. Paolicelli, *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *7*.
- [49] E. S. Behbahani, M. Ghaedi, M. Abbaspour, K. Rostamizadeh, *Ultrasonics Sonochemistry* **2017**, *38*, 271–280.
- [50] A. Guillot, A.-C. Couffin, X. Sejean, F. Navarro, M. Limberger, C.-M. Lehr, *Pharm Res* **2015**, *32*, 3999–4009.
- [51] T. Delmas, A. Fraichard, P.-A. Bayle, I. Texier, M. Bardet, J. Baudry, J. Bibette, A.-C. Couffin, *Journal of Colloid Science and Biotechnology* **2012**, *1*, 16–25.
- [52] D. Pozzi, V. Colapicchioni, G. Caracciolo, S. Piovesana, A. L. Capriotti, S. Palchetti, G. De, A. Riccioli, H. Amenitsch, A. Laganà, *Nanoscale* **2014**, *6*, 2782–2792.
- [53] H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2003**, *55*, 403–419.
- [54] X. Huang, C. S. Brazel, *Journal of Controlled Release* **2001**, *73*, 121–136.

- [55] A. Alexander, S. Dwivedi, Ajazuddin, T. K. Giri, S. Saraf, S. Saraf, D. K. Tripathi, *Journal of Controlled Release* **2012**, *164*, 26–40.
- [56] A. S. Hoffman, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *54*, 3–12.
- [57] C.-C. Lin, A. T. Metters, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 1379–1408.
- [58] T. R. Hoare, D. S. Kohane, *Polymer* **2008**, *49*, 1993–2007.
- [59] N. Unlü, A. Ludwig, M. Van Ooteghem, A. A. Hincal, *Pharm Acta Helv* **1992**, *67*, 5–10.
- [60] N. Unlü, A. Ludwig, M. van Ooteghem, A. A. Hincal, *Pharmazie* **1991**, *46*, 784–788.
- [61] W. Liu, M. Hu, W. Liu, C. Xue, H. Xu, X. Yang, *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *364*, 135–141.
- [62] M. Dolz, M. Herraes, F. González, O. DIEZ SALES, J. Delegido, M. J. Hernández, *Pharmazie* **1998**, *53*, 126–130.
- [63] S. H. Song, K. M. Lee, J. B. Kang, S. G. Lee, M. J. Kang, Y. W. Choi, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2014**, *62*, 793–798.
- [64] Y. Qiu, K. Park, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *53*, 321–339.
- [65] E. S. Gil, S. M. Hudson, *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2004**, *29*, 1173–1222.
- [66] J. F. Mano, *Advanced Engineering Materials* **2008**, *10*, 515–527.
- [67] D. Roy, J. N. Cambre, B. S. Sumerlin, *Progress in Polymer Science (Oxford)* **2010**, *35*, 278–301.
- [68] S. C. Gupta, S. Patchva, B. B. Aggarwal, *The AAPS Journal* **2013**, *15*, 195–218.
- [69] L. Klouda, A. G. Mikos, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2008**, *68*, 34–45.
- [70] J. Hao, X. Wang, Y. Bi, Y. Teng, J. Wang, F. Li, Q. Li, J. Zhang, F. Guo, J. Liu, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *114*, 111–120.
- [71] R. Gaudana, J. Jwala, S. H. S. Boddu, A. K. Mitra, *Pharm Res* **2009**, *26*, 1197.
- [72] G. Tan, S. Yu, J. Li, W. Pan, *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *103*, 941–947.
- [73] M. H. Lee, G. H. Shin, H. J. Park, *Journal of Applied Polymer Science* **2018**, *135*, 46004.
- [74] T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, *Journal of Controlled Release* **2007**, *119*, 5–24.
- [75] S. N. Pawar, K. J. Edgar, *Biomaterials* **2012**, *33*, 3279–3305.
- [76] P. Bulpitt, D. Aeschlimann, *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, *47*, 152–169.
- [77] J. H. Venâncio, L. M. Andrade, N. L. S. Esteves, L. B. Brito, M. C. Valadares, G. A. R. Oliveira, E. M. Lima, R. N. Marreto, T. Gratieri, S. F. Taveira, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2017**, *69*, 1318–1326.
- [78] L. G. Lucca, S. P. de Matos, T. Kreutz, H. F. Teixeira, V. F. Veiga, B. V. de Araújo, R. P. Limberger, L. S. Koester, *AAPS PharmSciTech* **2018**, *19*, 522–530.
- [79] M. Kurakula, O. A. A. Ahmed, U. A. Fahmy, T. A. Ahmed, *Journal of Liposome Research* **2016**, *26*, 288–296.
- [80] R. A. Khallaf, H. F. Salem, A. Abdelbary, *Drug Delivery* **2016**, *23*, 3452–3460.
- [81] L. Racine, A. Guliyeva, I. Wang, V. Larreta-Garde, R. Auzély-Velty, I. Texier, *Macromolecular Bioscience* **2017**, *17*, 1700045.
- [82] R. A.-B. Sanad, H. M. Abdel-Bar, *Carbohydrate Polymers* **2017**, *173*, 441–450.
- [83] Y. Yu, R. Feng, S. Yu, J. Li, Y. Wang, Y. Song, X. Yang, W. Pan, S. Li, *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *114*, 462–469.
- [84] P. Paolicelli, F. Cerreto, S. Cesa, M. Feeney, F. Corrente, C. Marianecchi, M. A. Casadei, *Journal of Microencapsulation* **2009**, *26*, 355–364.
- [85] P. Paolicelli, F. Corrente, D. Serricchio, F. Cerreto, **2011**, *13*.

- [86] J. P. Senna, T. N. Barradas, S. Cardoso, T. C. Castiglione, M. J. Serpe, K. G. de H. e Silva, C. R. E. Mansur, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2018**, *166*, 187–194.
- [87] B. Strasdat, H. Bunjes, *Food Hydrocolloids* **2013**, *30*, 567–575.
- [88] L. Vlaia, G. Coneac, I. Olariu, V. Vlaia, D. Lupuleasa, in *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels*, **n.d.**
- [89] J. S. and K. Adibkia, *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications* **2013**, DOI 10.5772/55178.
- [90] K. Ravi, *Reactive and Functional Polymers* **2000**, *46*, 1–27.
- [91] D. Letourneur, J. Champion, F. Slaoui, J. Jozefonvicz, *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **1993**, *29A*, 67–72.
- [92] D. Logeart-Avramoglou, J. Jozefonvicz, *Journal of Biomedical Materials Research* **1999**, *48*, 578–590.
- [93] M. Skiba, M. Skiba-Lahiani, H. Marchais, R. Duclos, P. Arnaud, *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *198*, 1–6.
- [94] C. Y. Tay, P. Cai, M. I. Setyawati, W. Fang, L. P. Tan, C. H. L. Hong, X. Chen, D. T. Leong, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 83–88.
- [95] R. J. Maughan, M. Harmon, J. B. Leiper, D. Sale, A. Delman, *Europ. J. Appl. Physiol.* **1986**, *55*, 395–400.
- [96] X. Chen, *Small Methods* **2017**, *1*, 1600029.
- [97] J. Di, S. Yao, Y. Ye, Z. Cui, J. Yu, T. K. Ghosh, Y. Zhu, Z. Gu, *ACS Nano* **2015**, *9*, 9407–9415.
- [98] H. K. Graham, J. C. McConnell, G. Limbert, M. J. Sherratt, *Experimental Dermatology* **2019**, *28*, 4–9.
- [99] P. Agache, *Physiologie de la peau et explorations fonctionnelles cutanées*, **2000**.
- [100] S. Kandavilli, V. Nair, R. Panchagnula, *Pharmaceuticals Technology* **2002**, 62–80.
- [101] M. Guyot, F. Fawaz, *International Journal of Pharmaceutics* **2000**, *204*, 171–182.
- [102] J.-Y. Sun, X. Zhao, W. R. K. Illeperuma, O. Chaudhuri, K. H. Oh, D. J. Mooney, J. J. Vlassak, Z. Suo, *Nature* **2012**, *489*, 133–136.
- [103] L. Szabó, C. Gonelle-Gispert, E. Montanari, F. Noverraz, A. Bornet, L. H. Bühler, S. Gerber-Lemaire, *ACS Appl. Polym. Mater.* **2019**, *1*, 1326–1333.
- [104] J. Zhang, N. Wang, W. Liu, X. Zhao, W. Lu, *Soft Matter* **2013**, *9*, 6331.
- [105] T. Bai, P. Zhang, Y. Han, Y. Liu, W. Liu, X. Zhao, W. Lu, *Soft Matter* **2011**, *7*, 2825.
- [106] D. C. Tuncaboylu, M. Sari, W. Oppermann, O. Okay, *Macromolecules* **2011**, *44*, 4997–5005.
- [107] D. A. De Silva, P. J. Martens, K. J. Gilmore, M. in het Panhuis, *J. Appl. Polym. Sci.* **2015**, *132*, DOI 10.1002/app.41216.
- [108] D. Packham, *Handbook of Adhesion, 2nd Edition*, **2005**.
- [109] T. L. Sun, T. Kurokawa, S. Kuroda, A. B. Ihsan, T. Akasaki, K. Sato, Md. A. Haque, T. Nakajima, J. P. Gong, *Nature Mater* **2013**, *12*, 932–937.
- [110] H. Furukawa, K. Horie, R. Nozaki, M. Okada, *Phys. Rev. E* **2003**, *68*, 031406.
- [111] T. Sakai, T. Matsunaga, Y. Yamamoto, C. Ito, R. Yoshida, S. Suzuki, N. Sasaki, M. Shibayama, U. Chung, *Macromolecules* **2008**, *41*, 5379–5384.
- [112] Y. Okumura, K. Ito, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 485–487.
- [113] A. Bin Imran, K. Esaki, H. Gotoh, T. Seki, K. Ito, Y. Sakai, Y. Takeoka, *Nature Communications* **2014**, *5*, 5124.
- [114] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, **1992**, *356*, 3.
- [115] A. HARADA, J. Li, M. KAMACHI, *Proceedings of the Japan Academy, Series B* **1993**, *69*, 39–44.

- [116] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5698–5703.
- [117] A. Harada, M. Okada, J. Li, M. Kamachi, *Macromolecules* **1995**, *28*, 8406–8411.
- [118] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Nature* **1994**, *370*, 126–128.
- [119] S. Loethen, J.-M. Kim, D. H. Thompson, *Polymer Revs.* **2007**, *47*, 383–418.
- [120] M. E. Brewster, T. Loftsson, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 645–666.
- [121] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- [122] T. Ooya, H. Utsunomiya, M. Eguchi, N. Yui, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 62–69.
- [123] T. Ooya, T. Kawashima, N. Yui, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 293–300.
- [124] N. Yui, T. Ooya, T. Kawashima, Y. Saito, I. Tamai, Y. Sai, A. Tsuji, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 582–587.
- [125] J. Li, A. Harada, M. Kamachi, *Polym. J.* **1994**, *26*, 8.
- [126] J. Li, X. Li, Z. Zhou, X. Ni, K. W. Leong, *Macromolecules* **2001**, *34*, 7236–7237.
- [127] T. Kataoka, M. Kidowaki, C. Zhao, H. Minamikawa, T. Shimizu, K. Ito, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 24377–24383.
- [128] X. Liao, G. Chen, X. Liu, W. Chen, F. Chen, M. Jiang, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 4409–4413.
- [129] K. Ito, *Polym J* **2007**, *39*, 489–499.
- [130] T. Karino, M. Shibayama, K. Ito, *Physica B: Condensed Matter* **2006**, *385–386*, 692–696.
- [131] K. Ito, T. Shimomura, Y. Okumura, *Macromol. Symp.* **2003**, *201*, 103–110.
- [132] S. Granick, M. Rubinstein, *Nature Mater* **2004**, *3*, 586–587.
- [133] P.-G. de Gennes, *Physica A* **1999**, *271*, 231–237.
- [134] G. Fleury, C. Brochon, G. Schlatter, G. Bonnet, A. Lapp, G. Hadziioannou, *Soft Matter* **2005**, *1*, 378.
- [135] N. Kihara, K. Hinoue, T. Takata, *Macromolecules* **2005**, *38*, 223–226.
- [136] J. Araki, K. Ito, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* **2006**, *44*, 6312–6323.
- [137] J. Araki, K. Ito, *Soft Matter* **2007**, *3*, 1456.
- [138] T. Ichi, J. Watanabe, T. Ooya, N. Yui, *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 204–210.
- [139] J. Di, S. Yao, Y. Ye, Z. Cui, J. Yu, T. K. Ghosh, Y. Zhu, Z. Gu, *ACS Nano* **2015**, *9*, 9407–9415.
- [140] Y. Zhang, J. Yu, Y. Zhu, Z. Gu, *Nanomedicine* **2016**, *11*, 323–325.
- [141] H. Izawa, K. Kawakami, M. Sumita, Y. Tateyama, J. P. Hill, K. Ariga, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2155.
- [142] L. Xiao, J. Zhu, J. D. Londono, D. J. Pochan, X. Jia, *Soft Matter* **2012**, *8*, 10233.
- [143] L. Xiao, Z. Tong, Y. Chen, D. J. Pochan, C. R. Sabanayagam, X. Jia, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 3808–3819.

Chapitre 2 : Synthèse *one-pot* de polyrotaxanes solubles dans l'eau avec un nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées

Chapitre 2 : Synthèse <i>one-pot</i> de polyrotaxanes solubles dans l'eau avec un nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées	67
2.1. Contexte.....	69
2.1.1. Objectifs.....	69
2.1.2. Approche : une synthèse <i>one-pot</i> de polyrotaxanes solubles dans l'eau avec un nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées.....	70
2.2. Résultats.....	72
2.2.1. Synthèses des β -cyclodextrines modifiées avec groupements acides carboxyliques.....	72
2.2.2. Functionalizing β -cyclodextrins: a simple strategy to control their threading during polyrotaxane formation: article	77
2.2.3. Résultats complémentaires	109
2.3. Conclusion.....	112
Références	113

2.1. Contexte

2.1.1. Objectifs

La prise en charge des maladies chroniques articulaires, présentées dans le chapitre 1, comporte quelques spécificités abordées précédemment. Elle nécessite ainsi un traitement anti-inflammatoire à long terme et bien souvent pluri-journalier. Réduire la fréquence des prises et améliorer la délivrance locale des anti-inflammatoires sont donc deux axes principaux d'amélioration du confort du patient. Le chapitre précédent a mis en avant l'intérêt, dans le cadre d'un traitement anti-inflammatoire au long cours, de concevoir un système de délivrance de principes actifs (PA) hydrophobes, étirable et résistant mécaniquement, à la libération contrôlée et prolongée. La combinaison d'une matrice hydrogel avec des particules lipidiques nanostructurées (NLC) a déjà montré des propriétés très attractives pour former un système de délivrance de PA hydrophobes, assurer la stabilité de la molécule, et proposer une libération contrôlée et prolongée. Dans ce contexte, l'utilisation de polyrotaxanes (PR) comme agents de réticulation dans un réseau polymérique secondaire s'est montrée comme une alternative très intéressante pour apporter une amélioration décisive des propriétés mécaniques du composite hydrogel/NLC envisagé.

Les propriétés mécaniques (extension, gonflement) démontrées par les gels incluant des polyrotaxanes dans leur composition reposent sur la capacité des cyclodextrines à être mobiles. Cette mobilité est étroitement liée à leur densité sur la chaîne polymérique. Le principal enjeu de la synthèse des polyrotaxanes est donc de contrôler le nombre de cyclodextrines enfilées sur la chaîne polymérique. La stratégie habituelle de synthèse des PR est la complexation d'un grand nombre d' α -CD non-modifiées sur une chaîne de poly(éthylène glycol) de longueur variable ^[1-5]. Les solutions proposées jusqu'à présent pour réduire la densité des CD enfilées sont peu contrôlables : boucher les extrémités pendant la complexation ^[6], ajouter des groupements méthyles sur les groupes de fin de chaîne ^[7], ou encore rallonger la chaîne polymérique linéaire du pseudo-polyrotaxane ^[8]. De plus, les polyrotaxanes synthétisés par ces stratégies ont une solubilité dans l'eau qui dépend fortement de la densité finale des CD enfilées. En plus, pour pouvoir être facilement associé à la conception d'un hydrogel biocompatible, le polyrotaxane final doit être soluble dans l'eau. Ce travail de thèse propose dans ce chapitre une nouvelle alternative à ces méthodes, qui va

permettre de contrôler précisément le nombre de cyclodextrines enfilées et de produire un polyrotaxane soluble dans l'eau.

2.1.2. Approche : une synthèse *one-pot* de polyrotaxanes solubles dans l'eau avec un nombre contrôlé de cyclodextrines enfilées

La synthèse originale développée dans ce chapitre permet l'obtention de polyrotaxanes (PR) solubles dans l'eau et avec un degré de complexation de CD contrôlé. 1, 2, 4 ou 8 dérivés acides carboxyliques des β -cyclodextrines (β -CD-(COOH)_x x=0, 1, 2) peuvent être enfilées sur une chaîne de PPG-PEG-PPG (poloxamère) pour conduire à une série de PR solubles en solution aqueuse. La synthèse fait appel à un poloxamère commercial, le *pluronic® reverse 10R5* (HO-PPG₉-PEG₂₄-PPG₉-OH) modifié préalablement pour introduire deux groupements thiols terminaux, et à des β -cyclodextrines modifiées par des groupements acides carboxyliques, β -CD-(COOH)_x (x=0-2) (Figure 2.1). Il est établi que le nombre moyen de β -CD-(COOH)_x par chaîne de polymère peut être systématiquement contrôlé par les 3 paramètres suivants : 1) le temps de réaction, 2) le nombre d'équivalents molaires de CD par rapport au nombre de moles de poloxamère engagé, 3) le nombre de groupements acides carboxyliques greffés sur les β -CD. Enfin, la fermeture des pseudo-polyrotaxanes par des groupes encombrants en fin de chaîne polymérique se fait par une réaction thiol-ène photo-activée entre les groupements terminaux thiols du poloxamère et des β -CD-pentèneamine (**2**) préalablement synthétisées (Figure 2.1).

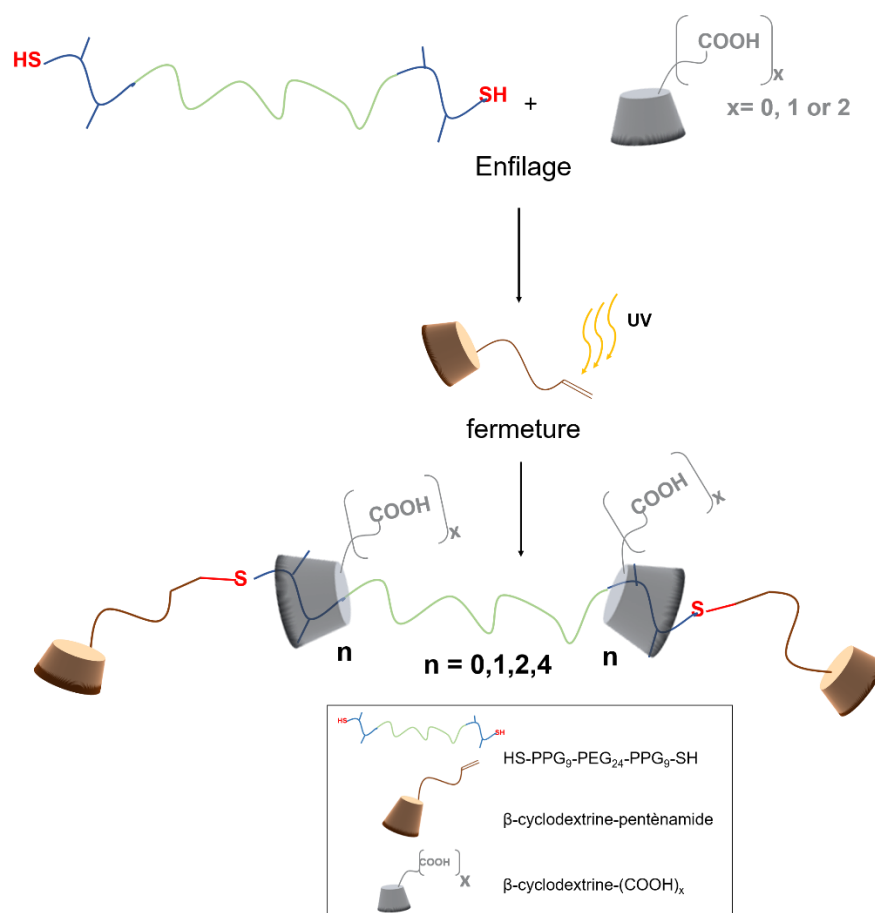


Figure 2.1. Stratégie de synthèse des polyrotaxanes faisant intervenir des β -cyclodextrines sélectivement fonctionnalisées avec des groupements acides carboxyliques (β -CD-(COOH) $_x$).

Les différents polyrotaxanes obtenus ont été précisément caractérisés par différentes méthodes RMN et spectrométrie de masse. Leur structure macroscopique en solution a également été étudiée par microscopie électronique en transmission et à force atomique.

Les résultats de cette étude ont été soumis pour publication et sont présentés ci-après (section 2.2.2). Des résultats complémentaires sur l'influence de la position des groupements -COOH sur le degré de complexation complètent ce travail (sections 2.2.1 et 2.2.3).

2.2. Résultats

2.2.1. Synthèses des β -cyclodextrines modifiées avec groupements acides carboxyliques

La synthèse des β -CD fonctionnalisées mono- et di-acides carboxyliques a été effectuée selon deux méthodes différentes.

La première voie de synthèse, adaptée du travail de A. Charlot et al. est non spécifique. Basée sur une oxydation par le réactif de Dess-Martin, le produit final obtenu est un mélange de β -CD avec entre 0 et 4 groupes acides carboxyliques situés de façon aléatoire sur les unités glucose de la cyclodextrine (Figure 2.2A et 2.4) [9,10].

L'alternative proposée est adaptée du travail de Auzély-Velty et al [10]. Elle est basée sur l'utilisation de β -cyclodextrines commerciales, modifiées avec des groupements amine. En commençant la synthèse à partir d'une β -CD fonctionnalisée avec deux groupes amines réactifs à des positions déterminées, une seule version des isomères (isomère AD) est ici présente à la fin de la procédure (Figure 2.2B et 2.5).

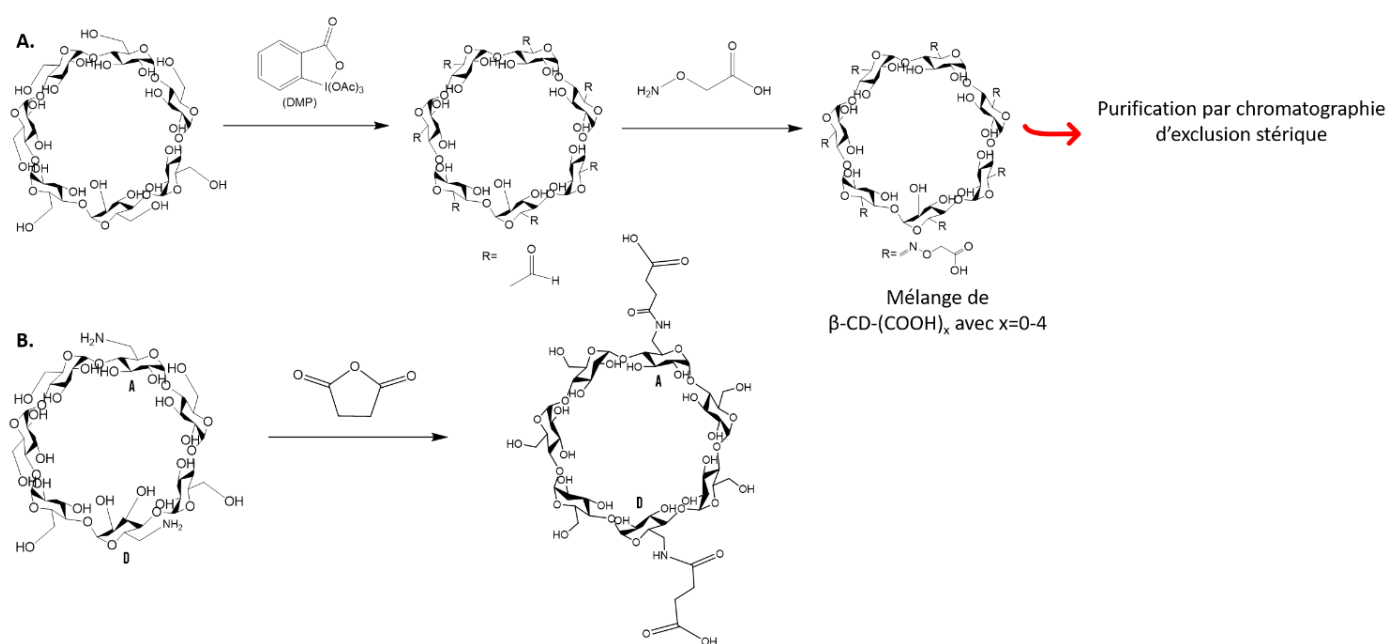


Figure 2.2 : Stratégie de synthèse des β -CD-(COOH)_x à partir de β -CD naturelle (A) ou de l'A,D-6-diamino-6-dideoxy- β -cyclodextrine (B)

Les deux stratégies synthétiques sont détaillées ci-dessous. Ces deux types de β -CD-(COOH)_x ont ensuite été utilisés dans la formation de polyrotaxanes au nombre contrôlé de

cyclodextrines enfilées. Les résultats obtenus avec les β -CD-(COOH)_x synthétisées par oxydation par le réactif de Dess-Martin sont discutés dans l'article inséré dans la partie 2.2.2. Les résultats obtenus avec les β -CD-(COOH)_x synthétisées selon la deuxième méthode sont explicités dans la partie résultats complémentaires au paragraphe 2.2.3.1.

2.2.1.1. Oxydation par le réactif de Dess-Martin

La première stratégie synthétique commence à partir de la β -cyclodextrine naturelle commerciale. L'oxydation des groupes hydroxyles primaires placés sur le carbone C₆ grâce au réactif de Dess-Martin (« DMP » pour Dess-Martin Periodinane) permet l'obtention de groupes aldéhyde sur la β -cyclodextrine de façon quasi quantitative. Leur nombre (compris entre 0 et 4 groupes par cyclodextrine) dépend du nombre d'équivalents molaires d'agent oxydant (DMP) et du temps de réaction ^[9]. Plusieurs nombres d'équivalents molaires ont été testés (Tableau 2.1) pour optimiser le pourcentage de dérivés di-acides carboxyliques obtenus *in fine*, à partir de travaux précédents de l'équipe du CERMAV. Leur position est aléatoire sur les 7 positions disponibles. La deuxième étape est la formation d'une liaison oxime stable entre les groupes aldéhydes et la *O*-(carboxyméthyl)hydroxylamine ^[9].

Tableau 2.1. Récapitulatif des différents essais d'oxydation des cyclodextrines par le réactif de Dess-Martin. Influence du nombre d'équivalent de DMP sur la masse de (α ou β)-CD-(COOH)₂ obtenue.

Entrées	Type de CD	Eq de DMP	% de (α ou β)-CD-(COOH) ₂
1	α -CD	3	28% (SEC analytique)
2	α -CD	4	62mg pour 640mg injecté sur la SEC préparative
3	β -CD	4	24 mg pour 256 mg injectés sur la SEC préparative

Une chromatographie d'exclusion stérique est ensuite nécessaire pour séparer les dérivés de β -cyclodextrine en fonction du nombre de groupes acide carboxyliques greffés (Figure 2.3). Les dérivés mono- et diacides carboxyliques des β -cyclodextrines sont finalement obtenus

avec 3% de rendement global. La chromatographie préparative sur 3 colonnes Superdex S30 en série (détails des conditions expérimentales dans le chapitre 5) et le processus d'élimination du sel d'éluion par dialyse entraînent de fortes pertes de produits, malgré plusieurs essais pour optimiser les différentes conditions. Ces difficultés de synthèse, en plus des raisons stériques développées dans les paragraphes suivants, ont motivées la recherche d'une voie alternative de synthèse pour ces produits.

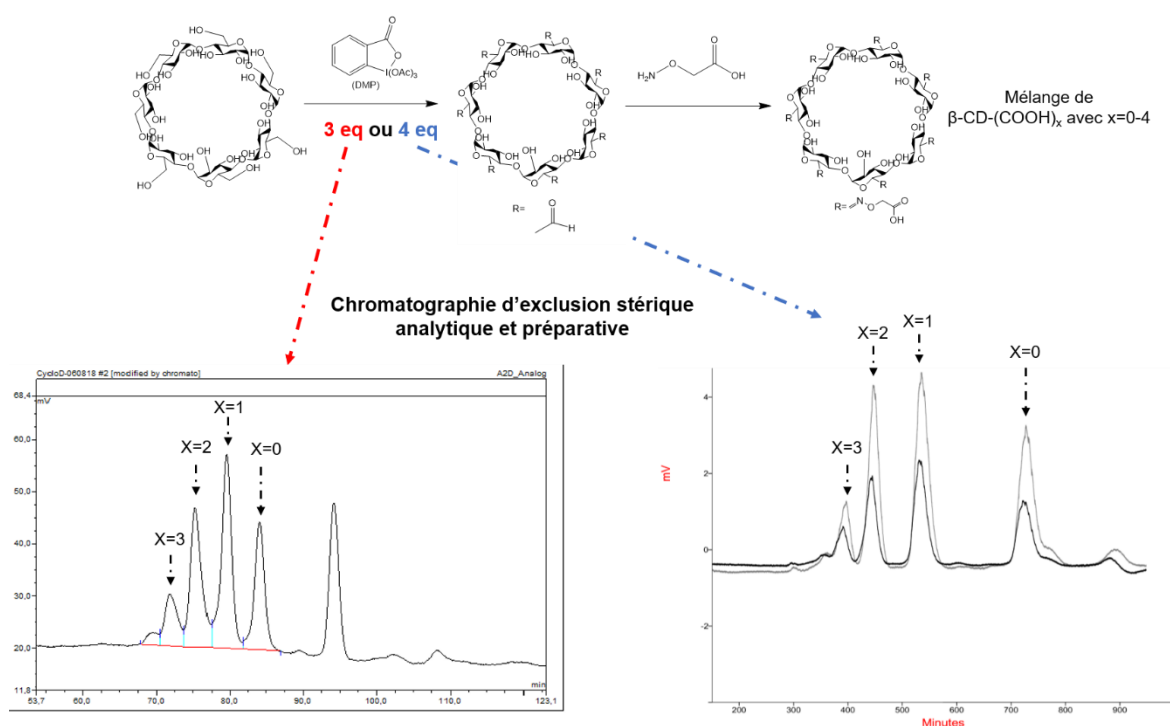


Figure 2.3. Chromatogrammes obtenus du produit brut des deux réactions successives d'oxydation puis réaction de l'hydroxylamine sur les aldéhydes des cyclodextrines. Le récapitulatif des différents essais est à retrouver dans le tableau 2.1, ci-dessous.

Dans le cas des β -CD-(COOH)₂, le résultat final est un mélange d'isomères AB, AC et AD, comme décrits sur la Figure 2.4.

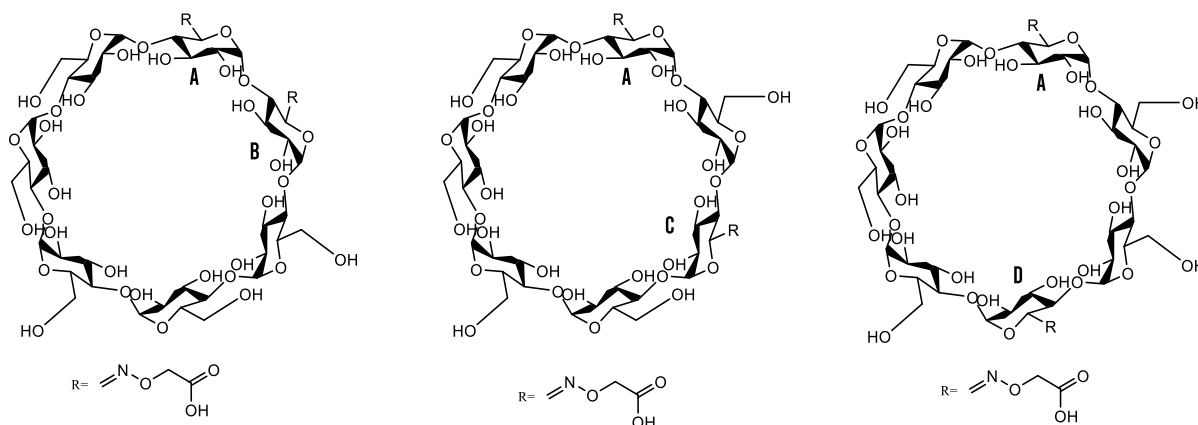


Figure 2.4. Différents isomères de β -CD-(COOH)₂ constituant le produit **1b**.

Les β -CD-(COOH)_{x=1} ou 2 ainsi synthétisées ont ensuite été utilisés pour la synthèse des polyrotaxanes. Les résultats sont détaillés dans l'article au paragraphe 2.2.2.

2.2.1.2. Utilisation de β -cyclodextrines commerciales modifiées avec des groupements amine

Pour trouver une alternative à la longue procédure décrite dans le paragraphe précédent, des β -cyclodextrines mono- et diacides carboxyliques supplémentaires ont été synthétisées en une seule étape à partir de deux produits de départ commerciaux : la 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrine et l'*A,D*-6-diamino-6-dideoxy- β -cyclodextrine. En présence d'anhydride succinique dans le *N,N*-diméthylformamide, l'*A,D*-di-acide carboxylique- β -cyclodextrine et la β -CD-monoacide carboxylique sont respectivement obtenues avec des rendements de 63% et de 55% respectivement (Figure 2.2B). L'amidation est sélective, ainsi on ne récupère à la fin de la procédure qu'un unique isomère (Figure 2.5).

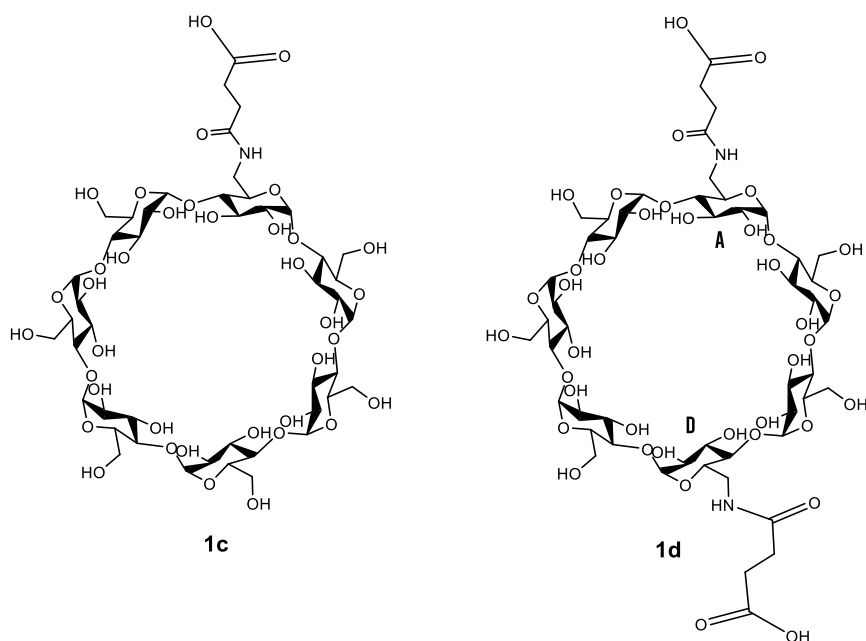


Figure 2.5. β -CD-(COOH)_{x=1 et 2} obtenues sélectivement grâce à l'amidation de la 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrine (**1c**) et de l'*A,D*-6-diamino-6-dideoxy- β -cyclodextrine (**1d**).

Ces cyclodextrines ont été ensuite utilisées pour la synthèse des polyrotaxanes. Elles ont ainsi permis de comprendre l'influence de la position des substituants sur l'efficacité d'enfilement des cyclodextrines. Les résultats sont présentés en détails dans la partie 2.3.1.

2.2.2. Functionalizing β -cyclodextrins: a simple strategy to control their threading during polyrotaxane formation: article

Soumis à Carbohydrate Polymers

Functionalizing β -cyclodextrins: a simple strategy to control their threading during polyrotaxane formation

Claire Desfrancois^{a,b}, Isabelle Texier^a, Rachel Auzely^{*b}

^a University Grenoble Alpes, CEA-Leti, 38000 Grenoble, France

^b University Grenoble Alpes, Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales (CERMAV)-CNRS, Grenoble, 38041, France

*Corresponding author.

Tel.: +33 04 76 03 76 71

E-mail address: rachel.auzely@cermav.cnrs.fr (R. Auzély-Velty).

Abstract

Water-soluble polyrotaxanes (PRs) with a precisely controlled number of threaded cyclodextrins (CDs) were obtained in high yield thanks to an original one-pot synthesis. The PRs were formed from β -cyclodextrin-(COOH)_x (where x = 1 or 2), Pluronic 10R5 modified with thiols at both ends (dithiol-poly(propylene glycol)-block-poly(ethylene glycol)-block-poly(propylene glycol), M_n = 2000 g/mol) and an alkene-functional β -cyclodextrin as stopper using a UV-induced thiol-ene coupling reaction. The number of threaded CDs was determined by 1D and 2D ¹H NMR spectroscopy. The influence of the synthesis parameters on the number of threaded CDs were thoroughly investigated. PRs with a low density of threaded CD rings were thus successfully synthesized and characterized. The PRs were further investigated by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron (ESI-FT-ICR) mass spectrometry, atomic force microscopy (AFM), and transmission electron microscopy (TEM) analyses. With a controlled and reduced number of threaded CDs and several active carboxylic acid functions available on these mobile cyclodextrins, these water-soluble and biocompatible polyrotaxanes open new possibilities for the development of biomaterials with user-defined and dynamic properties.

Keywords: cyclodextrin, polyrotaxane, host-guest complexation, thiol-ene chemistry

1. Introduction

Since their discovery in the 1990's by Harada and co-workers, (Harada et al., 1992, 1994b, 1995; Harada, Li, & Kamachi, 1993) polyrotaxanes have attracted great interest for the design of smart materials with dynamic functionality. One of the structural features of PRs is the absence of any covalent bonds between cyclic compounds (host molecules) and a linear polymeric chain (guest) capped with bulky end-groups at both terminals. The cyclic compounds in a PR, also referred to as molecular necklace, can thus slide and/or rotate along the polymer axle (Harada, 2001). This particular feature of molecular mobility can endow materials with dynamic properties (Loethen et al., 2007). Cyclodextrins are the most used host molecules in the design of PRs due to their outstanding ability to form inclusion complexes with a wide range of guest molecules and their biocompatibility (Brewster & Loftsson, 2007; Rekharsky & Inoue, 1998)

The two motion modes (rotation and sliding) that threaded cyclodextrins possess open wide and various possibilities to create new materials. For instance, the ability of functional ligand-modified CD to slide or rotate along the axle allow them to interact more efficiently with protein receptors. Polyrotaxanes prepared from CDs functionalized with maltose units were shown to bind to the plant lectin *concanavalin A* with an affinity more than three times greater than poly(acrylic acid) modified with a similar number of maltose units (Ooya, Utsunomiya, et al., 2005). The enhancement of the multivalent interactions was correlated with the mobile motion of the maltose-conjugated CDs in the polyrotaxane. Other efficient biosensing probes were also developed from PR based on cyclodextrins functionalized with peptide ligands or biotin (Ooya et al., 2001; Yui et al., 2002). Besides, by crosslinking *N*-isopropylacrylamide (NIPAAm) with polyrotaxanes, Feng and al. (Wei et al., 2005) and Yui et al. (Ooya, Akutsu, et al., 2005) obtained thermosensitive hydrogels with original properties related to the sliding motion of CDs in the PR. It was thus shown that the aggregation of the poly(NIPAAm) matrix crosslinked with PRs capped with bulky end-groups via ester linkages above the lower critical solution temperature of poly(NIPAAm) induced the sliding of the CD molecules from the terminal ester linkages. This temperature-triggered CD motion resulted in exposure of the ester linkage to the aqueous medium and enhanced erosion of the hydrogels. In PR hydrogels, the mobility of cyclodextrins can also affect the mechanical properties of the cross-linked materials. Bin Imran et al. showed the ability to obtain thermoresponsive slide-

ring hydrogels by crosslinking synthetic poly(NIPAAm) with polyrotaxanes (Bin Imran et al., 2014). In these networks, the crosslinking points were formed by the cyclodextrins that could slide along the threaded poly(ethylene glycol) (PEG) backbone. The polymer chain sliding through the cross-links significantly improved the extensibility of the poly(NIPAAm)/polyrotaxane gels.

In all these applications, the main challenge is to ensure suitable sliding motion of cyclodextrins along the polymer axle. Therefore, controlling the density of threaded CD molecules is crucial. The usual route for polyrotaxanes synthesis relies on the inclusion complexation of many α -CD and poly(ethylene glycol) (PEG) (Bin Imran et al., 2014; Ooya, Akutsu, et al., 2005; Ooya et al., 2001; Ooya, Utsunomiya, et al., 2005; Wei et al., 2005; Yui et al., 2002). As the threading of cyclodextrins onto the polymer axle is partially driven by multifold intermolecular hydrogen bonds between cyclodextrins, densely threaded complexes are formed, resulting in limited chain sliding of CDs. Moreover, because of the robust channel crystals formed by hydrogen bonds, polyrotaxanes are insoluble in water, although their components (PEG and CD) are soluble. Yet, water-solubility and functionality are key properties for the biomedical applications of PR (Li & Loh, 2008; Yui et al., 2009).

In order to decrease the density of threaded α -CD, different approaches consisting in end-capping PEG during half-way complexation (Fleury et al., 2005), modifying the end groups of PEG with methyl groups (Kato et al., 2015) or by extending the linear polymers in the pseudo-PR (Kobayashi et al., 2018) have been proposed. However, these studies have only focused on the threading of non-modified α -CD and the water-solubility of the resulting PR was variable depending on the PR coverage. Thus, systematic control of the threading ratio of CD molecules to obtain water-soluble PRs for use as molecular machines in the biomedical field is still challenging.

In the present paper, we report the simple and efficient synthesis of water-soluble polyrotaxanes with controllable complexation degrees (n_{CD} , average number of CD molecules per polymeric chain), using β -cyclodextrins selectively modified with carboxylic acid groups as host molecules (Fig. 2.6). The polyrotaxanes were prepared following a new one-pot synthetic procedure starting from the reverse Pluronic 10R5 end-functionalized with thiols (HS-PPG₉-PEG₂₄-PPG₉-SH). This study reveals that the average number of CD molecules per polymer chain can be systematically controlled by (i) the reaction time, (ii) the number of molar equivalents of CD with respect to the mole number of Pluronic, and (iii) the number of -COOH

groups introduced on β -CD. This work thus establishes for the first time the feasibility of precisely controlling the PR coverage using carboxylate-modified CD as host molecules.

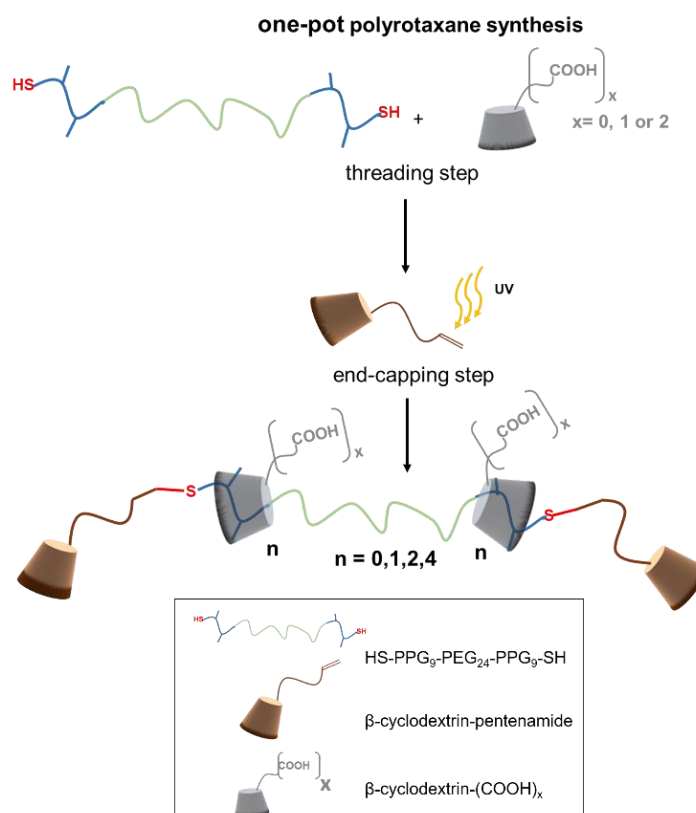


Fig. 2.6. Strategy of synthesis of polyrotaxanes using β -cyclodextrins selectively modified with carboxylic acid groups (β -CD-(COOH)_x) as host molecules.

2. Experimental section

2.1. Materials

β -cyclodextrin (β -CD) was kindly provided by ROQUETTE (Lestrem, France). Pluronic 10R5 (average $M_n = 2000$ g/mol), 3-mercaptopropionic acid, (3-aminopropyl)triethoxysilane, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, 1,4-dithiothreitol, Dess-Martin periodinane, *O*-(carboxymethyl)hydroxylamine, uranyless and pentenoic anhydride were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin hydrochloride was purchased from Cyclodextrin-Shop (Tilburg, Netherlands). 2-Hydroxy-1-[4-(2-hydroxy-ethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone (Irgacure 2959) was kindly provided by

Ciba Specialty Chemicals (Basel, Switzerland). The Spectra/Por membranes (MWCO 3500 Da and 500-1000 Da) used for dialysis were obtained from Fisher Scientific (Rancho Domingez, CA). The water used in all experiments was purified by an Elga Pure lab purification system, with a resistivity of 18.2 M Ω •cm

2.2. Synthesis of the carboxylic acid- β -cyclodextrin derivatives

The carboxylic acid modified- β -cyclodextrin derivatives (β -CD-(COOH)₂ and β -CD-COOH)₁ were synthesized as described in (Charlot et al., 2006) (Auzély-Velty et al., 2000). Their chemical integrity and purity were confirmed by ¹H NMR spectroscopy (Fig. S1 and S2).

2.3. Synthesis of β -cyclodextrin-pentenamide

To a vigorously stirred solution of 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin hydrochloride (370 mg, 0.316 mmol) in water (30 mL), 1 M NaOH (282 μ L, 0.2820 mmol) was dropped at 0°C. The mixture was kept at 0°C and stirred for 15 min. After solvent removal (lyophilization), the resulting white powder β -CD-NH₂ was used in the next step without further purification (370 mg, 100 %). To a vigorously stirred solution of β -CD-NH₂ (370 mg, 0.316 mmol) in dry dimethylformamide (DMF; 50 mL) at room temperature *N,N*-diisopropylethylamine (49 mg, 0.379 mmol) and 4-pentenoic anhydride (69 mg, 0.379 mmol) were added to the mixture. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was poured into acetone (300 mL). The white precipitate was collected by filtration, washed with acetone (3 \times 100 mL), and dried to afford β -CD-pentenamide **2** as a white powder (228.5 mg, 60 %). ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 5.8 ppm (1H, s, CH-CH₂), 5.2 ppm (7H, s, H₁), 3.4 ppm (1H, dd, CH₂-NH), 3.3 ppm (1H, dd, CH₂-NH), 2.4 ppm (4H, m, C₂H₄-CH-CH₂). ¹³C NMR (400 MHz, D₂O, δ): 29.38 ppm (s, CH₂-CH₂-CH=CH₂), 34.64 ppm (s, CH₂-CH₂-CH=CH₂), 40.15 ppm (s, CH₂-NH-CO), 60.14 ppm (s, C₆), 71.51 ppm (s, C₅), 73.06 ppm (s, C₂), 81.08 ppm (s, C₃), 82.89 ppm (s, C₅), 102.0 ppm (s, C₁), 115.9 ppm (s, CH=CH₂), 136.9 ppm (s, CH=CH₂).

2.4. Synthesis of of the polyrotaxanes

The modification of Pluronic reverse 10R5 with thiol groups was performed using the following conditions. 10R5 (2 g, 0.940 mmol) was dissolved in dry toluene (100 mL). 3-Mercaptopropionic acid (2 g, 18.9 mmol), *p*-toluenesulfonic acid (35.8 mg, 0.188 mmol), dithiothreitol (72.5 mg, 0.47 mmol) were then added to the mixture at room temperature. The mixture was then stirred at 104°C for 24 hours. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was dissolved in water and dialyzed against water (MWCO 500-1000 Da). After solvent removal (lyophilization), a yellow oil was obtained (**3**). ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 1.2 ppm (54H, s, CH₃), 2.75 ppm (8H, m, CO-C₂H₄-SH). ¹³C NMR (400 MHz, D₂O, δ): 15.8-18.12 ppm (s, CH₃), 66.3-66.7 ppm (s, CH₃), 69.7-72.1 ppm (s, CH₂-O), 73.8 ppm (s, HS-CH₂-CH₂-CO), 75.5 ppm (CH-CH₃).

All the syntheses of polyrotaxanes were performed as described in the following example using β-CD-(COOH)₂ or β-CD-(COOH)₁ as host molecule, and with the difference that the complexation time was varied from 24 h to 72 h and the initial molar ratio of CD-to-Pluronic 10R5 from 5 to 12. The thiol-end modified 10R5 (**3**, 10 mg, 4.36x10⁻⁶ mol) and β-CD-(COOH)₂ (derivative **1b**, 28 mg, 2.2 x 10⁻⁵ mol) were dissolved in degassed acetate buffer (pH=5.5, 0.1 M, 1.5 mL) containing tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, 4.5 mg, 1.6 x 10⁻⁵ mol). The mixture was stirred for 24 hours under nitrogen. β-cyclodextrin-pentenoate **2** was added to the mixture dissolved in 1.5 mL of the same acetate buffer. The pH of the mixture was then increased to pH=7.5 with 0.5 M aqueous NaOH and 50 μL of an aqueous solution of Irgacure 2959 (1 mg/mL) was added to the solution to obtain a final photoinitiator concentration of 1% (w/v). The mixture was exposed under UV light (20 mW/cm², 365 nm) for 10 min. Finally, the solution was dialyzed against water (MWCO 3.5 kDa). After solvent removal (lyophilisation), 23 mg of a white powder of polyrotaxane with two threaded β-CD-(COOH)₂ were obtained (72% yield). ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 7.75 ppm (8H, s, CH-N), 5.2 ppm (28H, s, H₁), 4.5 ppm (8H, m, CO-CH₂-COOH), 2-2.5 ppm (16H, m, CO-C₄H₈-S), 1.2 ppm (54H, s, CH₃). ¹³C NMR (400 MHz, D₂O, δ): 15.8-18.12 ppm (s, CH₃), 22.70-29.53 ppm (s, NH-CO-(CH₂)₄-S), 66.3-66.7 ppm (s, CH₃), 60.02 ppm (s, C6), 69.7-72.1 ppm (s, CH₂-O), 71.6 ppm (s, C2), 73.2 ppm (s, C5), 73.8 ppm (s, HS-CH₂-CH₂-CO), 75.5 ppm (s, CH-CH₃, C3), 80.98 ppm (s, C4), 101.2 ppm (s, C1), 148.5 ppm (s, CH-N).

2.5. Characterizations

The ^1H NMR and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 400 MHz at 298 K, using deuterium oxide (D_2O from SDS, Vitry, France) as a solvent. Chemical shifts (δ in ppm) were given relative to external tetramethylsilane (TMS = 0 ppm) and calibration was performed using the signal of the residual protons of the solvent as a secondary reference.

DEPTQ 135 spectra were recorded using 90° pulses, 20,161 Hz spectral width, 65,536 data points, 1.638 s acquisition time, 2 s relaxation delay and 8,192 scans. Proton spectra were recorded with a 4000 Hz spectral width, 65,536 data points, 8,192 s acquisition times, 10 s relaxation delays, and 16 to 64 scans. The ^1H and ^{13}C -NMR assignments were based on ^1H - ^1H homonuclear and ^1H - ^{13}C heteronuclear correlation experiments (correlation spectroscopy, COSY and heteronuclear single quantum correlation, HSQC). They were performed with a 3201 Hz spectral width, 2048 data points, 0.319 s acquisition time, 1.5 s relaxation delay; 32 to 512 scans were accumulated. ^1H diffusion ordered spectroscopy NMR (^1H DOSY NMR) spectra were recorded with a 5 mm broad band probe including a z-axis gradient coil with the maximum gradient strength of $53 \text{ G}\cdot\text{cm}^{-1}$. Samples were studied in 5 mm outer diameter tubes. These experiments were performed in 16 steps with the standard Bruker ledbpgp2s pulse program using stimulated echo and longitudinal eddy delay with bipolar gradients and two spoil gradients. The recycle delay was equal to 1 s whereas gradient pulses varied between 1900 and 2000 ms and diffusion times were 0.080 up to 0.150 s. Individual rows of the 2D diffusion databases were phase- and baseline-corrected. Details concerning experimental conditions are given in the Fig. captions.

Mass spectrometry measurements were performed using a 7 T Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) tandem mass spectrometer (Bruker Apex-Qe) equipped with an Apollo II ESI ion source (Bruker Daltonics), a quadrupole mass filter, and a hexapole accumulation/collision cell. The solution was introduced in the source using direct infusion with a syringe pump at a flow rate of $3 \mu\text{L}/\text{min}$. Spray voltage of 4 kV and a capillary temperature of 180°C were used.

The atomic force microscopy images were recorded on the AFM Shimadzu SPM-9700 (Shimadzu, France) with the dynamic mode. 3 μ L of a 1 mg/mL polyrotaxane solution were deposited on a silicium surface. The drying step was performed under atmospheric conditions for at least 15 minutes. The images were then taken with the aforementioned settings.

For TEM analysis, all samples were dispersed in ultrapure water, a drop was placed on carbon grid and stained with Uranylless (Delta Microscopies). The samples were observed with a Jeol EM 2100F (FEG) transmission electron microscope (JEOL, Massachusetts, EUA) operating at 200 kV.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis of the polyrotaxane building blocks

Our strategy to control the number of cyclodextrins threaded on the Pluronic axle relied on the use of mono- and dicarboxylic acid-functionalized β -cyclodextrins (β -CD-(COOH)_x, with x = 1 or 2). First, adding negatively charged carboxylic acid groups disrupted intermolecular hydrogen bonds between cyclodextrins and thereby, the polyrotaxane ring density. Secondly, it improved the water-solubility of polyrotaxanes.

The mono- and dicarboxylic acid-modified β -CD (**1a** and **1b**, Fig. 2.7) were synthesized according to a previously described procedure (Charlot et al., 2006). It consisted in the oxidation of natural β -CD using Dess-Martin periodinane (DMP), followed by the reaction of the aldehyde CD derivatives with *O*-(carboxymethyl)hydroxylamine, and purification by gel permeation chromatography to recover the derivatives **1a** and **1b**. The final products were recovered with 3 % overall yield each (¹H NMR spectra in Fig. S1 and S2 respectively). As the DMP oxidation randomly affected the seven primary hydroxyl groups of β -CD, three (AB, AC, and AD) disubstituted β -CD isomers were obtained (Auzély-Velty et al., 2000). The use of both carboxylic acid-CD derivatives **1a** and **1b** as host molecules allowed us to assess the effect of the number of the carboxylic acid groups on the threading mechanism.

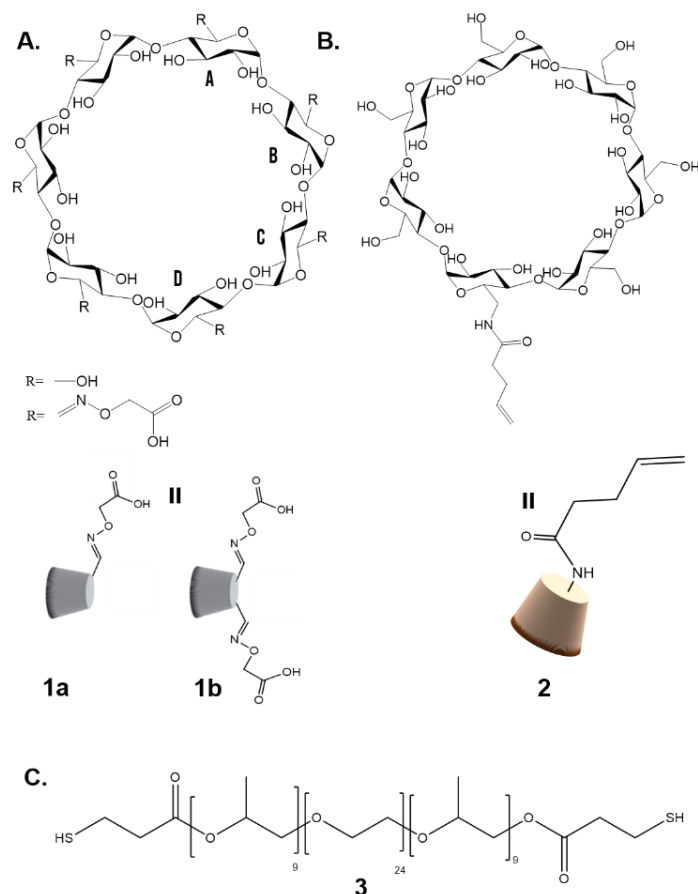


Fig. 2.7. Structures of the polyrotaxane building blocks: (A) carboxylic acid-modified β -CD derivatives, (B) β -CD-pentenamide, and (C) thiol-end functionalized Pluronic.

The β -cyclodextrin-pentenamide derivative **2** was used as stopper as i) it was suitable to prevent the threaded β -CD from dethreading, and ii) it was water-soluble and should be biocompatible. This derivative was obtained by an amidation reaction between 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin and 4-pentenoic anhydride.

The Pluronic 10R5 (PPG₉-PEG₂₄-PPG₉) was selected as the guest polymer in order to synthesize the PR via a one-pot strategy in water. In contrast to α -CD, β -CD does not yield inclusion complexes with PEG, but it produces complexes with poly(propylene glycol) (PPG) (Harada et al., 2009). However, the drawback of PPG is its poor solubility in water. Pluronic 10R5, which is soluble in water, was end-functionalized with thiol groups by reaction with 3-mercaptopropionic acid, affording the thiol-end derivative **3**.

3.2. Synthesis and characterization of polyrotaxanes

The polyrotaxanes were synthesized via an original one-pot strategy in water. The synthetic procedure, consisting of two reaction steps (complexation and end-capping) is displayed in Fig. 2.8. The complexation step was carried out by varying two parameters: time of reaction and molar equivalents of β -CD-(COOH)_x with respect to the poloxamer molar quantity. As discussed in the next sections, these parameters were crucial to control the number of threaded cyclodextrins. The end-capping reaction consisted in a simple and efficient UV-induced thiol-ene reaction carried out in water between the pseudo-polyrotaxanes and β -CD-pentenamide **2** in the presence of the water-soluble Irgacure 2959 photoinitiator. The very short time of this reaction (10 min) was a prominent advantage of this end-capping strategy. To our knowledge, this is the first example of application of photo-induced thiol-ene coupling reactions as a fast end-capping method in the one-pot synthesis of PR.

After purification of the PR by dialysis against ultra-pure water and freeze-drying, the pure polyrotaxanes were recovered with fairly good yields ranging from 45 to 73% (Table 2.2 and 2.3). The yield values confirmed the high efficiency of our one-pot strategy.

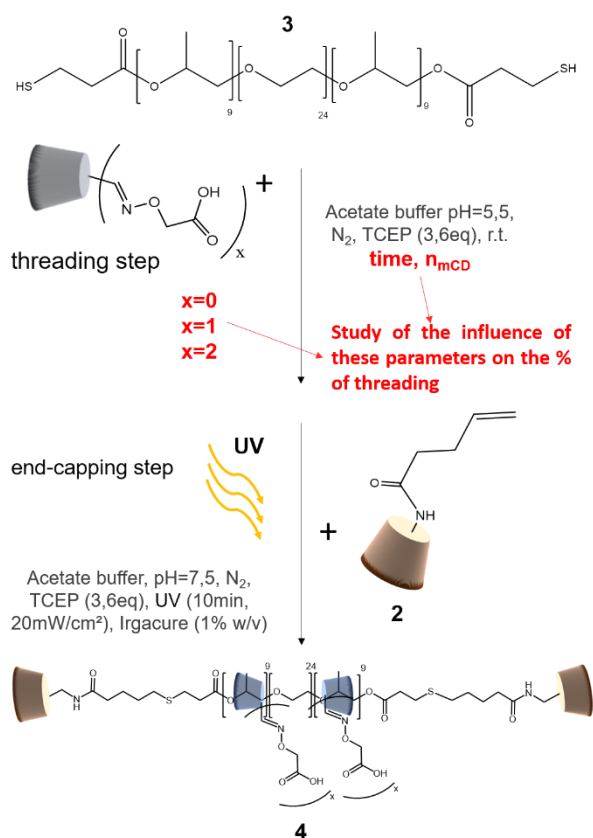


Fig. 2.8. Polyrotaxane synthesis route.

The structures of the polyrotaxanes were confirmed by ^1H NMR spectroscopy, which also allowed to determine the complexation degrees, n_{CD} (Fig. 2.9, and Fig. S3, S4 and S5). Fig. 2.9 compares the ^1H NMR spectra of the different PR prepared from the dicarboxylic acid-modified β -CD **1b**. The number of threaded CD, n_{CD} , was derived from the integration values of the methyl groups of the PPG units (**a**), used as the reference, of the anomeric proton signals (H_1) of cyclodextrins (**d**), and of the $\text{CH}_2\text{-COOH}$ proton signals of the threaded cyclodextrins (**c**). The number of threaded CDs could also be confirmed by the integration of the proton signal of the oxime bond (**e**).

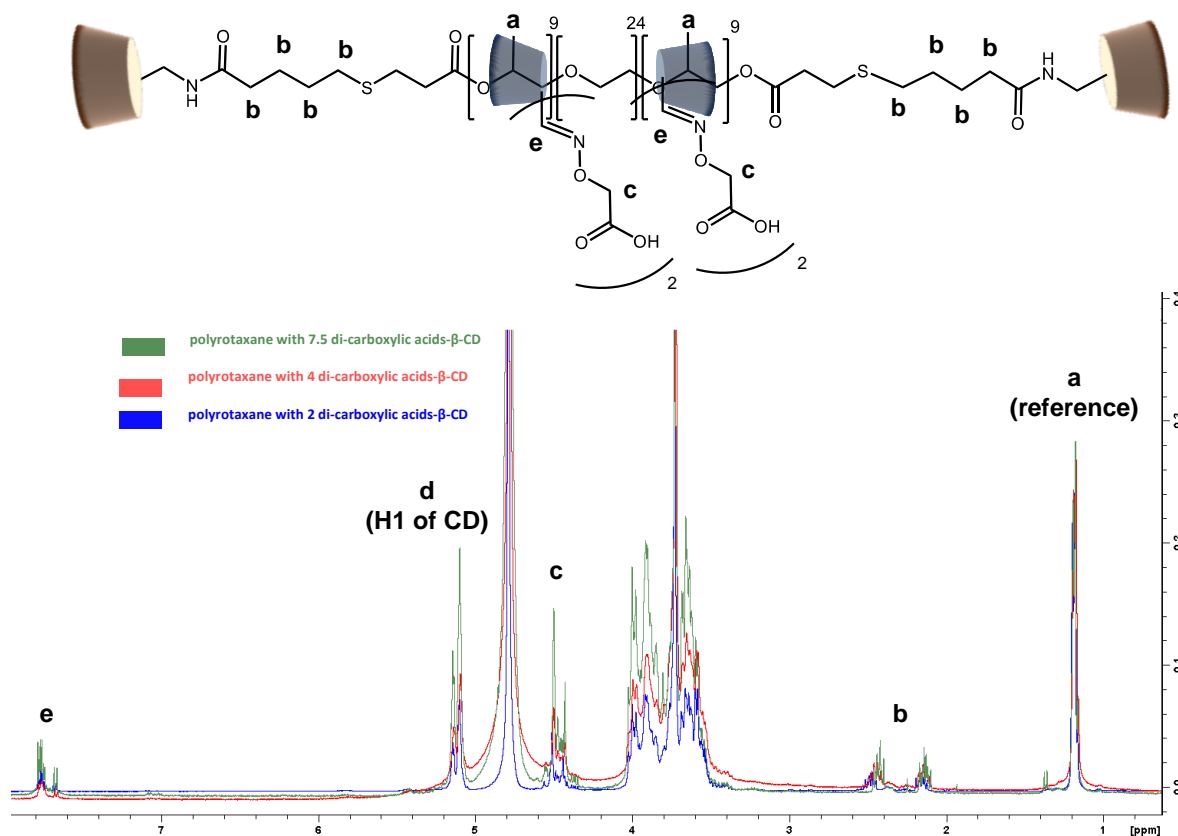


Fig. 2.9. (A) ¹H NMR spectrum (400 MHz, 25 °C, D₂O) of polyrotaxane with 2 β-cyclodextrins-(COOH)₂ (Table 1, entry 3). (B). Superposition of ¹H NMR spectra (400 MHz, 25 °C, D₂O) of polyrotaxanes with 2, 4 and 7.5 β-cyclodextrins-(COOH)₂ (Table 2.3, entry 4 and 6)).

As mentioned above, β-cyclodextrins selectively interact with PPG units (Okada et al., 1999), with a molar ratio of CD:PPG unit of 1:2 (Harada et al., 1995). Herein, the selective interaction between the COOH-modified β-CD and PPG units was confirmed by 2D NOESY NMR spectra (Fig. 2.10). Indeed, as shown in Fig. 2.10, a strong cross-peak between the inner-cavity H-3 protons of the COOH-modified β-CD, assigned thanks to 2D TOCSY spectra, and the methyl protons of PPG could be observed.

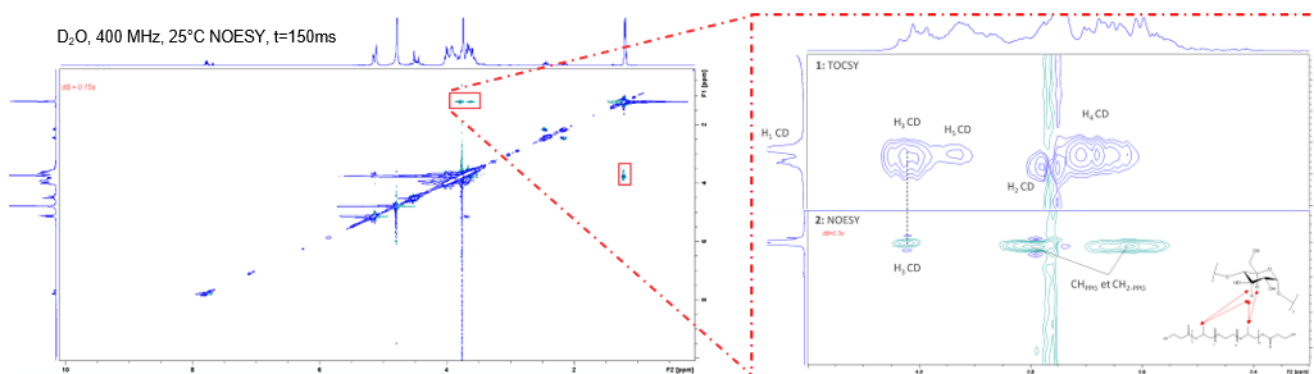


Fig. 2.10. Contour plot of a 2D NOESY experiment (400 MHz, 25 °C, D₂O, 300 ms mixing time) performed with a polyrotaxane with 4 threaded β -cyclodextrins-(COOH)₂ (Table 2.3, entry 4) and its zoom of the segment of interest, assigned thanks to 2D TOCSY spectra.

The supramolecular structure of the polyrotaxanes was further studied by FT-ICR (Fourier-transform ion cyclotron resonance) mass spectrometry. Several analyses of polyrotaxanes by electron-spray ionization in negative mode were performed. Full, intact polyrotaxanes could not be detected in our m/z range. However, several interesting fragments of polyrotaxanes were found. Especially, one ion at $m/z = 1023$ could be assigned to two β -CD-(COOH)₂, surely negatively charged, associated to a Pluronic fragment cleaved after 4 units of PPG (Fig. S6). This fits with the theoretical ratio of 1 β -CD for 2 PPG units.

By varying the nature of the COOH-modified β -CD, the initial molar ratio of CD-to-Pluronic 10R5 (n_{mCD}), and the complexation time, PRs with a wide range of complexation degrees could be obtained (Table 2.2 and 2.3, and Fig. 2.11), as discussed below.

3.3. Effect of cyclodextrin functionalization, complexation time and molar ratio of CD-to-Pluronic on the complexation degree

The results of the complexation study by varying the nature of the β -CD, keeping the initial molar ratio of CD-to-Pluronic 10R5 constant ($n_{mCD} = 5$), are shown in Table 1. In contrast to complexation with natural β -CD for which the percentage of threading (defined according to equation 1) was 100 %, the threading percentages did not exceed 20 % and 40 %, respectively for the mono- and dicarboxylic acid-modified β -CD derivatives.

$$\% \text{threading} = \frac{n_{CD}}{n_{mCD}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

As the pH of the threading step was 5.5, the COOH groups of the carboxylic acid-modified β -CD derivatives were partially negatively charged. These results could be attributed to electrostatic repulsions between the carboxylic acid groups of the CD molecules. However, surprisingly, the threading percentage was found to be higher for the CD containing two carboxylic acid groups than its counterpart with one COOH group.

Table 2.2. Influence of the number of carboxylic acid moieties on the β -CD percentage of threading for the synthesis of polyrotaxanes 4

Entry	Type of threaded β -CD ^[a]	n_{mCD}	Time of reaction	n_{CD}	%threading	yield ^[c]
1	native	5	24h	5.1 ± 0.25	100%	[d]
2	β -CD-(COOH) ₁ ^[a]	5	24h	1.15 ± 0.05	20%	60%
3	β -CD-(COOH) ₂ ^[b]	5	24h	2.0 ± 0.1	40%	60%

[a] **1a**; [b] **1b**; [c] calculated based on the introduced amount of Pluronic 10R5; [d] pseudo-polyrotaxane, no yield available

Fig. 2.11 shows the variation of the % of threading as a function of the reaction time, keeping the molar ratio of CD-to-Pluronic 10R5 constant ($n_{mCD} = 5$). As can be seen from this figure, the threading mechanism was relatively slow. Moreover, the complexation kinetics was found to depend on the number of COOH groups introduced on the β -CD. The % of threading values determined at 24, 48 and 72 h indicated that the rate was higher for the β -CD-(COOH)₂ derivative. Indeed, for the latter CD molecule, the threading percentage reached a plateau after a complexation time of 48 h while the same threading percentage was reached after 72 h of reaction for the β -CD-(COOH)₁ derivative. It clearly underlines that the obtained number of threaded β -CD-(COOH)_x was an intertwined result of both reaction time and the number of carboxylic groups on the β -CD. It could also be noticed that the yield of the PR synthesis decreased by at least 10 % when the % of threading passed from ~ 40 to ~ 80 at 48 h for β -CD-(COOH)₁, and at 72 h for β -CD-(COOH)₂. As n_{mCD} is fixed at 5, these data suggest that there is a larger part of Pluronic 10R5 with no CD threaded when the % of threading is 80 (corresponding to $n_{CD} = 4$). This leads us to believe that a dethreading of CD molecules from the pseudo-polyrotaxane ends can occur, resulting in the formation of PRs with $n_{CD} = 4$ at the

expense of PRs with $n_{CD} = 2$ (% of threading = 40). Such a process may be favored by the fact that the pseudo-PRs remain soluble in water, and that the β -CD-(COOH)_x molecules remain localized on the external PPG blocks because of their higher affinity for PPG than PEG. Indeed, although complexation of β -CD molecules and PEG is possible, as reported in previous studies on PR formation from Pluronic (PEG-PPG-PEG) and β -CD molecules, the cyclic components were shown to be localized on the PPG block (Mondjinou et al., 2015; Uenuma et al., 2016). In addition, the localization of β -CD on the PPG blocks was confirmed herein by 2D NOESY experiments.

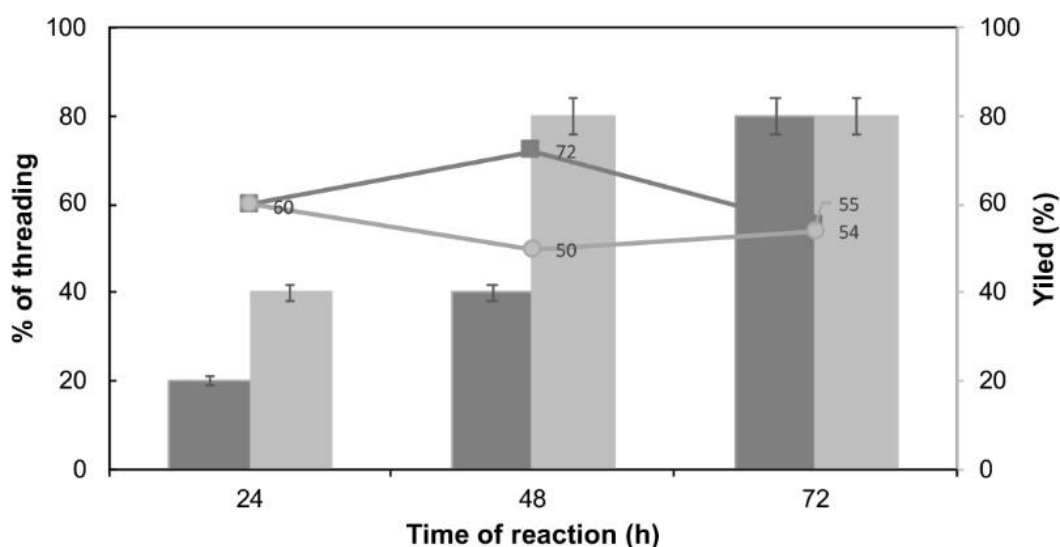


Fig. 2.11. Influence of the reaction time on the percentage of threading of β -CD-(COOH)₁ (■) and β -CD-(COOH)₂ (▒) for the synthesis of polyrotaxanes **4** keeping the molar ratio of CD-to-Pluronic 10R5 constant ($n_{mCD} = 5$). Based on the value of n_{mCD} , the number of threaded CD cavities (n_{CD}) varied from 1 to 4.

Increasing the value of n_{mCD} from 5 to 8 did not lead to an increase of the percentage of threading for β -CD-(COOH)₂ after 48 h of complexation, as the same number of threaded rings per Pluronic chain ($n_{CD} = 4$) was obtained (Table 2.3, entry 4 and 5). The same observations could be done with its β -CD-(COOH)₁ counterpart (Table 2.3, entry 1 and 2). However, the addition of excess β -CD-(COOH)₂ with respect to the theoretical maximum number of threaded CD molecules (i.e. 8, assuming a molar ratio of CD:PPG unit of 1:2) yielded a PR with nearly 8 threaded CD molecules at 48 h (Table 2.3, entry 6). This result thus demonstrated the possibility to thread several negatively charged CD molecules on the PPG

blocks despite electrostatic repulsion between the CD molecules. Although the synthesis of a PR from a β -cyclodextrin-(COOH)₂ derivative and poly(propylene glycol) ($M_n = 2$ kg/mol) had been previously described, the number of threaded CD had not been reported (Yu et al., 2015). Herein, whatever the value of n_{mCD} , the number of threaded rings, n_{CD} , and consequently, the % of threading, were systematically twice lower for the β -CD-(COOH)₁ than for the β -CD-(COOH)₂ derivative in the first 48 h. The highest values of % of threading in both cases was achieved for a starting n_{mCD} of 5.

Table 2.3 Influence of n_{mCD} on the β -CD percentage of threading for the synthesis of polyrotaxanes **4**

Entry	Type of threaded β -CD ^[a]	n_{mCD}	Time of reaction	n_{CD}	%threading	yield ^[c]
1	β -CD-(COOH) ₁ ^[a]	5	48h	2.1 ± 0.1	40%	72%
2	β -CD-(COOH) ₁ ^[a]	8	48h	1.9 ± 0.1	25%	47%
3	β -CD-(COOH) ₁ ^[a]	12	48h	4.1 ± 0.2	33%	66%
4	β -CD-(COOH) ₂ ^[b]	5	48h	4.0 ± 0.2	80%	50%
5	β -CD-(COOH) ₂ ^[b]	8	48h	3.9 ± 0.2	50%	45%
6	β -CD-(COOH) ₂ ^[b]	12	48h	7.4 ± 0.35	67%	73%

[a] **1a**; [b] **1b**; [c] calculated based on the introduced amount of Pluronic 10R5.

Moreover, it should be noted that the β -CD-(COOH)_x derivatives tended to thread on the Pluronic backbone with even numbers (2, 4, ~8), except for β -CD-(COOH)₁ when the complexation time was only 24 h (Fig. 2.11, % of threading of 20), which may be the result of an interrupted slow threading process. The statistical threading of CD derivatives on the PPG blocks on each side of the symmetrical Pluronic 10R5 (PPG₉-PEG₂₄-PPG₉) could be one explanation. On the other hand, it is known that hydrogen bonding interaction between adjacent cyclodextrins on the polymer chain plays an essential role in the inclusion behavior (Miyake et al., 2003; Wenz et al., 2006). This means that the hydrogen bond interaction plays an important role in the threading of another cyclodextrin. As a result, hydrogen bonds

formation between two CD rings are considered to determine the arrangement of adjacent CD molecules in a molecular necklace. Because of the peculiar structure of cyclodextrins, consisting of a cone-shaped cavity delimited by two rims, a wide one (named head, H) and a narrow one (named tail, T) composed, respectively, of secondary and primary hydroxyl groups, two CD units can adopt three possible orientations, i.e., the head-to-head (HH), tail-to-tail (TT), and head-to-tail (HT) structures. Among these orientations, the HH and TT ones were shown to be the most probable structures for necklaces of α -, β - and γ -CDs because hydrogen bond interactions are maximized in these orientations (Harada et al., 1994a, 1994a, 1995; Harada, Li, & Kamachi, 1993; Harada, Li, Suzuki, et al., 1993; Harada & Kamachi, 1990; Miyake et al., 2003). These data may provide some explanation for the tendency of β -CD-(COOH)_x to thread on Pluronic 10R5 with even numbers. Moreover, as the β -CD cavity is substituted by carboxylic groups on the primary rim, the HH hydrogen bonding seems to be easier to realize in the initial inclusion process. Therefore, it can be assumed that for PRs with $n_{CD} = 2$, a HH arrangement of the two CD molecules is the most probable. This hypothesis is supported by the FT-ICR analysis of a PR with $n_{CD} = 2$ showing the presence of a fragment of Pluronic cleaved after 4 units of PPG and associated with 2 β -CD-(COOH)₂ (see section 3.2). The same assumption can be made for PRs with $n_{CD} = 4$, taking into account that the threading of the two pairs of CD rings likely occurs on each side of the symmetrical Pluronic 10R5 to reduce interaction of the PPG blocks with water. Finally, for the PR with $n_{CD} = 7.4$, it can be inferred that the β -CD-(COOH)₂ rings are threaded in alternating HH and TT orientations. Interestingly, it should be noted that the presence of several negative charges on the guest polymer and substituents on the primary CD rim do not impede the full coverage of the PPG blocks. These results are consistent with previous work showing the ability to prepare PRs from Pluronic L81 (PEG₃-PPG₄₃-PEG₃) and mixtures of neutral and charged substituted β -CD molecules (Mondjinou et al., 2015).

Finally, this assumption leads us to believe that the dethreading/rethreading process resulting in the formation of PRs with $n_{CD} = 4$ at the expense of PRs with $n_{CD} = 2$ discussed above, may involve a pair of adjacent CDs threaded on one of the two PPG blocks of Pluronic. This process may be driven by several factors. The inclusion of a polymer chain into the cyclodextrin cavity is entropically unfavorable and is known to be promoted by the attractive interactions between the chain and the CD rings such as van der Waals and hydrophobic

interactions. Herein, the hydrophobic character of the PPG blocks may promote formation of PRs with $n_{CD} = 4$ at the expense of ones with $n_{CD} = 2$. Indeed, although self-assembly of Pluronic 10R5 into micelles requires heating above 45 °C (Naskar et al., 2012), the existence of loose interactions between the hydrophobic PPG blocks cannot be excluded. Therefore, the inclusion of one PPG block in a CDs pair may disrupt hydrophobic interactions between the PPG blocks and thereby, favor, in a second step, inclusion of the second PPG block in CD molecules to reduce interaction with water.

Finally, regarding the complexation abilities of β -CD-(COOH)₁ and β -CD-(COOH)₂ towards Pluronic 10R5, our results suggest that disubstitution of the primary rim of β -CD by -COOH groups is more favorable to PR formation. A larger increase in solubility of PPG blocks due the presence of two -COOH groups on the CD cavity may provide some explanation for this.

3.4. Morphology and size of polyrotaxanes

The morphology of the polyrotaxanes was observed in the dry-state by AFM. The PR with 2 β -CD-(COOH)₂ (Table 2.2, entry 3) was deposited onto reconstructed (100)-2x1 hydrogen terminated silicon surface (Loup et al., 2003) (Fig. 2.12.A) from a 1.1×10^{-5} M solution in ultrapure water (pH= 6.5). Small particles with spherical morphology and a size of a few nanometers (20.0 ± 5.7 nm) could be observed (Fig. 2.12.B). The size was much larger than the size (~ 4 nm) that could be estimated from the length of β -CD (0.8 nm) (Wenz et al., 2006) and the value of n_{CD} (~ 2 according to NMR analysis), and taking into account that β -CD molecules were used as stoppers. This could be due to the limit of AFM tip resolution, but also suggested potential aggregation of PR that may have occurred during solvent evaporation from the hydrophobic AFM substrate.

High resolution-transmission electron microscopy (HR-TEM) analysis of the same PR (Table 2.2, entry 3) deposited from a solution of 1.1×10^{-4} M in ultrapure water (pH = 6.5) also revealed spherical morphologies with an average diameter of 4 ± 0.5 nm (Fig. 2.12.C). The average size measured from TEM was thus relatively close to the expected size of the PR. Moreover, our results obtained by HR-TEM were in line with those reported previously by Yu et al. who observed spherical particles with an average diameter of ~ 3.5 nm by HR-TEM for their PR of close composition (Yu et al., 2015).

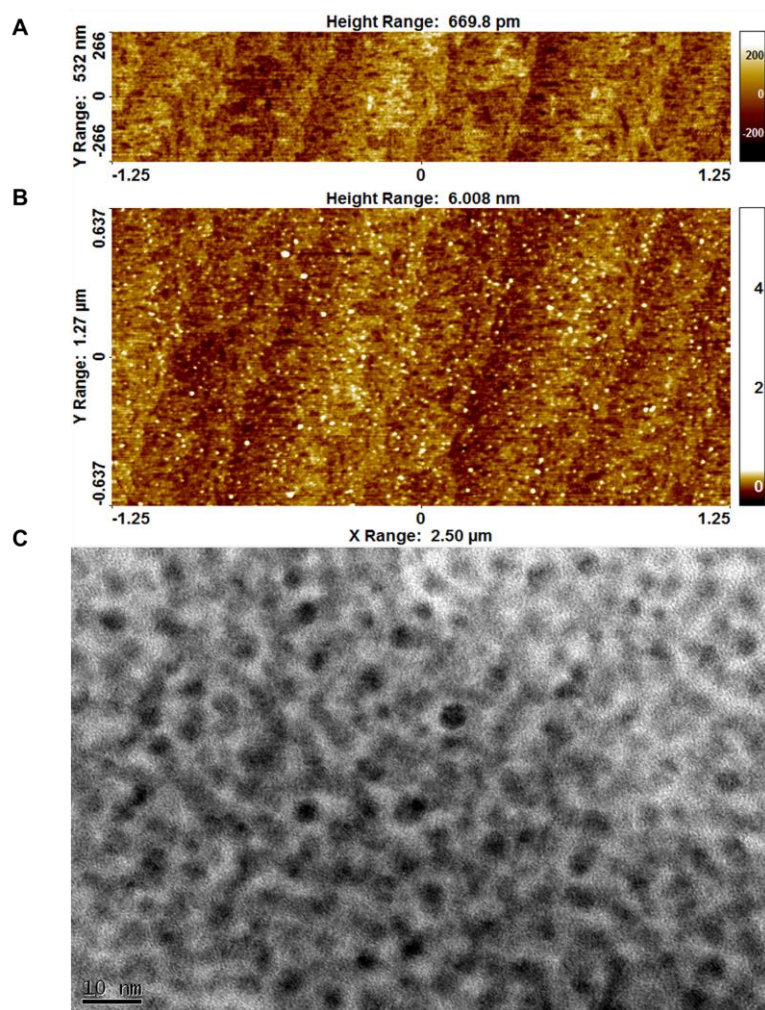


Fig. 2.12. (A) AFM image of re-constructed silicon surface. (B) AFM image of polyrotaxane with 2 threaded β -CD-(COOH)₂ (Table 2.2, entry 3) on re-constructed silicon surface. (C) Transmission Electron Microscopy image of polyrotaxane with 2 threaded β -CD-(COOH)₂ (Table 2.2, entry 3)

Diffusion ordered spectroscopy (DOSY) was also used to estimate molecular size by the measured diffusion coefficient in solution. In given conditions of solvent and temperature, each molecule has a unique diffusion coefficient value, derived from DOSY spectrum (Fig. S7). In our case, all signals were corrected to a diffusion coefficient value of circa $D = 2.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (in D_2O , 25°C) for the different kinds of obtained polyrotaxane (Table 2.4). The hydrodynamic diameter (D_h) can be calculated from the DOSY diffusion coefficient values D through the Stoke-Einstein equation (equation 1),

$$D_h = \frac{2k_B T}{6\pi D \mu} \quad \text{Eq. 1}$$

where k_b is Boltzman's constant, T the temperature (in K) and μ , the dynamic viscosity of the solvent at T . All three types of polyrotaxanes (with 2, 4 and 7.5 β -cyclodextrins-(COOH)₂) presented consistent sizes of ~ 2 nm (Fig. 2.11, Table 2.2), despite the different numbers of threaded β -cyclodextrins-(COOH)₂. This value is in the same range, though a bit smaller, than the value of ~ 4 nm determined by HR-TEM. It is also in the same range, but a bit smaller, than the D_h value of 3.5 nm obtained in DMSO by Yu and al. for their PR synthesized from a β -CD-(COOH)₂ derivative and a PPG with $M_n = 2$ kg/mol ($D = 3.16 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ obtained in DMSO at 25°C) (Yu et al., 2015).

Of note, linear poloxamer and poly(ethylene glycol) chains of the same molar mass ($M_n \sim 2$ kg/mol) exhibited slightly larger sizes (around 4 nm), supporting the idea of the potential collapsing of polyrotaxane structure in water (Table 3).

Table 2.4. Hydrodynamic diameters of polyrotaxanes **4** with 2, 4 and 7.5 β -cyclodextrins-(COOH)₂ (Table 2.2, entry 3, and Table 2.3, entry 4 and 6) and Pluronic 10R5 derivatives, obtained from their average diffusion coefficients through Stoke-Einstein equation

Entry	Type of threaded β -CD	n_{CD}	$D \times 10^{10}$ ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) ^[b]	D_h (nm) ^[c]
1	β -CD-(COOH) ₂ ^[a]	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.8	2.5 ± 1.0
2	β -CD-(COOH) ₂ ^[a]	4.0 ± 0.2	2.4 ± 1.4	2.0 ± 1.4
3	β -CD-(COOH) ₂ ^[a]	$7.4 \pm$ 0.35	2.0 ± 0.8	2.3 ± 1.2
4	HO-PPG ₉ -PEG ₂₄ -PPG ₉ -OH	0	1.06 ± 0.035	4.5 ± 0.16
5	H ₂ C=C(CH ₃)CO-PEG ₄₂ -CO(CH ₃)C=CH ₂	0	1.36 ± 0.15	3.5 ± 0.41

[a] **1a**; [a] **1b**; [b] calculated based on the ¹H 2D-NMR DOSY spectra; [c] calculated from D with Stoke-Einstein equation (Eq. 1)

4. Conclusion

In this work, we demonstrated for the first time the ability to synthesize water-soluble polyrotaxanes with a tight control of the number of threaded CD rings. Our strategy relied on an original one-pot synthesis of PR via thiol-ene chemistry performed in homogeneous aqueous conditions from carboxylic acid-modified β -CD derivatives, dithiol-terminated Pluronic reverse 10R5, and β -CD-pentenamide. In particular, it was shown that the presence and number of carboxylic acid functions on the CD cavity were key to controlling the density of threaded host molecules. Thus, by varying the nature of the modified β -CD, the molar feed ratio of β -CD-(COOH)_x-to-Pluronic, and the time of the complexation step, threading degrees from 1 to 8 CDs per Pluronic chain could be achieved. Our results have thus opened a new synthetic avenue to enlarge the limited number of water-soluble PR with a low density of threaded CD. These new PR represent attractive candidates as design elements for the construction of smart biomaterials with dynamic properties.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency in the framework of the “Investissement d’avenir” program Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) (C. Desfrançois PhD grant). We thank Dr. Cliene Labre at the LabNano/CBPF, Rio de Janeiro, Brazil, for technical support in TEM; Denis Mariolle for AFM experiments performed at CEA/LETI/PFNC, Grenoble, France; Charles Desfrançois and CLIO staff for mass experiments performed at CLIO center, Orsay, France; Isabelle Jeacomine at the NMR platform of ICMG (FR2607) for her technical support. CERMAV-CNRS and CEA-LETI are part of the Arcane Labex program supported by the French National Research Agency (ANR-12-LABX-003, CBH-EUR-GS, ANR-17-EURE-0003).

References

- Auzély-Velty, R., Djedaïni-Pilard, F., Désert, S., Perly, B., & Zemb, Th. (2000). Micellization of Hydrophobically Modified Cyclodextrins. 1. Micellar Structure. *Langmuir*, *16*(8), 3727–3734. <https://doi.org/10.1021/la991361z>
- Bin Imran, A., Esaki, K., Gotoh, H., Seki, T., Ito, K., Sakai, Y., & Takeoka, Y. (2014). Extremely stretchable thermosensitive hydrogels by introducing slide-ring polyrotaxane cross-linkers and ionic groups into the polymer network. *Nature Communications*, *5*, 5124. <https://doi.org/10.1038/ncomms6124>
- Brewster, M. E., & Loftsson, T. (2007). Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *59*(7), 645–666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>
- Charlot, A., Heyraud, A., Guenot, P., Rinaudo, M., & Auzély-Velty, R. (2006). Controlled Synthesis and Inclusion Ability of a Hyaluronic Acid Derivative Bearing β -Cyclodextrin Molecules. *Biomacromolecules*, *7*(3), 907–913. <https://doi.org/10.1021/bm0507094>
- Fleury, G., Brochon, C., Schlatter, G., Bonnet, G., Lapp, A., & Hadziioannou, G. (2005). Synthesis and characterization of high molecular weight polyrotaxanes: towards the control over a wide range of threaded α -cyclodextrins. *Soft Matter*, *1*(5), 378. <https://doi.org/10.1039/b510331b>
- Harada, A. (2001). Cyclodextrin-Based Molecular Machines. *Accounts of Chemical Research*, *34*(6), 456–464. <https://doi.org/10.1021/ar000174l>
- Harada, A., Hashidzume, A., Yamaguchi, H., & Takashima, Y. (2009). Polymeric Rotaxanes. *Chemical Reviews*, *109*(11), 5974–6023. <https://doi.org/10.1021/cr9000622>
- Harada, A., & Kamachi, M. (1990). *Complex formation between poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin*. 3.
- Harada, A., Li, J., & Kamachi, M. (1992). *The molecular necklace: a rotaxane containing many threaded α -cyclodextrins*. 356, 3.
- Harada, A., Li, J., & Kamachi, M. (1993). Preparation and properties of inclusion complexes of polyethylene glycol with α -cyclodextrin. *Macromolecules*, *26*(21), 5698–5703. <https://doi.org/10.1021/ma00073a026>
- Harada, A., Li, J., & Kamachi, M. (1994a). Preparation and Characterization of a Polyrotaxane Consisting of Monodisperse Poly(ethylene glycol) and α -Cyclodextrins. *Journal of the American Chemical Society*, *116*(8), 3192–3196. <https://doi.org/10.1021/ja00087a004>
- Harada, A., Li, J., & Kamachi, M. (1994b). Double-stranded inclusion complexes of cyclodextrin threaded on poly(ethylene glycol). *Nature*, *370*(6485), 126–128. <https://doi.org/10.1038/370126a0>
- Harada, A., Li, J., Suzuki, S., & Kamachi, M. (1993). Complex formation between polyisobutylene and cyclodextrins: inversion of chain-length selectivity between β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin. *Macromolecules*, *26*(19), 5267–5268. <https://doi.org/10.1021/ma00071a047>

- Harada, A., Okada, M., Li, J., & Kamachi, M. (1995). Preparation and Characterization of Inclusion Complexes of Poly(propylene glycol) with Cyclodextrins. *Macromolecules*, *28*(24), 8406–8411. <https://doi.org/10.1021/ma00128a060>
- Kato, K., Okabe, Y., Okazumi, Y., & Ito, K. (2015). A significant impact of host–guest stoichiometry on the extensibility of polyrotaxane gels. *Chemical Communications*, *51*(90), 16180–16183. <https://doi.org/10.1039/C5CC07122D>
- Kobayashi, Y., Nakamitsu, Y., Zheng, Y., Takashima, Y., Yamaguchi, H., & Harada, A. (2018). Control of the threading ratio of cyclic molecules in polyrotaxanes consisting of poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrins. *Chemical Communications*, *54*(51), 7066–7069. <https://doi.org/10.1039/C8CC01776J>
- Li, J., & Loh, X. J. (2008). Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(9), 1000–1017. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.02.011>
- Loethen, S., Kim, J.-M., & Thompson, D. H. (2007). Biomedical Applications of Cyclodextrin Based Polyrotaxanes. *Polymer Reviews*, *47*(3), 383–418. <https://doi.org/10.1080/15583720701455145>
- Loup, V., Hartmann, J. M., Rolland, G., Holliger, P., Laugier, F., Lafond, D., S m r i a, M. N., Besson, P., & Gentile, P. (2003). Reduced pressure chemical vapour deposition of $\text{Si/Si}_{1-x}\text{Ge}_x\text{C}_y$ heterostructures using a chlorinated chemistry. *Semiconductor Science and Technology*, *18*(4), 352–360. <https://doi.org/10.1088/0268-1242/18/4/328>
- Miyake, K., Yasuda, S., Harada, A., Sumaoka, J., Komiyama, M., & Shigekawa, H. (2003). Formation Process of Cyclodextrin Necklace–Analysis of Hydrogen Bonding on a Molecular Level. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(17), 5080–5085. <https://doi.org/10.1021/ja026224u>
- Mondjinou, Y. A., Hyun, S.-H., Xiong, M., Thong, P. L., & Thompson, D. H. (2015). Impact of Mixed β -Cyclodextrin Ratios on Pluronic® Rotaxanation Efficiency and Product Solubility. *ACS Applied Materials & Interfaces*, *7*(43), 23831–23836. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b01016>
- Naskar, B., Ghosh, S., & Moulik, S. P. (2012). Solution Behavior of Normal and Reverse Triblock Copolymers (Pluronic L44 and 10R5) Individually and in Binary Mixture. *Langmuir*, *28*(18), 7134–7146. <https://doi.org/10.1021/la3000729>
- Okada, M., Kamachi, M., & Harada, A. (1999). Preparation and Characterization of Inclusion Complexes of Poly(propylene glycol) with Methylated Cyclodextrins. *The Journal of Physical Chemistry B*, *103*(14), 2607–2613. <https://doi.org/10.1021/jp9823852>
- Ooya, T., Akutsu, M., Kumashiro, Y., & Yui, N. (2005). Temperature-controlled erosion of poly(*N*-isopropylacrylamide)-based hydrogels crosslinked by methacrylate-introduced hydrolyzable polyrotaxane. *Science and Technology of Advanced Materials*, *6*(5), 447–451. <https://doi.org/10.1016/j.stam.2005.03.015>
- Ooya, T., Kawashima, T., & Yui, N. (2001). Synthesis of polyrotaxane-biotin conjugates and surface plasmon resonance analysis of streptavidin recognition. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, *6*(4), 293–300. <https://doi.org/10.1007/BF02931993>

- Ooya, T., Utsunomiya, H., Eguchi, M., & Yui, N. (2005). Rapid Binding of Concanavalin A and Maltose–Polyrotaxane Conjugates Due to Mobile Motion of α -Cyclodextrins Threaded onto a Poly(ethylene glycol). *Bioconjugate Chemistry*, *16*(1), 62–69.
<https://doi.org/10.1021/bc049809h>
- Rekharsky, M. V., & Inoue, Y. (1998). Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*, *98*(5), 1875–1918. <https://doi.org/10.1021/cr970015o>
- Uenuma, S., Maeda, R., Takahashi, S., Kato, K., Yokoyama, H., & Ito, K. (2016). Self-assembled Structure of Polyrotaxane Consisting of β -Cyclodextrin and Poly(ethylene oxide)- *block* - poly(propylene oxide)- *block* -poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Bulk System. *Chemistry Letters*, *45*(8), 991–993. <https://doi.org/10.1246/cl.160490>
- Wei, H., Yu, H., Zhang, A., Sun, L., Hou, D., & Feng, Z. (2005). Synthesis and Characterization of Thermosensitive and Supramolecular Structured Hydrogels. *Macromolecules*, *38*(21), 8833–8839. <https://doi.org/10.1021/ma050887p>
- Wenz, G., Han, B.-H., & Müller, A. (2006). Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes. *Chemical Reviews*, *106*(3), 782–817. <https://doi.org/10.1021/cr970027+>
- Yu, S., Yuan, J., Shi, J., Ruan, X., Wang, Y., Gao, S., & Du, Y. (2015). One-pot synthesis of water-soluble, β -cyclodextrin-based polyrotaxanes in a homogeneous water system and its use in bio-applications. *Journal of Materials Chemistry B*, *3*(26), 5277–5283. <https://doi.org/10.1039/C5TB00627A>
- Yui, N., Katoono, R., & Yamashita, A. (2009). Functional Cyclodextrin Polyrotaxanes for Drug Delivery. In G. Wenz (Ed.), *Inclusion Polymers* (pp. 115–173). Springer.
https://doi.org/10.1007/12_2008_8
- Yui, N., Ooya, T., Kawashima, T., Saito, Y., Tamai, I., Sai, Y., & Tsuji, A. (2002). Inhibitory Effect of Supramolecular Polyrotaxane–Dipeptide Conjugates on Digested Peptide Uptake via Intestinal Human Peptide Transporter. *Bioconjugate Chemistry*, *13*(3), 582–587.
<https://doi.org/10.1021/bc015567z>

Supporting Information

Functionalizing β -cyclodextrins: a simple strategy to control their threading during polyrotaxane formation

Claire Desfrançois^{[a],[b]}, Isabelle Texier^[a], Rachel Auzely*^[b]

[a] Univ. Grenoble Alpes,
CEA-Leti,
F-38000 Grenoble
France

[b] Univ. Grenoble Alpes,
CERMAV-CNRS,
F-38000 Grenoble
France
E-mail: rachel.auzely@cermav.cnrs.fr

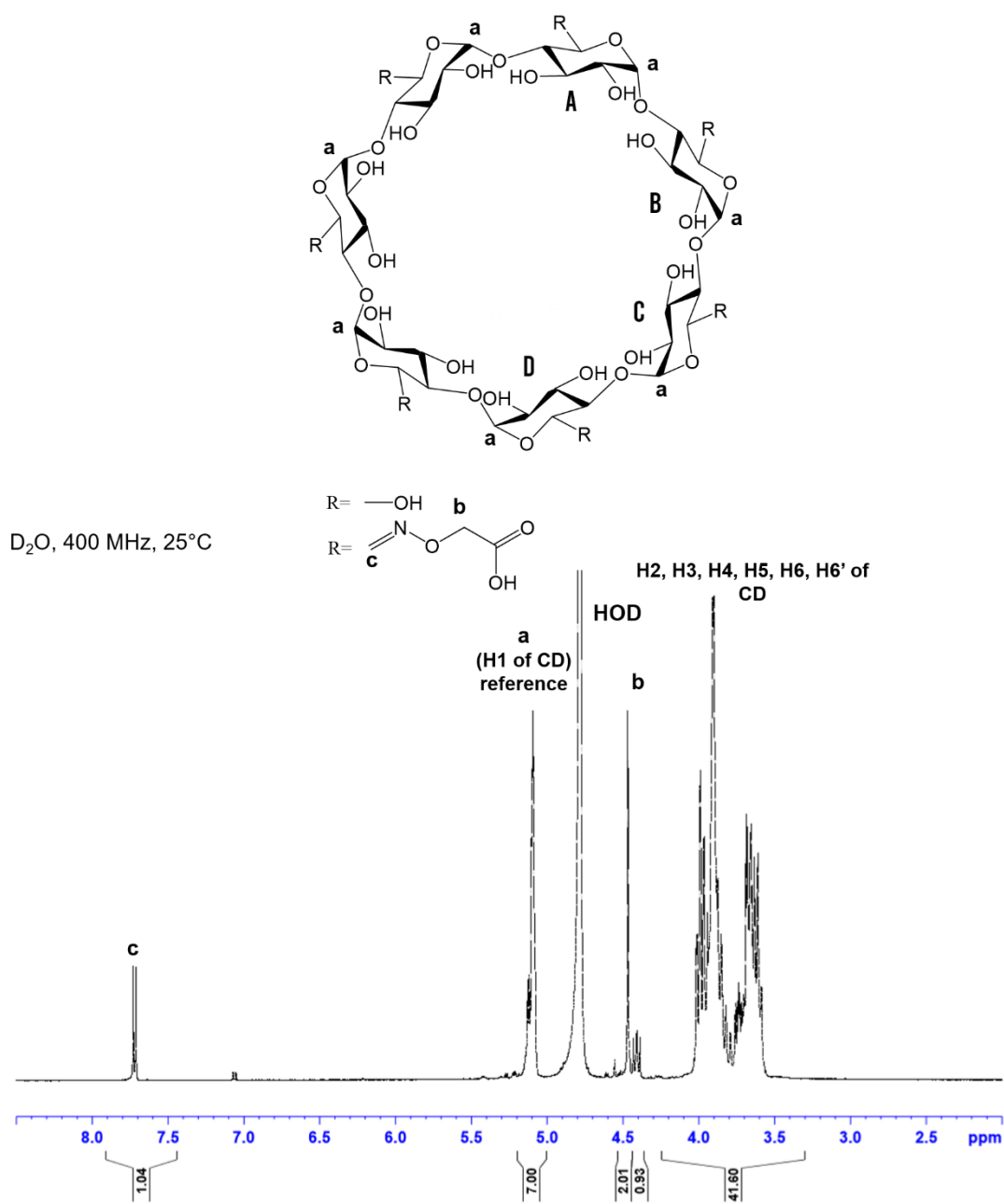


Fig. S1. ^1H NMR spectrum (400 MHz, 25 °C, D_2O) of β -cyclodextrin-COOH **1a**.

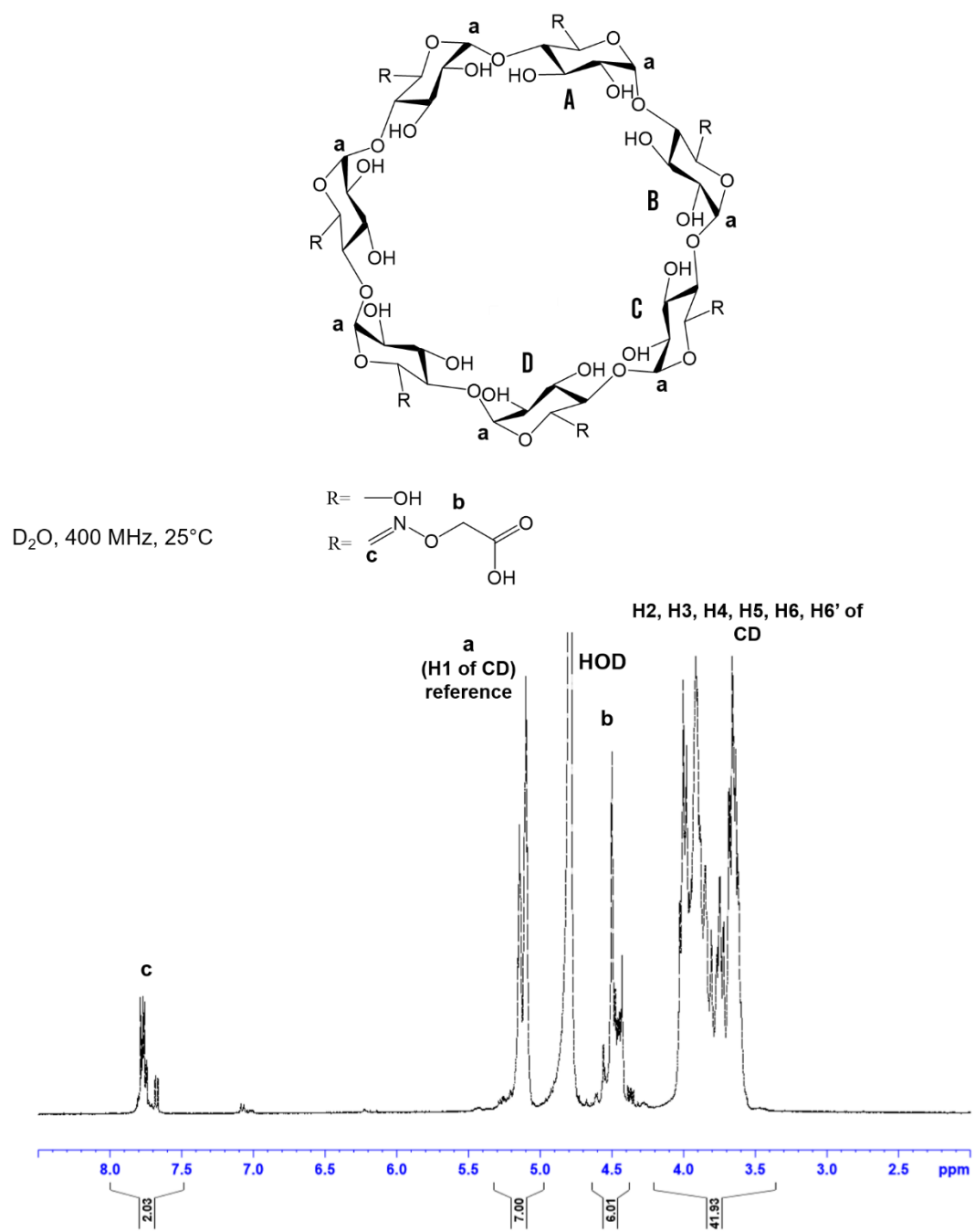


Fig. S2. ^1H NMR spectrum (400 MHz, 25 °C, D_2O) of β -cyclodextrin-(COOH) $_2$ **1b**.

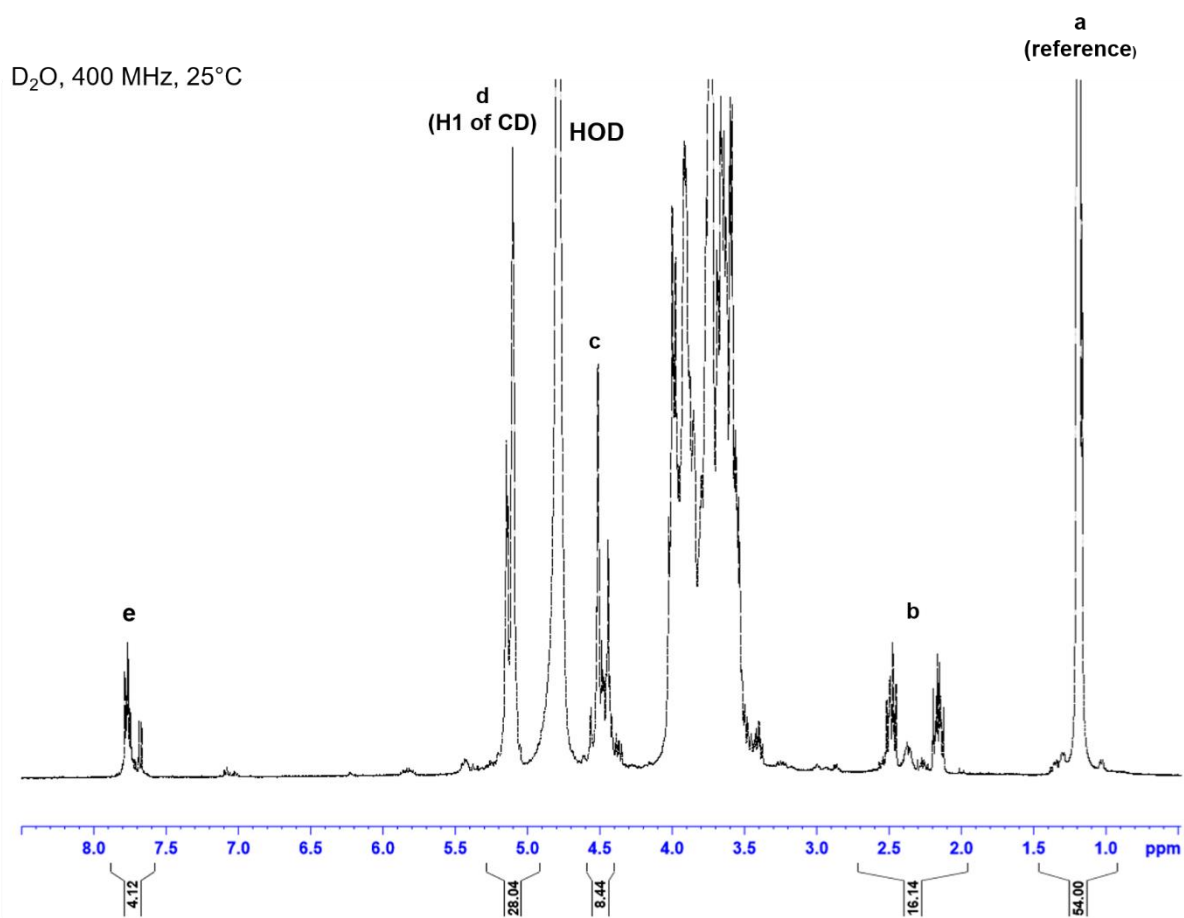
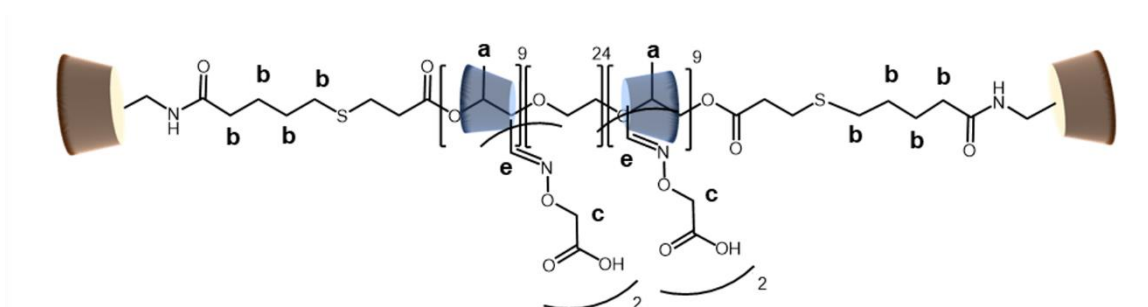
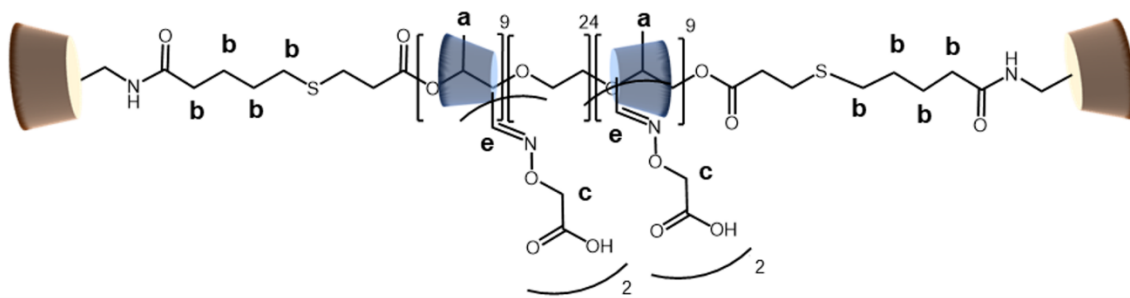


Fig. S3. ¹H NMR spectrum (400 MHz, 25 °C, D₂O) of polyrotaxane with 2 β-cyclodextrin-(COOH)₂.



D₂O, 400 MHz, 25°C

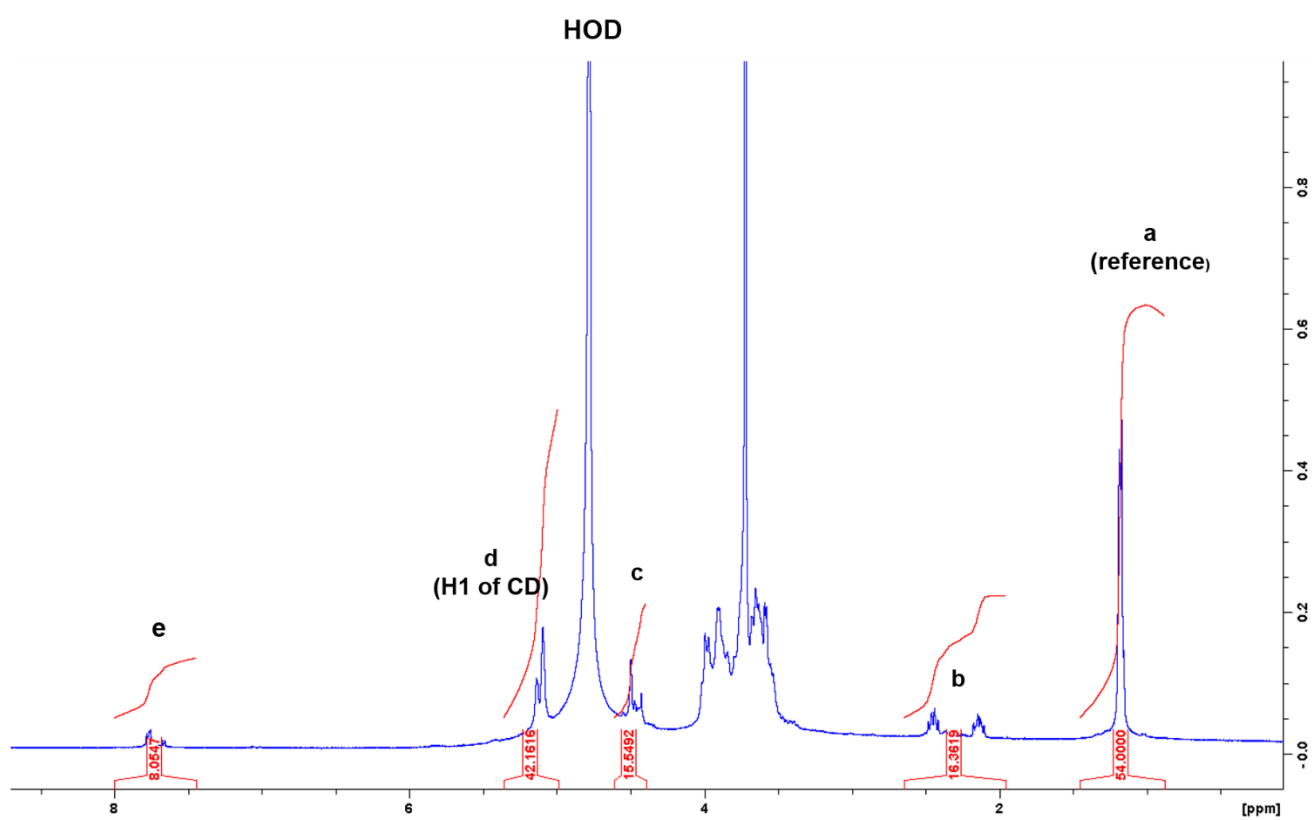
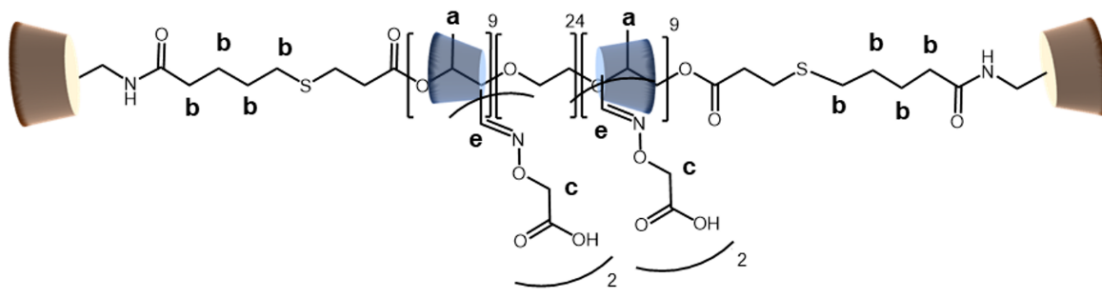


Fig. S4. ¹H NMR spectrum (400 MHz, 25 °C, D₂O) of polyrotaxane with 4 β-cyclodextrin-(COOH)₂.



D₂O, 400 MHz, 25°C

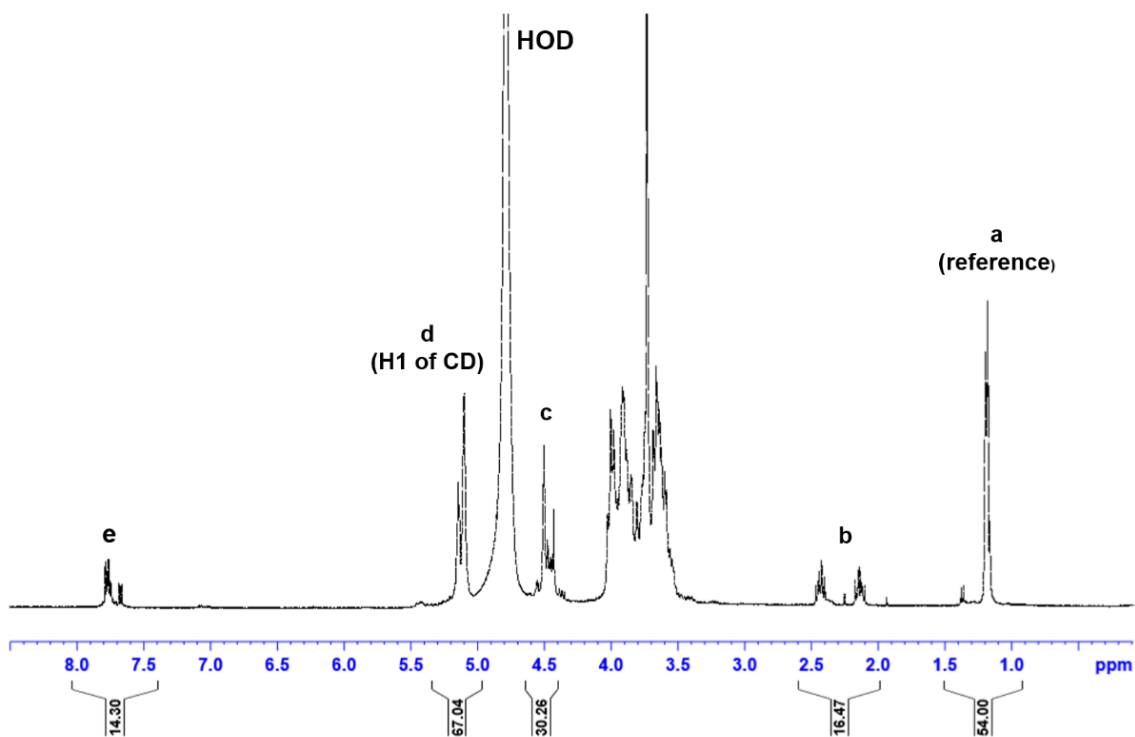


Fig. S5. ¹H NMR spectrum (400 MHz, 25 °C, D₂O) of polyrotaxane with 7.5 β-cyclodextrin-(COOH)₂.

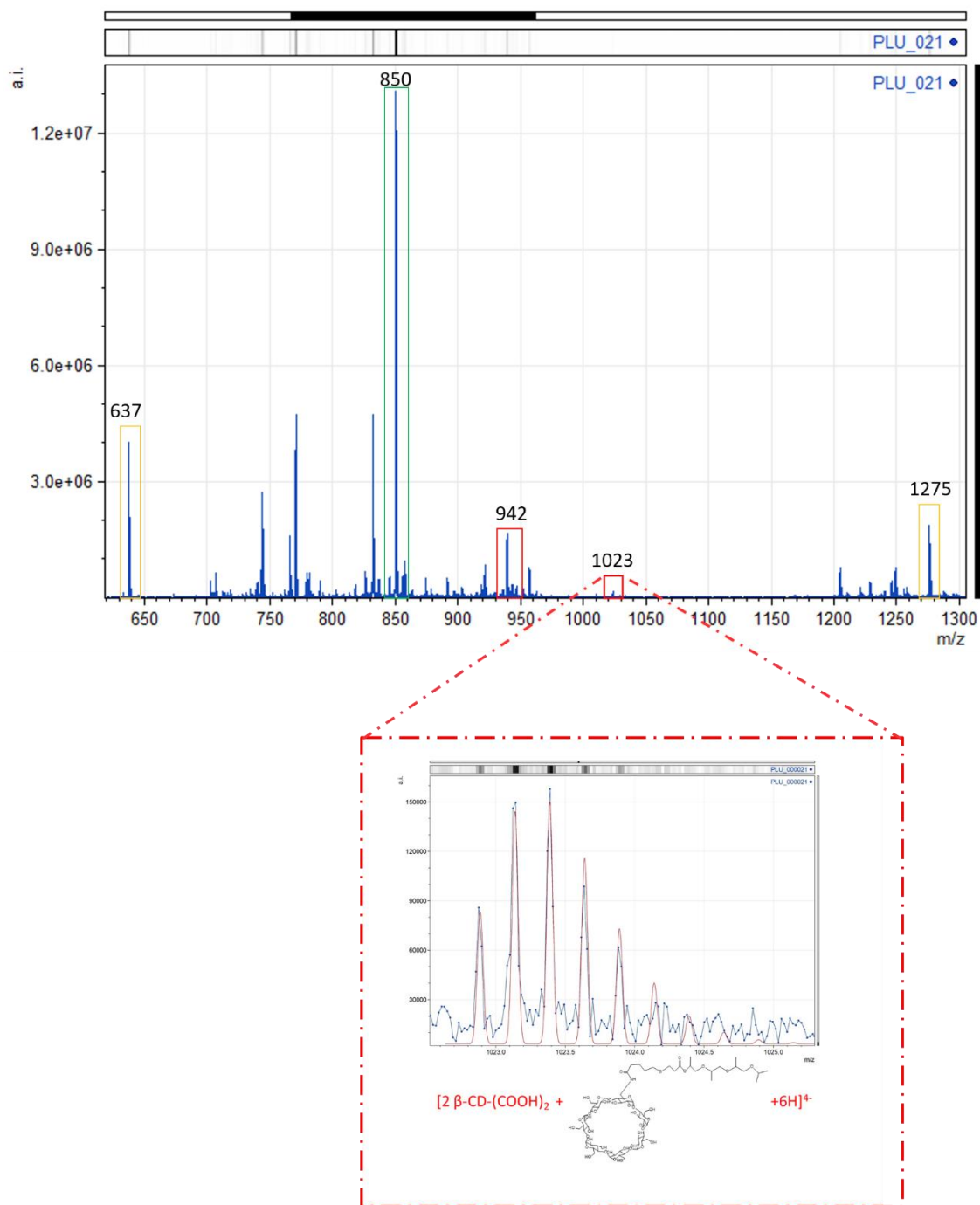


Fig. S6. FT-ICR mass spectrum of polyrotaxane in solution with 2 threaded β -cyclodextrin-(COOH)₂

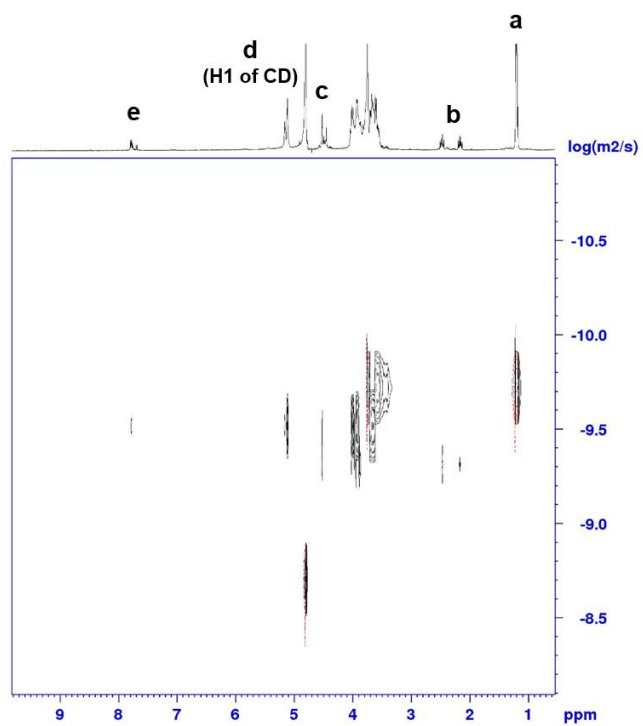


Fig. S7. 2D DOSY spectrum (400 MHz, 25 °C, D₂O) of a polyrotaxane with 2 β-cyclodextrin-(COOH)₂.

2.2.3. Résultats complémentaires

2.2.3.1. Influence de la position du groupement acide carboxylique sur l'efficacité d'enfilement

Ayant à notre disposition deux types de β -cyclodextrines avec des substituants acides carboxyliques (Figure 2.13), dont les méthodes de synthèse sont décrites plus tôt dans ce chapitre (partie 2.2.1), nous avons pu évaluer le comportement des β -CD-(COOH)_x dans leur complexation avec le poloxamère suivant la position de leurs substituants.

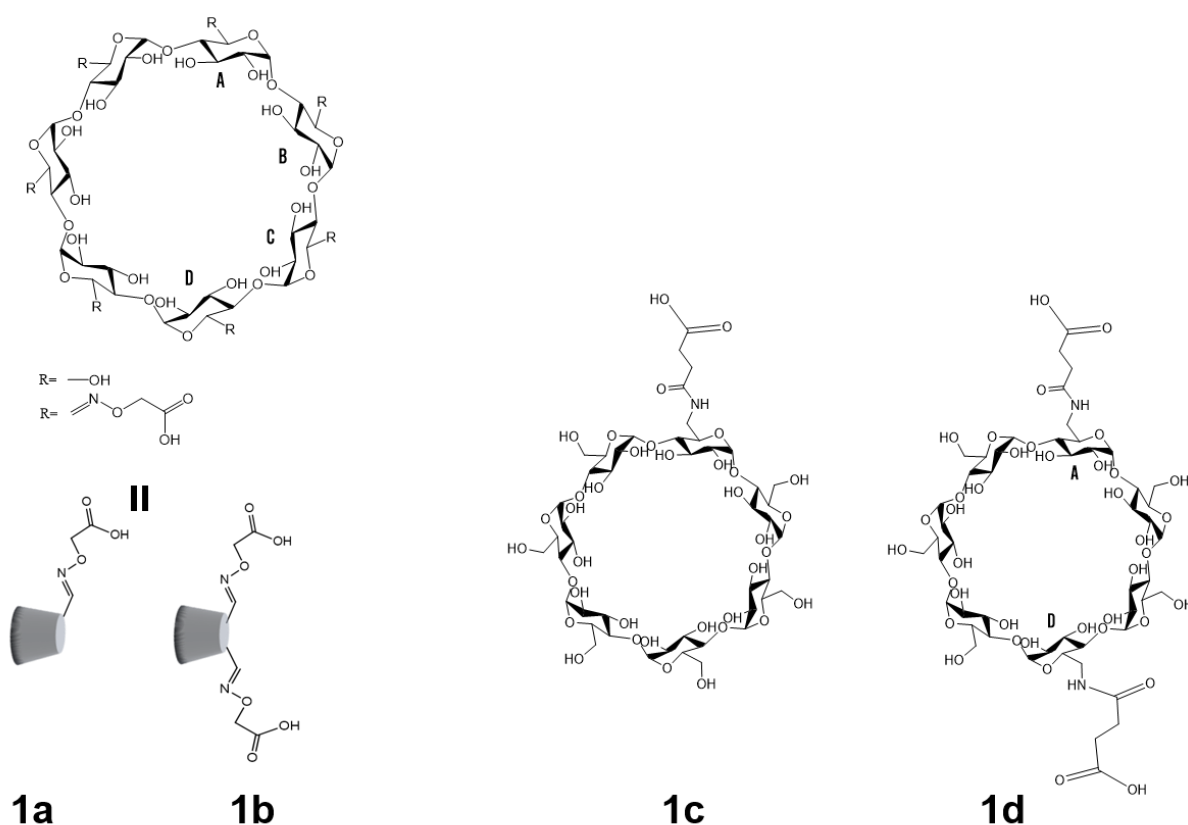


Figure 2.13 : Rappel des structures chimiques des différentes β -CD-(COOH)_x

Sans surprise, dans le cas des mono-acide carboxylique- β -CD ($x=1$), les produits **1b** et **1c** s'enfilent exactement de la même manière. Leur seule différence étant la fonction chimique utilisée pour greffer le groupe carboxylique (oxime et amide, respectivement), leur comportement de complexation avec le poloxamère **3** n'est pas modifié.

Dans les cas des β -CD-(COOH)₂, et dans des conditions similaires décrites dans le Tableau 2.5 ci-dessous, l'efficacité de complexation des produits **1b** et **1d** présente la même évolution.

Tableau 2.5. Influence de la position des substituants acides carboxyliques sur l'efficacité d'encapsulation

Entrée	Type de β -CD enfilée	n_{mCD}	Temps de réaction	n_{CD}	Efficacité d'encapsulation (%)	rendement [c]
4f	β -CD-(COOH) ₂ [a]	5	24h	2.0 ± 0.1	40%	60%
4o	β -CD-(COOH) ₂ [b]	5	24h	2.0 ± 0.1	40%	52%
4g	β -CD-(COOH) ₂ [a]	5	48h	4.0 ± 0.2	80%	50%
4p	β -CD-(COOH) ₂ [b]	5	48h	4.1 ± 0.2	80%	49%
4h	β -CD-(COOH) ₂ [a]	5	72h	4.1 ± 0.2	80%	54%
4q	β -CD-(COOH) ₂ [b]	5	72h	4.0 ± 0.2	80%	47%
4m	β -CD-(COOH) ₂ [a]	8	48h	3.9 ± 0.2	50%	45%
4r	β -CD-(COOH) ₂ [b]	8	48h	4.0 ± 0.2	50%	44%

[a] **1b**; [b] **1d**; [c] calculé à partir de la quantité de Poloxamère 10R5 mise en réaction;

Le mélange d'isomères de position **1a** des β -CD-(COOH)₂ AB, AC et AD a donc les mêmes interactions avec le poloxamère lors de la formation du polyrotaxane que les β -CD-(COOH)₂ AD du produit **1d**. La position des substituants semble ainsi ne pas avoir d'influence sur l'efficacité de complexation finale.

2.2.3.2. Spectrométrie de masse : ESI-FT-ICR

La structure supramoléculaire des polyrotaxanes a également été étudiée par spectrométrie de masse à résonance cyclonique ionique (Fourier-transform ion cyclotron resonance, ou FT-ICR). Plusieurs analyses des polyrotaxanes ionisés par électronébuliseur en mode négatif ont été effectuées. La structure intacte et entière des polyrotaxanes n'a pas pu être détectée dans notre gamme de $\frac{m}{z}$. Cependant, plusieurs fragments intéressants de PR ont été trouvés, ils

sont détaillés dans la Figure 2.14. Un ion en particulier, à $\frac{m}{z} = 1023$, a été attribué à deux β -CD-(COOH)₂ chargées négativement associées à un segment de poloxamère sectionné après 4 unités de poly(propylène glycol). On retrouverait ainsi le rapport théorique de 1 β -CD enfilée pour deux unités de poly(propylène glycol) disponibles [22].

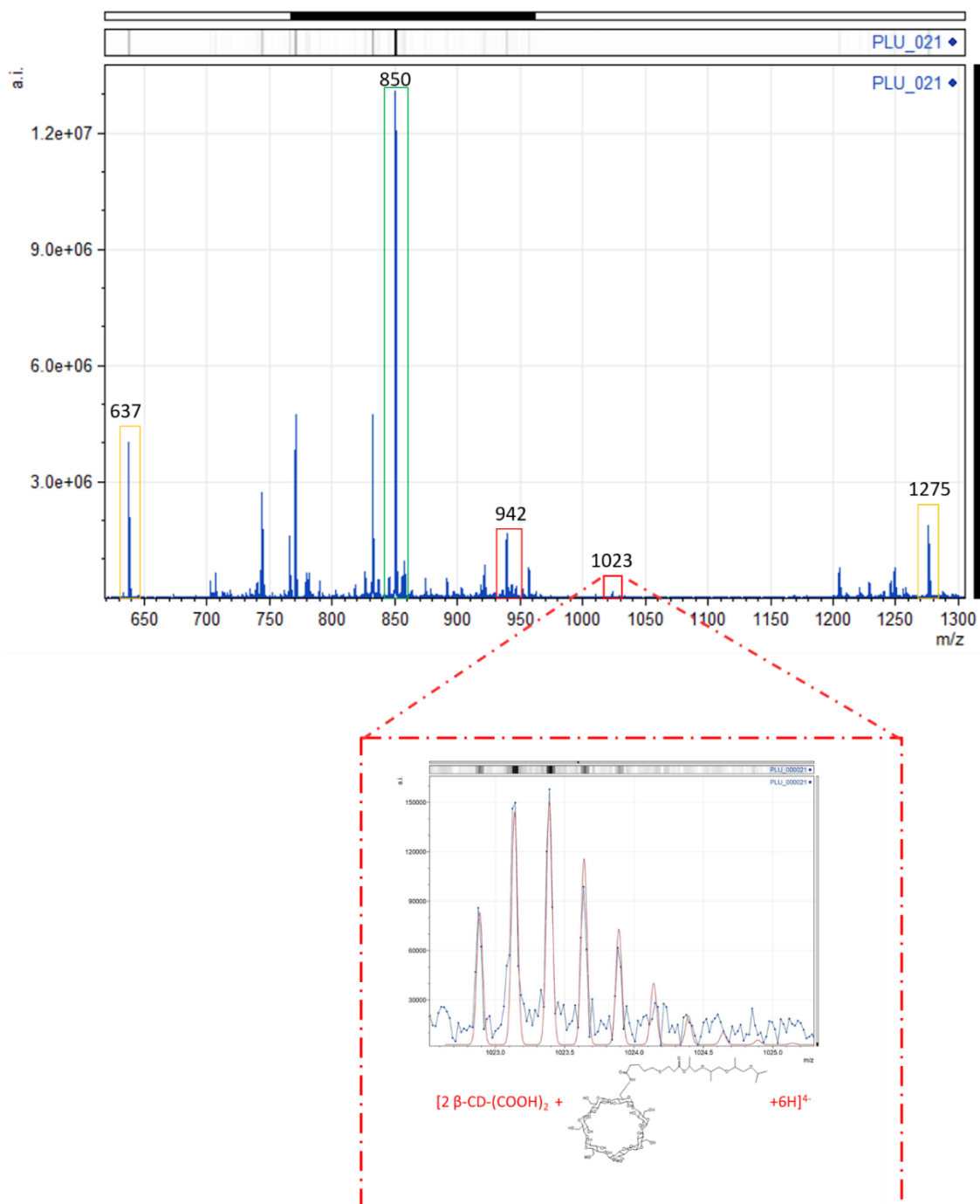


Figure 2.14: Spectre de masse (FT-ICR) d'un polyrotaxane avec 2 β -CD-(COOH)₂ en solution. (Entrée 4f, Tableau 2.3).

2.3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons développé une synthèse originale, simple et efficace pour l'obtention de polyrotaxanes solubles dans l'eau et au degré de complexation systématiquement contrôlé. L'utilisation de β -cyclodextrines mono- et di-acide carboxylique, de β -cyclodextrine-pentènamine et d'un Pluronic 10R5 modifié a permis la synthèse de polyrotaxanes avec 2, 4 ou 8 β -cyclodextrines enfilées avec des rendements entre 45% et 73%. La fonctionnalisation de β -cyclodextrines, antérieure à la formation des polyrotaxanes, a ainsi permis le contrôle du nombre de β -CD enfilées, tout comme le temps de réaction et le nombre d'équivalents molaires de β -CD mis en réaction.

Comme il a été développé dans le premier chapitre, ces polyrotaxanes à faible densité de complexation sont des candidats extrêmement intéressants comme agents de réticulation au sein d'un réseau polymérique secondaire. La faible densité de β -CD sur la chaîne polymérique linéaire du PR assure leur forte mobilité et donc devrait améliorer les propriétés mécaniques du matériau en termes de capacité d'extension et résistance. Les PR synthétisés ont donc été introduits par photo-réticulation dans un réseau de PEG-méthacrylates. Les propriétés mécaniques des hydrogels formés ont été évaluées. Cette étude fera l'objet du chapitre 3.

Références

- [1] T. Ooya, H. Utsunomiya, M. Eguchi, N. Yui, *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 62–69.
- [2] T. Ooya, T. Kawashima, N. Yui, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 293–300.
- [3] N. Yui, T. Ooya, T. Kawashima, Y. Saito, I. Tamai, Y. Sai, A. Tsuji, *Bioconjugate Chem.* **2002**, *13*, 582–587.
- [4] H. Wei, H. Yu, A. Zhang, L. Sun, D. Hou, Z. Feng, *Macromolecules* **2005**, *38*, 8833–8839.
- [5] A. Bin Imran, K. Esaki, H. Gotoh, T. Seki, K. Ito, Y. Sakai, Y. Takeoka, *Nature Communications* **2014**, *5*, 5124.
- [6] G. Fleury, C. Brochon, G. Schlatter, G. Bonnet, A. Lapp, G. Hadziioannou, *Soft Matter* **2005**, *1*, 378.
- [7] K. Kato, Y. Okabe, Y. Okazumi, K. Ito, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16180–16183.
- [8] Y. Kobayashi, Y. Nakamitsu, Y. Zheng, Y. Takashima, H. Yamaguchi, A. Harada, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 7066–7069.
- [9] A. Charlot, A. Heyraud, P. Guenot, M. Rinaudo, R. Auzély-Velty, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 907–913.
- [10] R. Auzély-Velty, F. Djedaïni-Pilard, S. Désert, B. Perly, Th. Zemb, *Langmuir* **2000**, *16*, 3727–3734.
- [11] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, **1992**, *356*, 3.
- [12] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Macromolecules* **1993**, *26*, 5698–5703.
- [13] A. Harada, J. Li, M. Kamachi, *Nature* **1994**, *370*, 126–128.
- [14] A. Harada, M. Okada, J. Li, M. Kamachi, *Macromolecules* **1995**, *28*, 8406–8411.
- [15] A. Harada, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 456–464.
- [16] S. Loethen, J.-M. Kim, D. H. Thompson, *Polymer Revs.* **2007**, *47*, 383–418.
- [17] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- [18] M. E. Brewster, T. Loftsson, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59*, 645–666.
- [19] T. Ooya, M. Akutsu, Y. Kumashiro, N. Yui, *Science and Technology of Advanced Materials* **2005**, *6*, 447–451.
- [20] N. Yui, R. Katoono, A. Yamashita, in *Inclusion Polymers* (Ed.: G. Wenz), Springer, Berlin, Heidelberg, **2009**, pp. 115–173.
- [21] J. Li, X. J. Loh, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1000–1017.
- [22] A. Harada, A. Hashidzume, H. Yamaguchi, Y. Takashima, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5974–6023.
- [23] M. Okada, M. Kamachi, A. Harada, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2607–2613.
- [24] S. Yu, J. Yuan, J. Shi, X. Ruan, Y. Wang, S. Gao, Y. Du, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 5277–5283.
- [25] G. Wenz, B.-H. Han, A. Müller, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 782–817.
- [26] E. Mixcoha, J. Campos-Terán, Á. Piñeiro, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 6999–7011.
- [27] V. Loup, J. M. Hartmann, G. Rolland, P. Holliger, F. Laugier, D. Lafond, M. N. S m ria, P. Besson, P. Gentile, *Semicond. Sci. Technol.* **2003**, *18*, 352–360.

Chapitre 3 : Synthèse d'hydrogels hybrides incluant des polyrotaxanes-méthacrylates et caractérisation de leur comportement sous contrainte mécanique

Chapitre 3 : Synthèse d'hydrogels hybrides incluant des polyrotaxanes-méthacrylates et caractérisation de leur comportement sous contrainte mécanique	114
3.1. Contexte.....	116
3.1.1. Objectifs.....	116
3.1.2. Approche.....	117
3.2. Résultats.....	120
3.2.1. Synthèse d'un polyrotaxane avec des stoppeurs à base de cyclodextrines méthylées.....	121
3.2.2. Synthèse d'un polyrotaxane-méthacrylate ((PR-(MA) _{2.4} , 4'')	121
3.2.3. Formation des hydrogels.....	122
3.2.4. Caractérisations mécaniques par tests de compression uni-axiaux	128
3.3. Conclusion.....	137
3.4. Références	137

3.1. Contexte

3.1.1. Objectifs

Si l'on reprend les propriétés qu'un patch transdermique pensé pour un traitement anti-inflammatoire local idéal doit réunir (développées dans la partie 1.1), la matrice hydrogel doit être : biocompatible sur une longue période, résistante, étirable et facile à manipuler et à appliquer. Dans le chapitre 1, les avantages des polyrotaxanes en tant qu'agent de réticulation dans un réseau polymérique avaient été mis en avant, notamment grâce à leur apparente simplicité - dans la littérature scientifique, tout du moins - à être inclus dans de nombreux systèmes polymériques différents et aux propriétés mécaniques exceptionnelles qu'ils apportent. Le chapitre 2 a développé la synthèse originale de polyrotaxanes solubles dans l'eau (utilisables donc dans la synthèse d'hydrogels biocompatibles) et au nombre de cyclodextrines enfilées contrôlé.

Dans le chapitre qui suit, cette voie de synthèse va être exploitée pour inclure des polyrotaxanes-méthacrylates (abrégés PR-(MA)_{2.4}) dans un hydrogel de poly(éthylène glycol)-bisméthacrylate (abrégé PEG-(MA)₂). Les PR-(MA)_{2.4} agissant comme points mobiles (ou « nœuds glissants ») de réticulation pour une partie du réseau, l'hydrogel produit peut alors être défini comme hybride : il contiendra des jonctions fixes PEG-(MA)₂//PEG-(MA)₂ et des jonctions mobiles PR-(MA)_{2.4}// PEG-(MA)₂ (Figure 3.1).

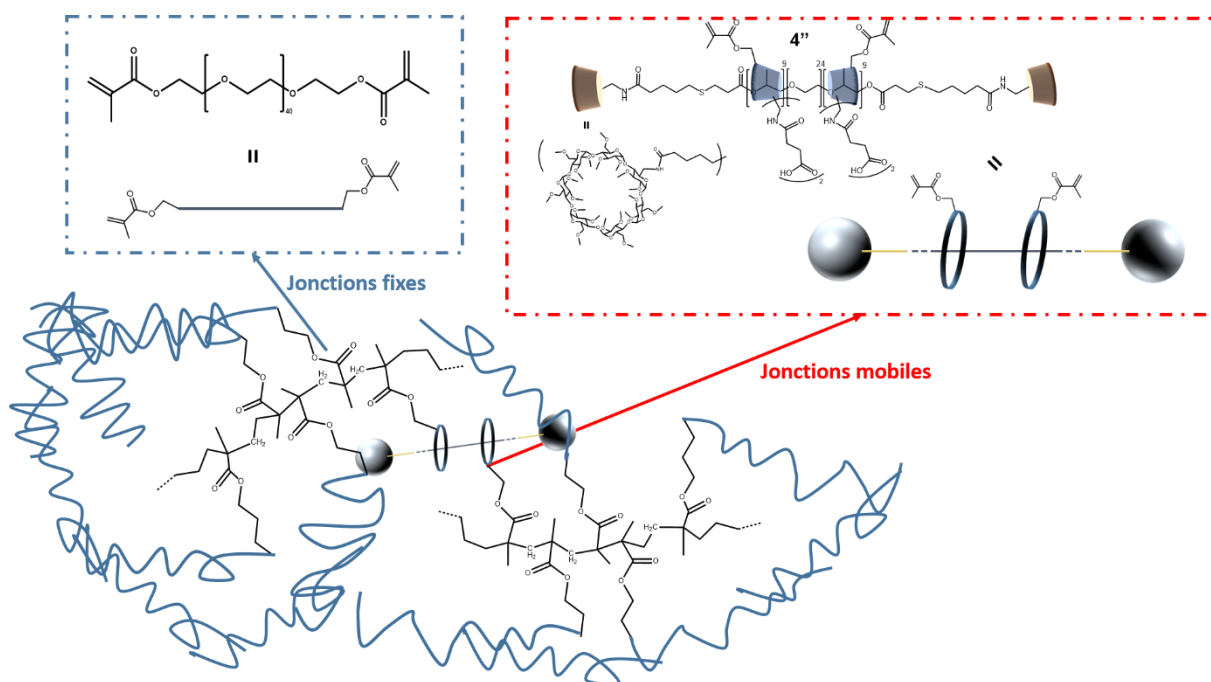


Figure 3.1. Représentation schématique de l'inclusion des PR-(MA)_{2,4} dans la structure du réseau de l'hydrogel hybride.

Comme rappelé ci-dessus, dans un contexte d'une utilisation fréquente du patch transdermique pour un traitement anti-inflammatoire articulaire local, le patch doit être capable de résister aux forces d'étirement et de compression exercées par le corps humain. La grande diversité des mouvements articulaires du corps humain et les propriétés mécaniques anisotropes de la peau font que les variations des forces exercées sur les patches transdermiques sont importantes. Les mouvements des différentes articulations et des organes peuvent engendrer des déformations de petites (environ 20% pour le cerveau et la colonne vertébrale) et grandes amplitudes (plus de 80% de déformation imposée par certains muscles sur la peau) ^[1,2]. Pour se placer au plus près de ces conditions physiologiques, il faut donc caractériser le comportement mécanique du gel ainsi formé dans différentes conditions.

Dans un premier temps, les gels PEG-(MA)₂ et hybrides ont subi des tests de rhéologie et de gonflement. Des tests en compression uni-axiale ont ensuite été effectués. Ces tests permettent de reproduire l'effet de certains mouvements du corps humain, comme une compression exercée par le patient pour déclencher la libération de médicaments (comme développé dans le chapitre 1), ou l'effet compressif d'une articulation (comme le ménisque d'un genou). Ils ont ainsi permis d'obtenir un comportement de référence sous contrainte compressive pour les hydrogels PEG-(MA)₂, et par comparaison, des informations sur les

propriétés mécaniques des hydrogels hybrides. Li et ses collègues [3] ont toutefois mis en évidence des différences de comportements mécaniques en compression et en étirement pour certains gels particulièrement résistants. Pour que l'étude de ces hydrogels hybrides soit complète, il faudrait donc également tester leur résistance à l'étirement. Par manque de temps et de produit de synthèse (4''), ces tests d'étirement n'ont pas pu être réalisés dans le cadre de la thèse. Ils sont cependant prévus dans le cadre de la poursuite du projet de caractérisation de ces hydrogels hybrides.

3.1.2. Approche

Choix de la chimie de réticulation

Lors de la formation d'un hydrogel, le choix de la chimie de réticulation est un élément crucial dont dépend un grand nombre de paramètres. Dans notre cas, la décision finale s'est portée sur des fonctions réactives et faciles à greffer de façon sélective sur les polyrotaxanes, permettant une réticulation rapide, répétable et homogène sur toute la géométrie de l'hydrogel : la photo-réticulation de groupements méthacrylates en présence d'un photoamorceur. En s'appuyant sur des travaux précédents développés dans l'équipe du CERMAV [4], les deux molécules constituant respectivement le réseau polymérique principal (PEG-(MA)₂) et les agents de réticulation (PR-(MA)_{2,4}) ont été sélectionnées et préparées suivant une stratégie décrite ci-dessous.

Choix du réseau polymérique principal

Le choix du réseau principal de l'hydrogel est déterminant car il apporte les propriétés de base (notamment de biocompatibilité) de la matrice du patch transdermique. Ses propriétés mécaniques sont ensuite modifiées par l'incorporation des PR-(MA)_{2,4} dans le réseau en tant qu'agent de réticulation. Dans notre cas, le réseau principal doit donc avoir un comportement mécanique bien décrit dans la littérature, et avec une structure chimique proche de celle des PR pour faciliter l'étude de leur influence. En effet, en réalisant un hydrogel uniquement produit à partir des PEG-(MA)₂, les jonctions fixes créées suite à la réticulation et à la formation du gel seront comparées à celles mobiles (PR-(MA)_{2,4}// PEG-(MA)₂) lors de la formation de l'hydrogel hybride. Garder une structure chimique proche pour ces deux types de jonctions permet d'étudier le plus simplement possible l'effet de la liberté de mouvement des jonctions

mobiles sur les propriétés mécaniques du gel hybride tout en éliminant l'influence de la structure chimique.

Suite à ces considérations, notre choix s'est donc porté sur deux poly(éthylène glycol)-bisméthacrylate commerciaux, PEG-(MA)₂ 2000 et PEG-(MA)₂ 6000, de masses molaires respectives $M_n = 2000$ g/mol et $M_n = 6000$ g/mol.

Stratégie de production d'un hydrogel avec des polyrotaxanes comme agents de réticulation

Les polyrotaxanes doivent posséder au moins deux fonctions méthacrylate réactives sur les β -cyclodextrines-(COOH)₂ enfilées pour former un pont de réticulation. Les groupements méthacrylates sont introduits par estérification des groupes hydroxyle des cyclodextrines enfilées par l'anhydride méthacrylique, laissant libres les fonctions carboxylate des cyclodextrines. La réaction de méthacrylation permet ainsi de conserver une bonne solubilité dans l'eau des polyrotaxanes (Figure 3.2, 1).

Cependant, l'un des objectifs principaux lors de la formation de l'hydrogel hybride est le suivant : les polyrotaxanes-méthacrylates (PR-(MA)_{2,4}) présents dans le réseau de l'hydrogel ne doivent réticuler que par le biais de leur β -cyclodextrines carboxylées enfilées sur le pluronic (et donc mobiles). Ainsi, un maximum de fonctions mobiles sera introduit dans le réseau et il sera également plus aisé de raisonner sur sa structure. Pour cela, les groupements de fin de chaîne du polyrotaxane (qui dans le chapitre 2 sont des β -cyclodextrines-pentènamide (**2**)) doivent donc être protégés lors de la réaction de méthacrylation. En effet, toutes les fonctions hydroxyle des β -cyclodextrines - γ compris celles des β -cyclodextrines-pentènamide de fin de chaîne- sont susceptibles d'être modifiées par des groupements méthacrylate lors de la réaction d'estérification avec l'anhydride méthacrylique (Figure 3.2, 1). De nouveaux groupements stériques stoppeurs, deux β -cyclodextrines-pentènamide méthylées (**2'**), ont donc été utilisés lors de la synthèse du polyrotaxane **4'** introduit ensuite comme agent de réticulation dans l'hydrogel. La réaction de méthacrylation est réalisée dans un second temps sur le polyrotaxane déjà formé.

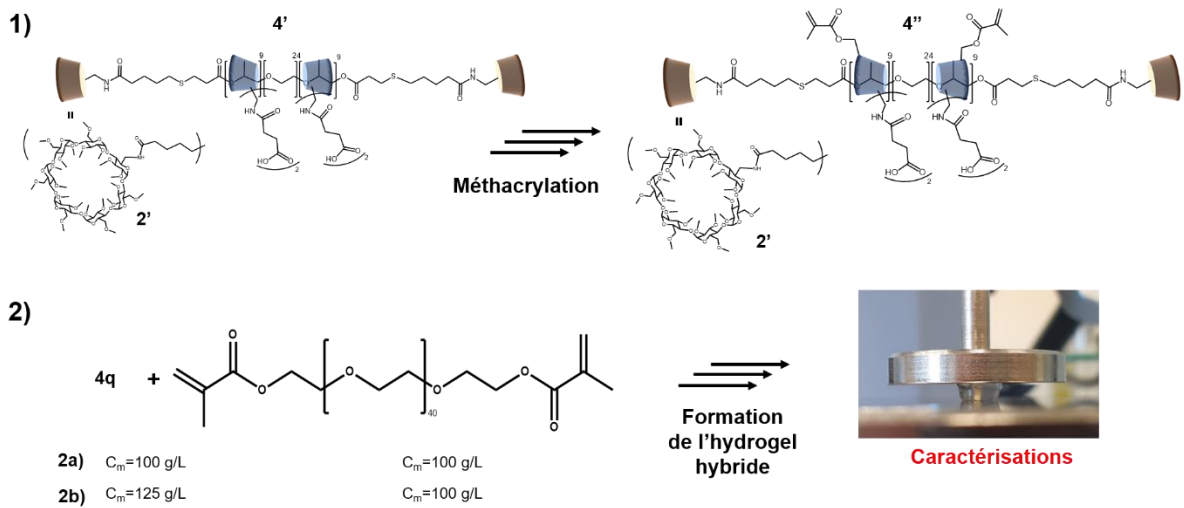


Figure 3.2. Stratégie de synthèse et de formation de gels hybrides PEG-(MA)₂//PR-(MA)_{2,4}

Le principal réseau qui compose l'architecture du gel est le réseau formé par le PEG-(MA)₂. Les PR-(MA)_{2,4} sont intégrés en tant qu'agent de réticulation en utilisant deux proportions différentes. Leur incorporation dans le réseau apporte alors des ponts de réticulation mobiles qui influencent les propriétés mécaniques des gels formés (Figure 3.2, 2). Leurs caractéristiques mécaniques ont ensuite été étudiées, en comparaison avec les gels PEG-(MA)₂. Des mesures rhéologiques, de gonflement et des tests de compression uni-axiale ont été réalisés pour évaluer l'influence des jonctions mobiles sur le comportement de l'hydrogel.

3.2. Résultats

3.2.1. Synthèse d'un polyrotaxane avec des stoppeurs à base de cyclodextrines méthylées

Comme décrit précédemment, la première étape de la production de l'hydrogel hybride est la synthèse d'un nouveau stoppeur protégé, la β -cyclodextrine-pentenamide méthylée **2'**. Ce dérivé a été synthétisé avec un rendement de 54 % par une réaction d'amidation entre la cyclodextrine commerciale 6-monoamino-6-monodeoxy-2-O-méthyl-hexakis-(2,6-di-O-méthyl)- β -Cyclodextrine et l'anhydride penténoïque. La même stratégie a été utilisée pour la synthèse du produit **2** dans le chapitre 2 (partie 2.2.2.). Les détails expérimentaux sont décrits dans le chapitre 5 (partie 5.3.1.). Le produit **2'** a ensuite été utilisé dans la synthèse du polyrotaxane **4'** (Figure 3.3).

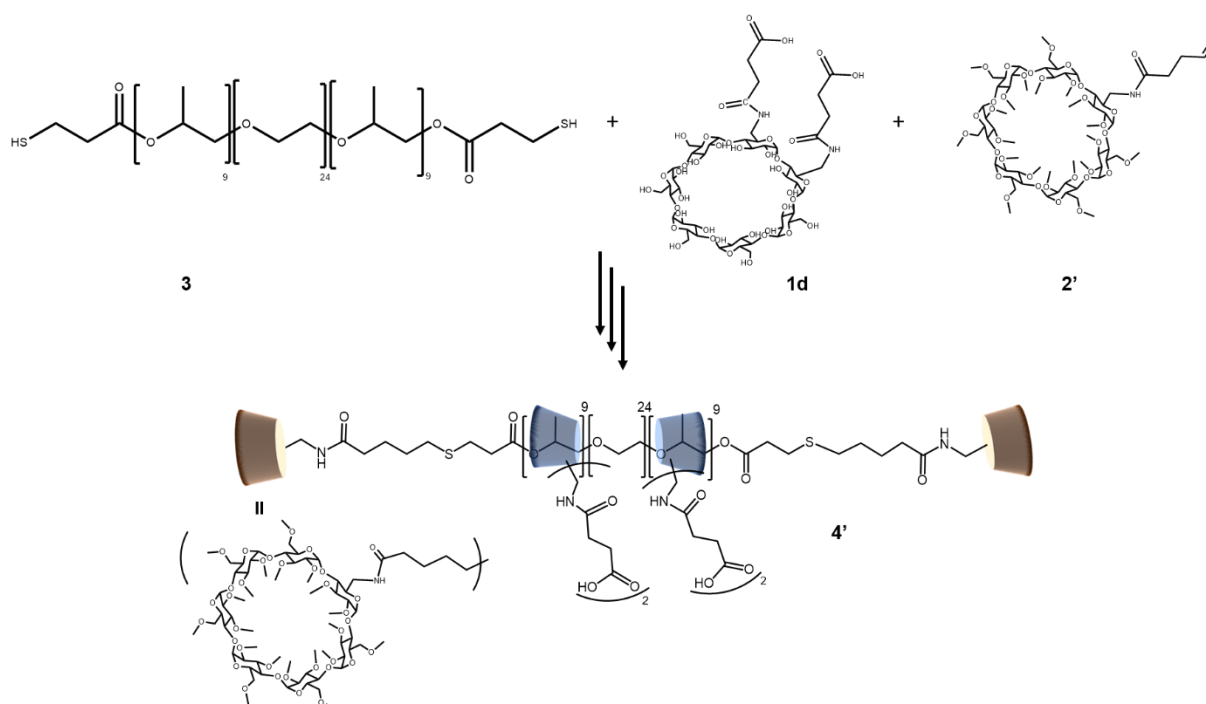


Figure 3.3. Produits de départ pour la formation du polyrotaxane **4'** avec ses groupements de fin de chaîne complètement méthylés.

Le nouveau polyrotaxane **4'** avec deux stoppeurs méthylés a été obtenu, selon une voie de synthèse déjà optimisée décrite dans le chapitre 2 (partie 2.2.2). Lors de la deuxième étape de fermeture du polyrotaxane, deux β -cyclodextrines-penténamide méthylées (**2'**) ont ainsi été greffées par addition thiol-ène activée sous UV. Les détails de la réaction sont à retrouver dans

le chapitre 5 (section 5.3.1). Le polyrotaxane **4'** avec 2 β -CD-(COOH)₂ (produit **1d**) enfilées a été obtenu avec un rendement de 60%. La structure du produit a été confirmée par RMN.

3.2.2. Synthèse d'un polyrotaxane-méthacrylate ((PR-(MA)_{2,4}, **4''**)

La réaction de méthacrylation du polyrotaxane **4'** par l'anhydride méthacrylique a été effectuée en présence de 4-diméthylaminopyridine et de triéthylamine dans le diméthylsulfoxyde à 40°C pendant 24h (Figure 3.2). Après dialyse et lyophilisation, le polyrotaxane **4''** a été isolé, avec 2 β -CD-(COOH)₂ sur lesquelles 2.4 groupes méthacrylates sont greffés en moyenne, avec un rendement de 25%. La structure a été confirmée par RMN (¹H, D₂O, 400 MHz, Figure 3.4).

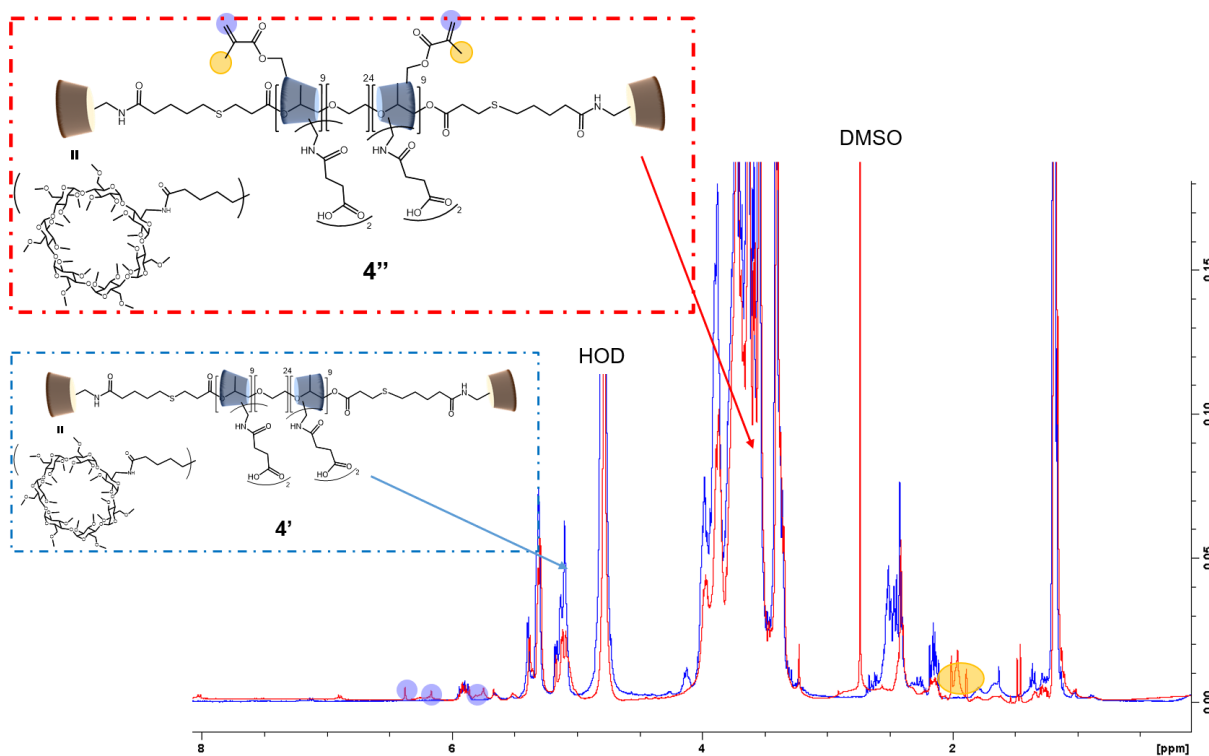


Figure 3.4 : Spectres RMN ¹H (D₂O, 400 MHz, 25°C) superposés du polyrotaxane **4'** et du polyrotaxane-méthacrylate **4''**

3.2.3. Formation des hydrogels

Production et caractérisations des hydrogels PEG-(MA)₂

L'étude a consisté dans un premier temps à déterminer la concentration minimale permettant d'obtenir un hydrogel qui conserve sa géométrie au cours du temps et qui est facilement manipulable (Figure 3.5). 8 solutions de PEG-(MA)₂ 2000 et PEG-(MA)₂ 6000 à 4 concentrations

différentes (30 g/L, 50 g/L, 70 g/L et 100 g/L) ont été préparées puis analysées par photo-rhéologie à l'aide d'un rhéomètre équipé d'une lampe UV ($\lambda = 365$ nm). Les modules de stockage (G') et de perte (G'') ont été enregistrés en fonction du temps : la solution a été irradiée à partir de 1,5 minutes ($P=20$ mW/cm²) après le début de la mesure, et ce, pendant 35 minutes. Parmi les 4 concentrations testées avec les deux poly(éthylène glycol)-bisméthacrylate, un point de croisement des modules de stockage (G') et de perte (G''), au-delà duquel G' devient supérieur à G'' , est observé au bout de 5 minutes d'acquisition, en moyenne, pour 3 d'entre elles (50 g/L, 70 g/L et 100 g/L). Ce point de croisement indique le début de la réticulation. Après 10 minutes d'exposition aux UV, le phénomène de réticulation est complet, G' atteignant une valeur plateau représentative de l'élasticité de l'hydrogel de PEG-(MA)₂ ainsi produit. A la fin du processus de réticulation, un balayage en fréquence a permis de déterminer la valeur finale retenue de G' pour les études ultérieures. Les résultats pour les deux hydrogels de PEG-(MA)₂ de masses molaires différentes sont présentés figure 3.5 A. et B. Le balayage en fréquence a finalement permis de s'assurer de l'indépendance des modules G' et G'' en fonction de la fréquence, une caractéristique des réseaux hydrogels covalents [5].

Pour les deux types d'hydrogel produit à partir de PEG-(MA)₂, deux concentrations présentent des valeurs G' suffisamment élevées pour garantir la conservation de leur géométrie et une manipulation aisée lors des différentes opérations ($G' \geq 1000$ Pa) : 70 g/L et 100 g/L. Par ailleurs, la masse molaire M_n du poloxamère-dithiols « pluronic reverse 10R5 » modifié **3** utilisé pour la synthèse des polyrotaxanes est de 2295 g/mol. Dans un souci d'imitation de la structure chimique des polyrotaxanes, le dérivé PEG-(MA)₂ 2000 a été sélectionné pour la suite des mesures. Les hydrogels de PEG-(MA)₂ 2000 à 70 g/L et à 100 g/L ont donc finalement été choisis pour y inclure des polyrotaxanes-méthacrylates.

Les hydrogels de référence ont ensuite été formés dans des moules identiques de 6 mm de diamètre et 5 mm de hauteur par photo-réticulation sous irradiations UV ($\lambda = 365$ nm) pendant 15 minutes à 60 mW/cm². Le protocole expérimental est précisément décrit dans le chapitre 5 (partie 5.3.2.).

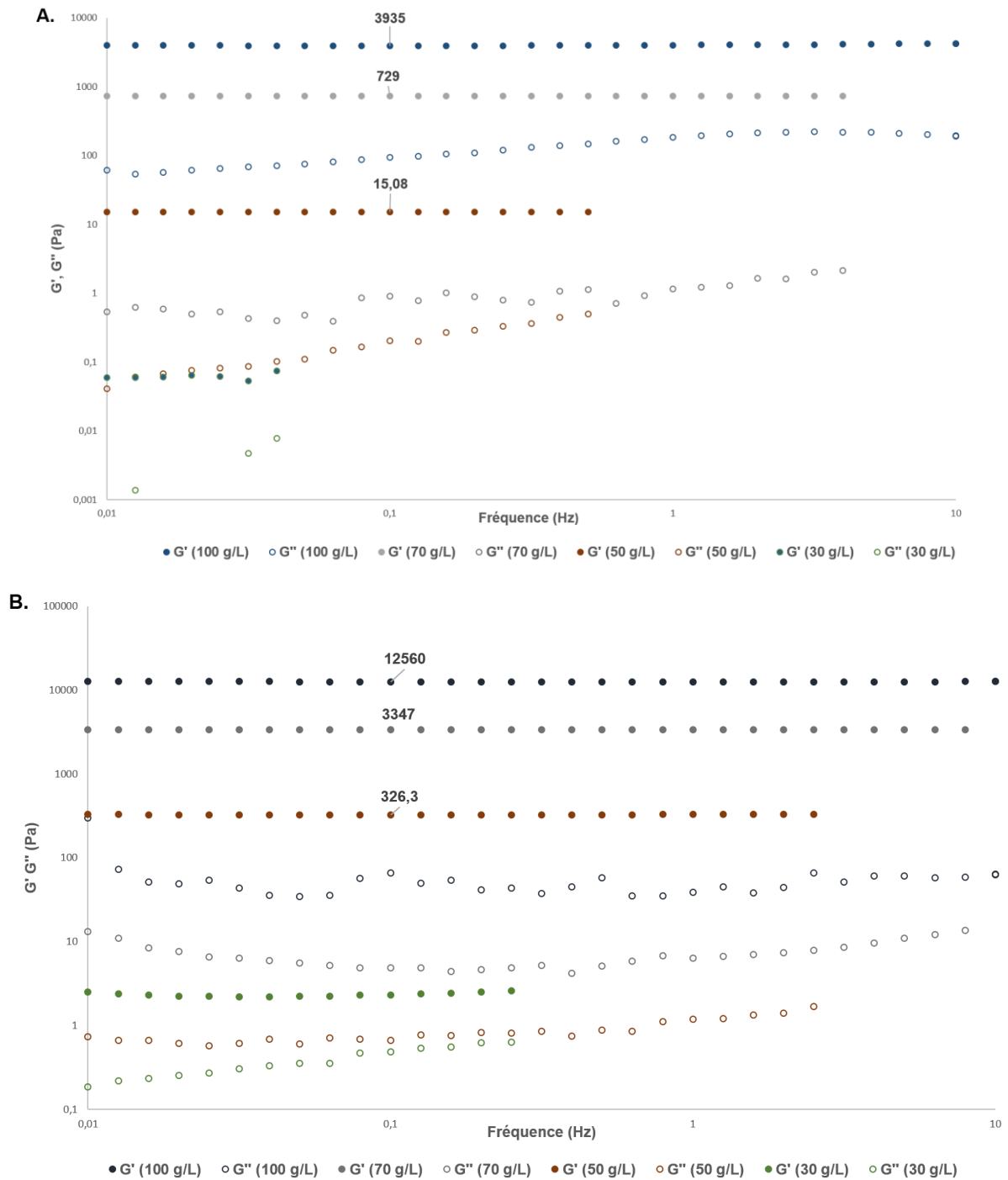


Figure 3.5 : Analyse de la formation de l'hydrogel PEG-(MA)₂ 2000 et PEG-(MA)₂ 6000 par photo-rhéologie *in situ*. **A.** Modules de stockage (G') et modules de perte (G'') en fonction de la fréquence à une déformation fixe de 3,5% enregistrés lors de la formation de 4 hydrogels différents de PEG-(MA)₂ 2000. **B.** Modules de stockage (G') et modules de perte (G'') en fonction de la fréquence à une déformation fixe de 3,5% enregistrés lors de la formation de 4 hydrogels

différents de PEG-(MA)₂ 6000. La mesure a été effectuée 35 min après le début de l'exposition aux UV.

Production et caractérisations des hydrogels hybrides PR-(MA)_{2,4}// PEG-(MA)₂

Les hydrogels hybrides PR-(MA)_{2,4}// PEG-(MA)₂ ont été produits avec la même méthode de photo-réticulation que les hydrogels de référence (Figure 3.6.). Le protocole est détaillé chapitre 5 section 5.4.2.

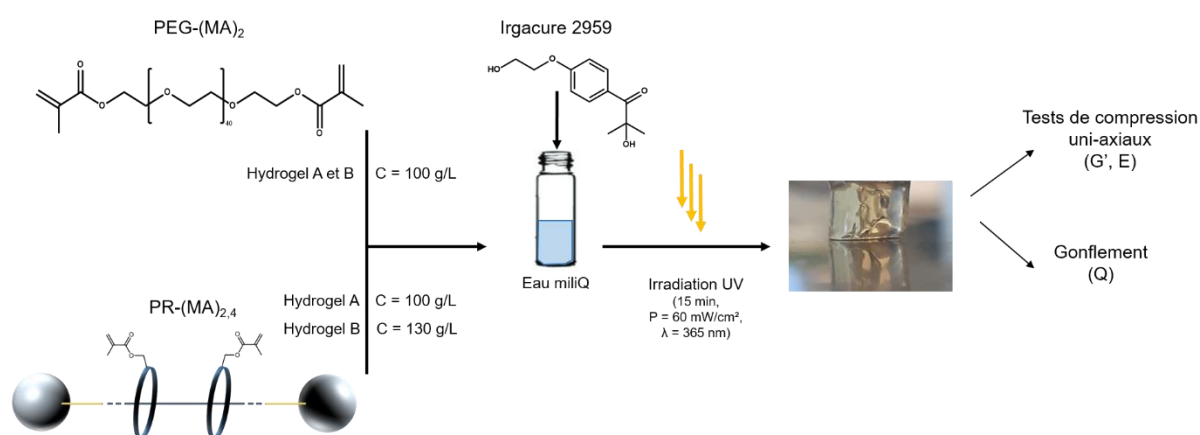


Figure 3.6. Schéma de production des hydrogels hybrides PR-(MA)_{2,4}// PEG-(MA)₂

Deux concentrations de PR-(MA)_{2,4} ont été testées pour produire les hydrogels hybrides A et B. A l'observation, ces deux hydrogels hybrides étaient plus élastiques que les hydrogels de référence et arboraient une couleur légèrement jaunâtre. Leur comportement physico-chimique a ensuite été étudié plus en détails, d'abord grâce à des mesures de gonflement Q , défini comme le rapport du poids de l'hydrogel gonflé sur son poids sec :

$$Q = \frac{W_{\text{gonflé}}}{W_{\text{sec}}}$$

Les hydrogels de référence et les hydrogels hybrides ont été placés à gonfler dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH = 7,4) pendant 48 heures. Leur poids à l'état gonflé a été relevé et ensuite comparé à leur poids après 4 jours de séchage à l'étuve. Les détails du protocole expérimental sont décrits dans le chapitre 5 (partie 5.4.3). Les résultats sont exposés dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1 : Compositions chimiques et taux de gonflement des hydrogels de référence et hybrides.

Composition chimique	Gel	PEG-(MA) ₂		PR-(MA) _{2.4}		Q
		C _m (g/L)	[MA] (mM)	C _m (g/L)	[MA] (mM)	
PEG-(MA) ₂	Réf A	70	70	/	/	
	Réf B	100	100	/	/	13,3 ± 0.3
PR-(MA) _{2.4} //	A	100	100	100	30	17,3
PEG-(MA) ₂	B	100	100	130	38	15,6

L'ajout de polyrotaxanes-méthacrylate dans le réseau des hydrogels de référence de poly(éthylène glycol)-bisméthacrylate entraîne une augmentation du taux de gonflement. La mobilité des jonctions PR-(MA)_{2.4}// PEG-(MA)₂ semble permettre un meilleur gonflement du réseau hydrogel. Toutefois, une augmentation dans la concentration des PR-(MA)_{2.4} et donc dans la densité de réticulation limite ce phénomène ^[6].

L'étude du gonflement des hydrogels hybrides a également permis d'apporter des informations quant à l'efficacité de réticulation lors de la formation des réseaux hybrides. Après lyophilisation de la solution de PBS utilisée pour la mesure de gonflement et quantification par RMN ¹H via l'ajout d'acide maléique comme étalon interne, la quantité de PR-(MA)_{2.4} non intégrées covalamment dans le gel a pu être déterminée (figure 3.7). La méthode complète est détaillée dans la partie 5.4.3 du chapitre 5.

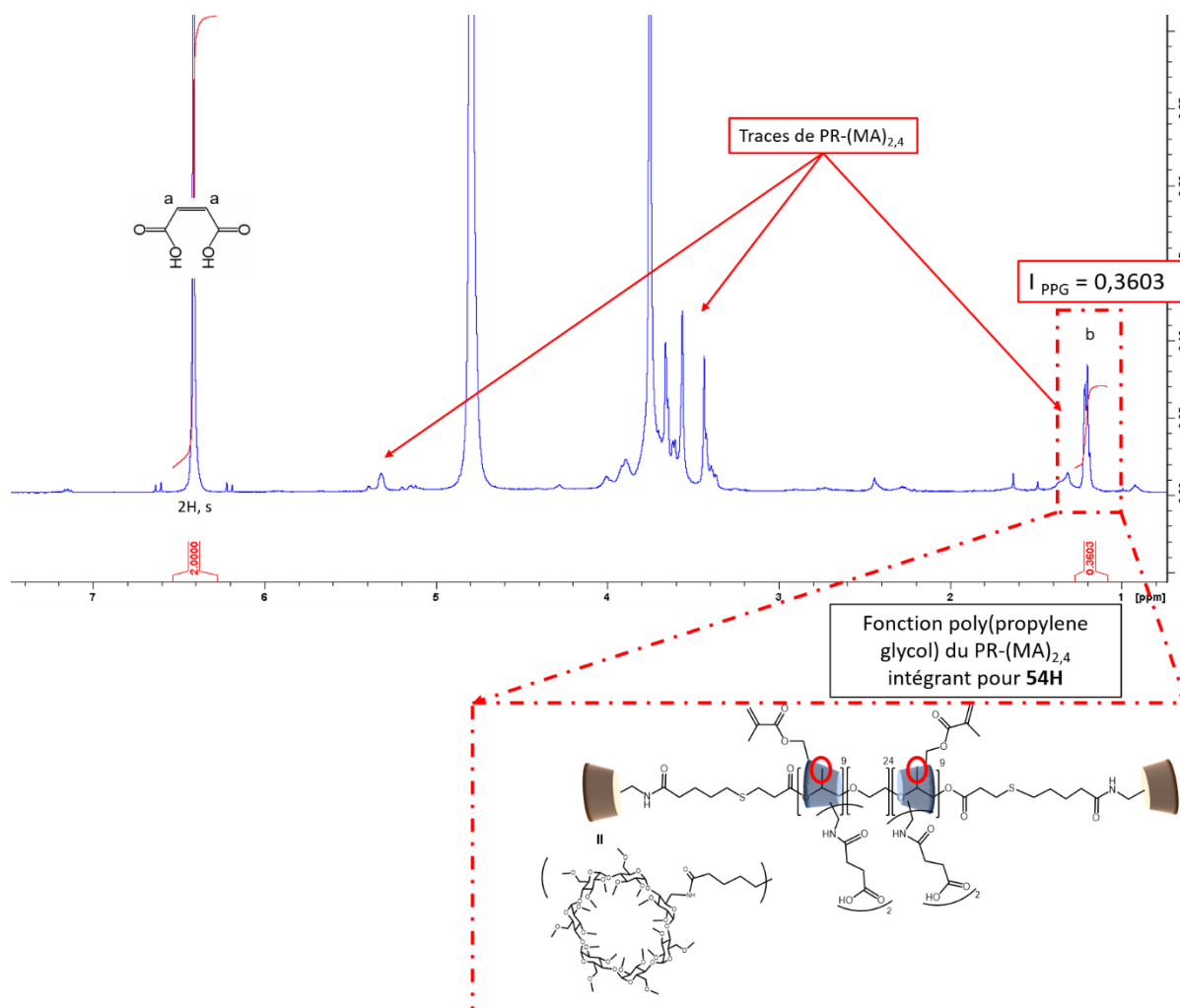


Figure 3.7. Quantification des PR-(MA)_{2,4} non réticulés lors de la formation des hydrogels hybrides par RMN ¹H via un étalon interne.

Le calcul utilisé pour déterminer la masse de PR-(MA)_{2,4} non incorporé covalamment dans l'hydrogel est le suivant :

$$w_{\text{PR-(MA)}_{2,4}} = \frac{I_{\text{PPG}}}{54} \times \frac{w_{\text{maleic acid}} \times M_{\text{PR-(MA)}_{2,4}}}{2M_{\text{maleic acid}}}$$

où I_{PPG} est l'intégration du signal à 1,2 ppm correspondant à la fonction poly(propylene glycol) du PR-(MA)_{2,4} (figure 3.7), $M_{\text{PR-(MA)}_{2,4}} = 8116,2$ g/mol et $M_{\text{maleic acid}} = 116$ g/mol.

Dans le cas de l'hydrogel A, $w_{\text{PR-(MA)}_{2,4}} = 0,96$ mg (soit 8% des PR-(MA)_{2,4} engagés dans la réticulation). Le dérivé PR-(MA)_{2,4} est donc intégré en majorité (92%) dans le réseau de façon covalente.

3.2.4. Caractérisations mécaniques par tests de compression uni-axiale

Les propriétés mécaniques des gels de PEG-(MA)₂ et des gels hybrides PR-(MA)_{2,4}//PEG-(MA)₂ juste après synthèse ont été évaluées par des tests mécaniques de compression uni-axiale en effectuant plusieurs cycles successifs. Après leur synthèse sous la forme de cylindres de 6 mm de diamètre et de 5 mm de hauteur, les deux familles d'hydrogels ont été soumises à des compressions successives et progressives allant jusqu'à 10, 20, 30, 40 et 50% de déformation en compression. Entre chaque compression, la géométrie (plan) a été relevée pour laisser le cylindre revenir à sa géométrie initiale. La force nominale, la déformation du cylindre, et le temps ont été enregistrés au fur et à mesure de la mesure. Chaque hydrogel a été testé selon cette procédure. Il est important de noter que les gels Réf A et A se sont fissurés lors de la compression à 40% de déformation, ce qui explique l'allure des courbes de la Figure 3.8, présentant une hystérèse importante sur la dernière compression. L'apparition de fissure est sûrement due à un défaut structural apparu lors de la synthèse du gel. Les premiers cycles de compression de ces gels ont tout de même été exploités. La Figure 3.8 compare les comportements en compression des deux types d'hydrogel. Deux exemples de photos sont présentés figure 3.9. Le protocole complet est détaillé dans le chapitre 5.

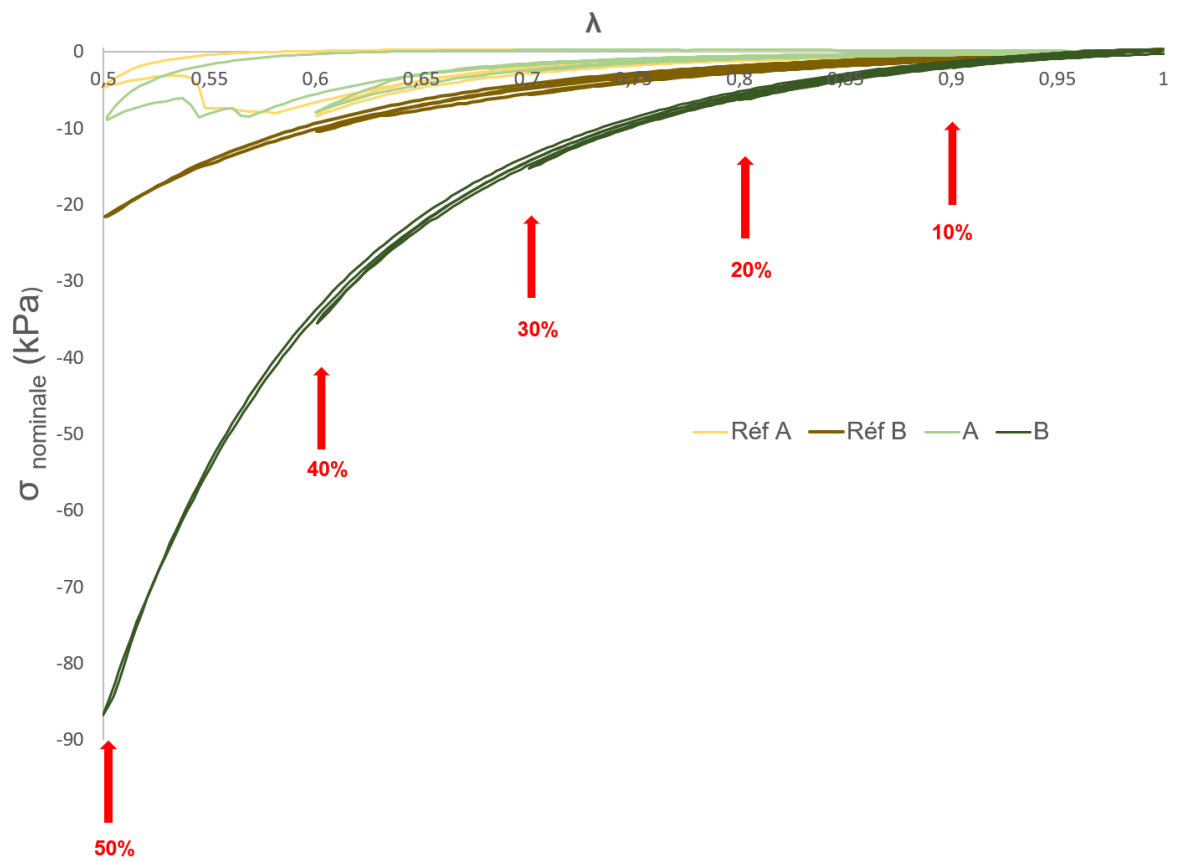


Figure 3.8. Courbe contrainte-déplacement des tests de compressions cycliques des hydrogels PEG-(MA)₂ (Réf A et Réf B, Tableau 3.1) et des hydrogels PEG-(MA)₂//PR-(MA)_{2,4} (A et B, Tableau 3.1).

$\sigma_{\text{nominale}} = F/S_0$ avec F la force nominale enregistrée lors des tests de compression et S_0 la surface du cylindre initiale. $\lambda = (h_0 - \Delta h)/h_0$ avec h_0 la hauteur initiale du cylindre et Δh le déplacement enregistré lors des tests de compression.

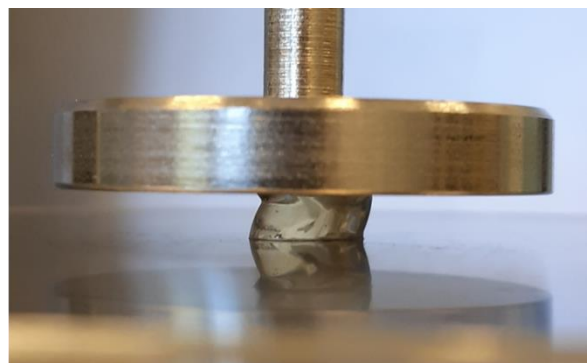
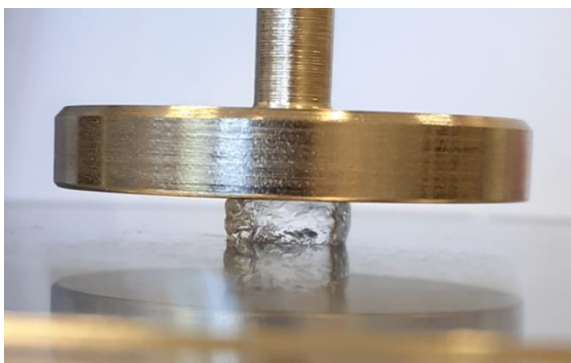


Figure 3.9. Photos des tests de compressions sur les hydrogels. A gauche, l'hydrogel PEG-(MA)₂ 'Réf A', à droite l'hydrogel PEG-(MA)₂//PR-(MA)_{2,4} 'B'.

Ces tests de compressions cycliques ont mis en avant plusieurs phénomènes dans le comportement mécanique des hydrogels PEG-(MA)₂//PR-(MA)_{2,4} par rapport aux gels de référence.

Evolution de G' et du taux de gonflement avec l'inclusion des PR-(MA)_{2,4}

La première donnée extraite de ces acquisitions est le module de stockage (G') et son évolution au cours des compressions successives, sur les 4 différents gels. La valeur moyenne de G' sur les 5 compressions peut être déduite des pentes initiales de la courbe $\sigma_{nominale} = f(\lambda - \frac{1}{\lambda^2})$ sur chaque cycle. Cette valeur moyenne donne une première indication du comportement élastique de chaque hydrogel en fonction de la concentration en PR-(MA)_{2,4}. Le détail des calculs est à retrouver dans le chapitre 5.

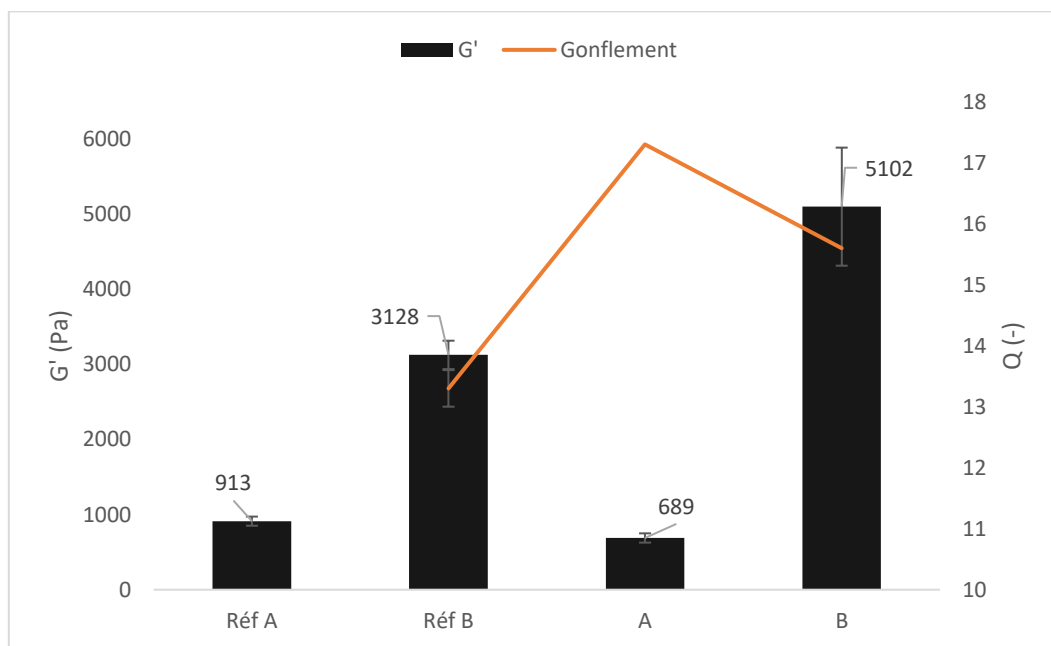


Figure 3.10. Module moyen de stockage (G') déduit des cycles de tests de compressions uniaxiaux et taux de gonflement des différents hydrogels formés à partir de PEG-(MA)₂ et PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4}.

Les valeurs moyennes présentées dans la Figure 3.10 montrent une augmentation du module G' pour l'hydrogel de référence, Réf B, uniquement constitué de PEG-(MA)₂, par rapport à son homologue Réf A. Cette augmentation s'explique par une augmentation de la densité de réticulation, due à l'augmentation de la concentration en dérivé PEG-(MA)₂. Il est intéressant de noter que les valeurs obtenues à partir des tests de compression juste après synthèse des gels sont du même ordre de grandeur que celles déterminées par photo-rhéologie ($G'_{\text{plateau}} = 3935$ et 720 Pa, respectivement, Figure 3.5).

L'ajout de PR-(MA)_{2,4} à une concentration de 100 g/L (hydrogel A, correspondant à une augmentation de la [MA] de 30 mM) dans le réseau fait chuter la valeur de G' à un niveau proche de l'hydrogel Réf A. L'hydrogel est donc plus mou que l'hydrogel Réf B et présente un taux de gonflement significativement plus élevé. Les mailles du réseau PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4} sont donc plus lâches. Plusieurs travaux ont rapporté que les hydrogels à nœuds glissants, réticulés par des polyrotaxanes, présentent non seulement une étirabilité élevée, mais également une capacité de gonflement marquée dans les solvants ^[7,8]. Le gonflement plus important observé pour l'hydrogel A pourrait être lié aux nœuds glissants. Néanmoins, le module G' , significativement plus faible que celui mesuré pour le gel de référence Réf B, laisse penser que seulement une partie du dérivé PR-(MA)_{2,4}, intégré covalamment au réseau, participe de manière effective à la réticulation. L'encombrement stérique et l'absence de bras espaceur entre les groupements méthacrylate et les cyclodextrines sont deux raisons qui peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène.

En revanche, l'augmentation de la concentration en PR-(MA)_{2,4} de 30% conduit à une augmentation de la valeur de G' de près de 10 fois (hydrogel B). Par ailleurs, le taux de gonflement de l'hydrogel B reste supérieur à celui des hydrogels de PEG-(MA)₂. Ces deux constatations rassemblées semblent indiquer la présence de nœuds glissants apportés par le dérivé PR-(MA)_{2,4}, conférant à la fois une meilleure résistance de l'hydrogel à la compression et une capacité de gonflement élevée comparée aux hydrogels de poly(éthylène glycol) de référence.

De plus, la quantification RMN des extractibles de l'hydrogel PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4} A a montré que seuls 8% des PR-(MA)_{2,4} ne sont pas réticulés. 92% des polyrotaxanes sont donc encore présents dans l'hydrogel.

En conclusion, d'après la quantification RMN des extractibles de l'hydrogel PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2.4}, le réseau hydrogel PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2.4} intègre une majorité des PR-(MA)_{2.4} mis en réaction dans le réseau polymérique. L'apport de jonctions mobiles modifie les propriétés mécaniques sous compression, avec une capacité accrue à résister à la compression accompagnée par une capacité de gonflement améliorée.

Hystérèse et phénomènes dissipatifs

La figure 3.8 met en évidence le fait que les courbes de mises en charges compressives sont superposables d'une compression successive à l'autre, et ce pour les 4 hydrogels. Cela signifie que de premier abord, les hydrogels retrouvent leur état initial après compression, de 10% jusqu'à 50% de déformation - sans prendre en compte les fractures des hydrogels B et Réf B.

Toutefois, lors des différents cycles de compression, des dissipations d'énergie entre la charge et la décharge en compression (hystérèse) sont modérément observés pour les 4 hydrogels. Le phénomène d'hystérèse semble plus important pour l'hydrogels B (PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2.4}), comme il est montré sur ce zoom en début de courbe sur la Figure 3.11. Pour les hydrogels de référence Réf A et Réf B, considérés comme des réseaux idéaux de chaînes polymériques Gaussiennes, cette hystérèse minime traduit la limite d'élasticité des chaînes. Ces phénomènes dissipatifs d'énergie peuvent ainsi être dus à de l'endommagement du réseau et/ou à un réarrangement des chaînes grâce aux jonctions mobiles. Les valeurs du module de stockage à chaque mise en charge compressive pour un même test de compression ont donc été comparées pour chaque hydrogel.

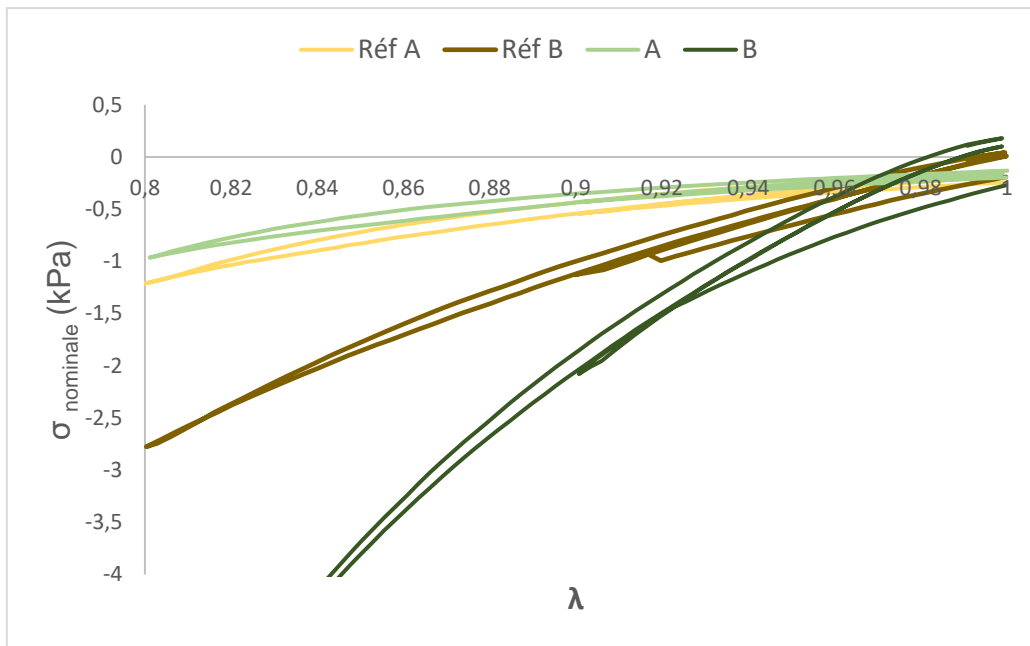


Figure 3.11. Zoom sur l'ordonnée à l'origine de la courbe contrainte-déplacement en compression des 4 hydrogels.

Un endommagement doit se traduire par une modification du module G' sous l'effet des compressions successives. La figure 3.12 montre que celles-ci provoquent une variation de la valeur de G' , mais qui reste modérée, avec des valeurs légèrement supérieures dès le second cycle de compression à 20% de déformation. L'hydrogel PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4} B présente notamment une augmentation de 28% de G' lors de cette compression, qui re-diminue ensuite avec les compressions suivantes. Le comportement élastique des différents hydrogels reste donc relativement constant lors des compressions successives. Ainsi, il semble que la dissipation d'énergie importante constatée pour l'hydrogel B ne soit pas due à un endommagement du réseau, mais bien à un autre phénomène, lié aux réarrangements des jonctions mobiles PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4} sous la contrainte compressive.

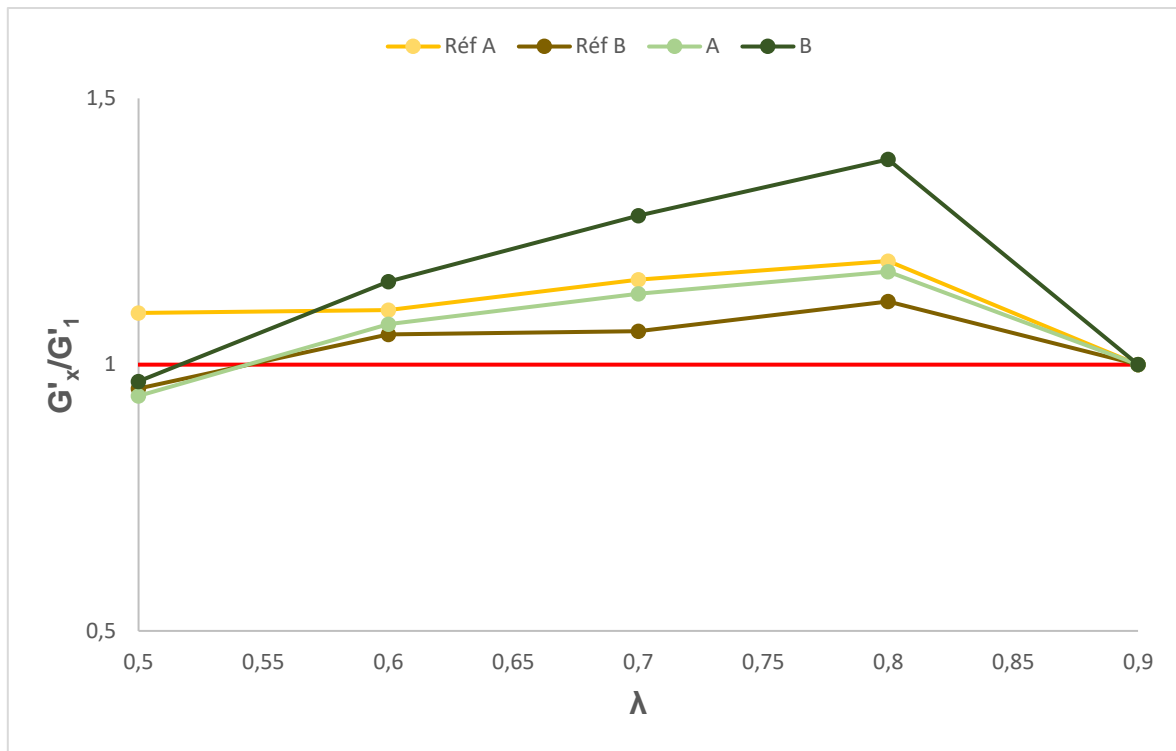


Figure 3.12. Comparaison des valeurs du module de stockage G' en fonction des déformations compressives pour chaque hydrogel. La droite $G'_x/G'_1 = 1$ est matérialisée en rouge.

Par ailleurs, la figure 3.11 permet de constater un début moins linéaire de la courbe contrainte-déplacement pour l'hydrogel PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2.4} B, comparé à celles des gels de référence constitués uniquement de PEG-(MA)₂, ainsi que l'hydrogel A. Le modèle néo-hookéen, décrivant ainsi ce réseau idéal constitué de chaînes polymère gaussiennes, semble donc plus adapté pour décrire les hydrogels de référence alors que l'hydrogels hybride B semble présenter un comportement plus complexe. Le changement de pente vers des valeur de σ_{nominale} plus grande en valeur absolue indique un durcissement de ce réseau. En ce qui concerne le gel A, son comportement proche du gel de Réf A, préparé à partir de PEG-(MA)₂ à une concentration de 70 g/L (Tableau 3.1), suggère que le PR-(MA)_{2.4} incorporé coalemment au réseau ne participe quasiment pas à la création de nœuds de réticulation glissants. Le PR-(MA)_{2.4} est vraisemblablement lié par réaction d'un seul groupement méthacrylate, ce qui expliquerait que dans ce cas, le gel A présente un comportement ressemblant à un gel classique, constitué de chaînes polymère gaussiennes.

Durcissement à la compression

Le phénomène de durcissement observé à partir de la courbe contrainte-déplacement (Figure 3.8) à mesure que les compressions augmentent a été analysé plus en détail. Les 4 hydrogels présentent un durcissement plus ou moins prononcé aux grandes déformations compressives.

Le tracé de la contrainte réduite σ_{red} , définie par l'équation ci-dessous [9], en fonction de $1/\lambda$, met mieux en évidence ce phénomène, en soulignant la partie non linéaire de la courbe contrainte-déformation.

$$\sigma_{red} = \frac{\sigma_{nominale}}{\lambda - \frac{1}{\lambda^2}}$$

Dans le modèle néo-Hookéen, et en présence d'un hydrogel incompressible, σ_{red} est une constante par rapport à $1/\lambda$ [10,11]. La Figure 3.13 représente la courbe σ_{red} en fonction de l'inverse du déplacement $1/\lambda$ pour deux hydrogels pour lesquels le phénomène est évident sur la Figure 3.8: l'hydrogel Réf B et l'hydrogel hybride B. Les hydrogels A et Réf A n'ont pas été pris en compte dans cette représentation à cause de leur fracture à 40% de déformation.

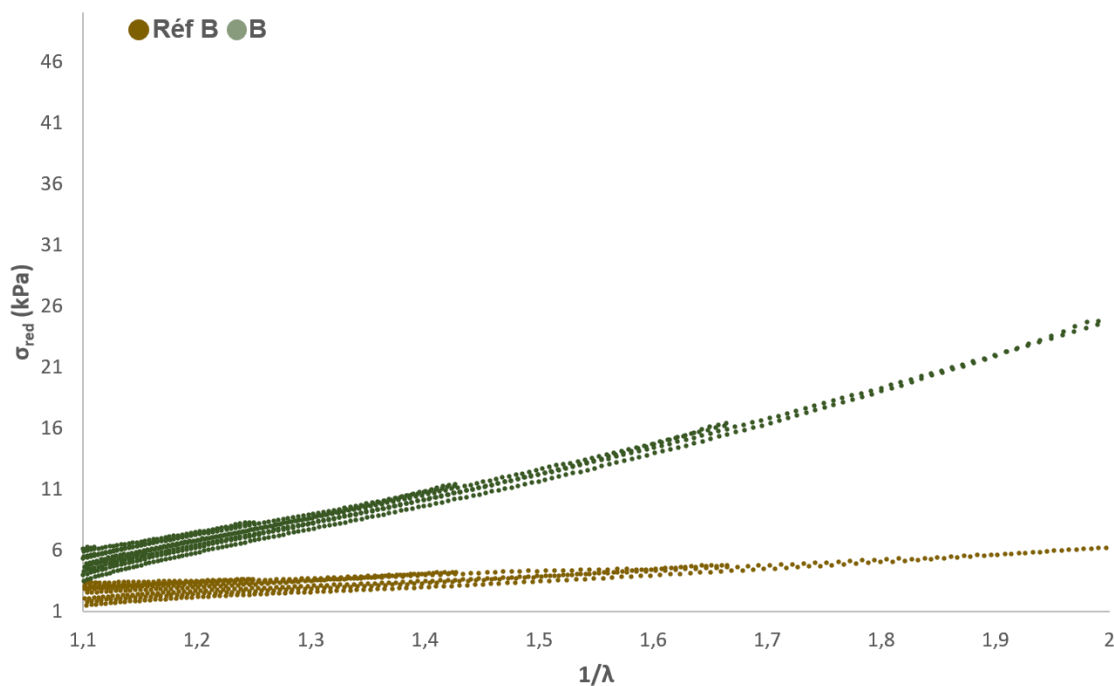


Figure 3.13. Contrainte réduite en fonction de l'inverse du déplacement (aussi appelée courbe de Mooney) pour les hydrogels Réf B et B, avec un zoom sur les grandes déformations.

En effet, l'hydrogel hybride B (PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4}) présente une augmentation de sa contrainte réduite plus importante que l'hydrogel Réf B. Les polyrotaxanes-méthacrylates pourraient donc jouer un rôle dans ce durcissement aux fortes compressions. Il a ainsi déjà été constaté que sous l'effet d'un étirement constant, les β -cyclodextrines de polyrotaxanes peuvent se rassembler et s'aligner ^[12]. Elles forment alors des agrégats dont la cohésion est renforcée par des liaisons hydrogènes inter-molécules. Le même phénomène pourrait être retrouvé ici et expliquer le durcissement du matériau sur les derniers cycles de compression à 40 et 50% de déformation, en l'absence d'endommagement du réseau. L'hydrogel Réf B présente lui aussi un durcissement très progressif de son réseau aux grandes déformations, dû aux limites d'élasticité des chaînes polymères qui sont atteintes dans le réseau PEG-(MA)₂ ^[11], sans aucune mesure toutefois par rapport à l'hydrogel B. Aussi, comme discuté précédemment, on ne semble pas relever ce phénomène pour l'hydrogel A qui a un comportement remarquablement proche de celui de l'hydrogel de référence A. Il est possible qu'une certaine concentration seuil de polyrotaxanes ait besoin d'être atteinte pour que leur influence soit visible dans ce contexte.

Les tests mécaniques et de gonflement sur les hydrogels de référence et les hydrogels hybrides ont permis de mettre en évidence plusieurs propriétés intéressantes des gels PEG-(MA)₂// PR-(MA)_{2,4}. L'hydrogel B présente une élasticité aux petites déformations compressives, et durcit sous de plus fortes charges. Les jonctions mobiles formées par les polyrotaxanes apportent un nouveau mécanisme de dissipation de l'énergie par réarrangement des mailles du réseau grâce au glissement des β -cyclodextrines. Cette combinaison de propriétés est intéressante car elle permet d'imiter les hydrogels formés à partir de biopolymères, tout en conservant une ductilité rendant sa manipulation aisée. En effet, les hydrogels « naturels », provenant de la nature et qui sont souvent source d'inspiration pour le design des futures matériaux, présentent souvent un comportement de durcissement sous contraintes ^[13-15] (ce qui permet de préserver l'intégrité des tissus biologiques sous de fortes déformations dans un contexte physiologique) mais sont cassants ^[16,17]. Ici, les premiers tests effectués ici sur les hydrogels hybrides semblent indiquer qu'ils possèdent deux propriétés attractives pour leur utilisation dans un patch transdermique, le durcissement sous contrainte lui conférant une certaine résistance, et une maniabilité appréciable pour l'utilisation du patch par le patient.

3.3. Conclusion

Dans ce chapitre, des hydrogels hybrides incluant des polyrotaxanes-méthacrylates (PR-(MA)_{2,4}) en tant qu'agents de réticulation ont été formés. En s'appuyant sur les travaux précédents de synthèse de polyrotaxanes, un nouvel agent réticulant **4''** optimisé à nos hydrogels a été développé. Bien que limitées par la quantité de produit disponible et par le temps d'expérimentation, plusieurs explorations ont pu être menées pour mieux décrire le comportement de ces hydrogels originaux, lors de leur synthèse, de leur gonflement, et lors d'une série de compressions progressives/relâchements.

Ainsi, ce travail préliminaire a mis en lumière la capacité de ces hydrogels hybrides à supporter des compressions jusqu'à 50% de déformation, à se durcir aux grandes compressions, et à conserver un comportement élastique sur une large plage de déformation. Ces propriétés dépendent du taux de réticulation avec des polyrotaxanes-méthacrylates, comme le montre la disparité de résultats entre les hydrogels A et B. Toutefois, du temps supplémentaire aurait permis une étude plus en profondeur des hydrogels formés : l'influence de la concentration en PR-(MA)_{2,4} aurait pu être plus précisément déterminée, des compressions avec des déformations plus importantes auraient pu également être appliquées pour caractériser les limites de durcissement des hydrogels à très haute déformation, ainsi que des tests en étirements qui aurait pu être réalisés pour ces mêmes concentrations. Par ailleurs, afin de réduire l'encombrement stérique autour des fonctions méthacrylate, une stratégie alternative de greffage des fonctions méthacrylates pourrait également être proposée. Plusieurs pistes supplémentaires de réflexions restent donc à explorer.

En conclusion, de tels hydrogels semblent être des matrices polymériques intéressantes et appropriées pour la production de patchs transdermiques embarquant des principes actifs (PA) encapsulés dans des nano-particules lipidiques. La formulation de ces dernières, leur développement, et la caractérisation de leur comportement de diffusion à travers la peau, sont décrits dans le chapitre 4. Deux molécules d'intérêt (le thymol et la nicotine) ont été choisis pour être encapsulées dans ces nano-vecteurs.

3.4. Références

- [1] X. Chen, *Small Methods* **2017**, *1*, 1600029.
- [2] J. Di, S. Yao, Y. Ye, Z. Cui, J. Yu, T. K. Ghosh, Y. Zhu, Z. Gu, *ACS Nano* **2015**, *9*, 9407–9415.
- [3] J. Li, H. Liu, C. Wang, G. Huang, *RSC Adv.* **2017**, *7*, 35311–35319.
- [4] E. Hachet, H. Van Den Berghe, E. Bayma, M. R. Block, R. Auzély-Velty, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 1818–1827.
- [5] G. M. Kavanagh, S. B. Ross-Murphy, *Progress in Polymer Science* **1998**, *23*, 533–562.
- [6] T. Sakai, H. Murayama, S. Nagano, Y. Takeoka, M. Kidowaki, K. Ito, T. Seki, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 2023–2025.
- [7] K. Ito, *Polym J* **2007**, *39*, 489–499.
- [8] Y. Okumura, K. Ito, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 485–487.
- [9] M. Mooney, *Journal of Applied Physics* **1940**, *11*, 582–592.
- [10] R. S. Rivlin, D. W. Saunders, E. N. D. C. Andrade, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* **1951**, *243*, 251–288.
- [11] W.-C. Lin, W. Fan, A. Marcellan, D. Hourdet, C. Creton, *Macromolecules* **2010**, *43*, 2554–2563.
- [12] N. Murata, A. Konda, K. Urayama, T. Takigawa, M. Kidowaki, K. Ito, *Macromolecules* **2009**, *42*, 8485–8491.
- [13] O. Miyashita, J. N. Onuchic, P. G. Wolynes, *PNAS* **2003**, *100*, 12570–12575.
- [14] C. Storm, J. J. Pastore, F. C. MacKintosh, T. C. Lubensky, P. A. Janmey, *Nature* **2005**, *435*, 191–194.
- [15] M. L. Gardel, J. H. Shin, F. C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira, D. A. Weitz, *Science* **2004**, *304*, 1301–1305.
- [16] J. Gosline, M. Lillie, E. Carrington, P. Guerette, C. Ortlepp, K. Savage, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2002**, *357*, 121–132.
- [17] C. M. Elvin, A. G. Carr, M. G. Huson, J. M. Maxwell, R. D. Pearson, T. Vuocolo, N. E. Liyou, D. C. C. Wong, D. J. Merritt, N. E. Dixon, *Nature* **2005**, *437*, 999–1002.

Chapitre 4 : Les particules lipidiques nano-structurées pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes

Chapitre 4 : Les particules lipidiques nano-structurées pour l'encapsulation de principes actifs hydrophobes	139
4.1 Contexte.....	141
4.1.1 Objectifs.....	141
4.1.2. Approche.....	143
4.2. Particules lipidiques nano-structurées encapsulant de la nicotine (NLC-Nic).....	145
4.2.1 Intérêt de l'encapsulation de la nicotine dans des nanovecteurs	145
4.2.2 Stratégie d'encapsulation de la nicotine dans les NLC : formation de complexe ionique.....	146
4.2.3 Synthèse des NLC-Nic	148
4.2.4 Caractérisation des NLC-Nic	151
4.2.5 Diffusion des NLC-Nic à travers de la peau de porc	153
4.2.6 Discussion des résultats obtenus sur les NLC-Nic	156
4.3. Particules lipidiques nano-structurées encapsulant du thymol (NLC_Thymol) : Stable aqueous nanoformulation of thyme essential oil and its transdermal diffusion properties (article).....	159
4.4 Conclusion.....	183
Références	183

4.1 Contexte

4.1.1 Objectifs

Comme il a été rappelé dans le chapitre 1, le dispositif idéal de patch transdermique délivrant un traitement anti-inflammatoire doit présenter, notamment, les propriétés suivantes : il doit être biocompatible pour une application répétée sur la peau, posséder des propriétés mécaniques adaptées pour son utilisation sur une articulation en mouvement, assurer la stabilité du principe actif (PA) en permettant la libération de façon précise. Il est difficile de réunir toutes ces conditions au sein d'un seul dispositif. En effet, il faut pour cela être capable d'intervenir simultanément sur les propriétés physico-chimiques moléculaires (pour contrôler la libération et assurer la stabilité du PA) ainsi qu'au niveau macroscopique de la matrice hydrogel. L'intérêt des systèmes de double encapsulation associant des nanovecteurs encapsulant le PA à une matrice hydrogel a été détaillé dans la revue du chapitre 1 ^[1]. La combinaison de ces deux systèmes distincts mais remarquablement complémentaires, permet de modifier les propriétés du dispositif à ces deux échelles. Le cœur lipidique des nanovecteurs assure une stabilité optimale pour les PA hydrophobes, tandis que la matrice hydrogel permet d'adapter les propriétés mécaniques à l'application visée. L'association des deux permet d'ajouter un niveau supplémentaire de contrôle sur la libération du principe actif, avec deux barrières aux propriétés physico-chimiques différentes à franchir pour le PA avant d'atteindre la peau.

Ce chapitre se concentre principalement sur la synthèse et la caractérisation de nanovecteurs lipidiques embarquant des principes hydrophobes, pour une future inclusion dans la matrice hydrogel. Les nanoparticules lipidiques sont des vecteurs de choix pour les principes actifs hydrophobes pour plusieurs raisons. Constituées de composants approuvés par la FDA ^[2], elles sont également biocompatibles pour une application dermique et transdermique ^[3]. De plus, leur production est aisée, que ce soit à l'échelle du laboratoire ou dans le but de produire de plus gros volumes. Parmi les nanoparticules lipidiques, les particules lipidiques nanostructurées (« NLC » pour « Nanostructured Lipid Carriers » -Chapitre 1, 1.2.2, Figure 1.4-) sont d'excellents candidats dans ce rôle de vecteur car elles permettent d'encapsuler de grandes quantités de principe actif dans leur cœur lipophile. Elles constituent la dernière génération de nanovecteurs lipophiles ^[4]. Leur cœur lipidique est un mélange amorphe de

lipides solides (cire) et liquides (huile), améliorant ainsi la stabilité structurelle des particules sur le long terme (pas de cristallisation et de démixtion des composants) et laissant plus d'espace pour le stockage du principe actif hydrophobe [5]. Enfin, La membrane hydrophile de la particule permet la stabilité des NLC dans la matrice hydrogel.

Deux molécules d'intérêt ont été particulièrement étudiées dans cette thèse :

- 1) **La nicotine** (Nic, Figure 4.1) : Avec l'objectif futur de mettre en place des tests de diffusion passive à travers la peau, nous nous sommes intéressés à cette molécule amphiphile car ses propriétés de bonne pénétration à travers la peau sont bien établies [6]. Ainsi, cette molécule constitue un bon modèle pour étudier la modulation du passage de la barrière transdermique apportée par l'encapsulation dans les NLC. L'encapsulation de la nicotine dans des particules lipidiques n'a été rapportée qu'une unique fois dans la littérature à ce jour, sûrement à cause de son caractère amphiphile [7]. Son hydrophilie relative rend son encapsulation dans le cœur des particules lipidiques moins stable, la nicotine ayant tendance à migrer vers la membrane – plus exposée au milieu extérieur. C'est toutefois le caractère amphiphile de la molécule qui lui confère une pénétration très efficace à travers la peau et en fait un candidat particulièrement intéressant pour l'administration par voie transdermique. L'encapsulation de la nicotine dans les NLC nous permettrait d'atteindre deux objectifs : 1) l'obtention d'un nanovecteur modèle pour étudier la diffusion à travers la peau nous permettant de mieux comprendre les propriétés du système hydrogel/NLC ; 2) l'obtention d'un dispositif de délivrance de la nicotine avec un relargage durable et contrôlé au potentiel commercial intéressant.

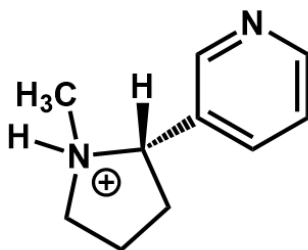


Figure 4.1. Structure chimique de la Nicotine

- 2) **Le thymol** (TH, Figure 4.2) : *Thymus Vulgaris* est utilisée traditionnellement dans le bassin méditerranéen comme plante aromatique, mais aussi comme conservateur

naturel et plante médicinale [8]. Son huile essentielle, obtenue par distillation, est principalement constituée de terpenes, dont le thymol [8-10]. Leur prédominance les uns par rapport aux autres dans la composition totale de l'huile essentielle varie énormément (Figure 4.2) –on dénombre au moins 13 chémotypes différents pour cette huile essentielle [11]- et dépend de la localisation de la plante. Le thymol, composé majoritaire du chémotype le plus commun, possède des propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes intéressantes [9]. De plus, il présente deux autres avantages pour son administration par la voie transdermique sous forme de NLC telles que souhaitée dans ce travail: 1) il est parfois utilisé comme agent améliorant la pénétration d'autres molécules actives à travers la peau [12] ; 2) L'huile essentielle de thym peut être utilisée comme principal lipide liquide dans la composition des NLC. Il est donc plus aisé d'encapsuler des quantités importantes de thymol de façon stable dans la formulation des nanoparticules.

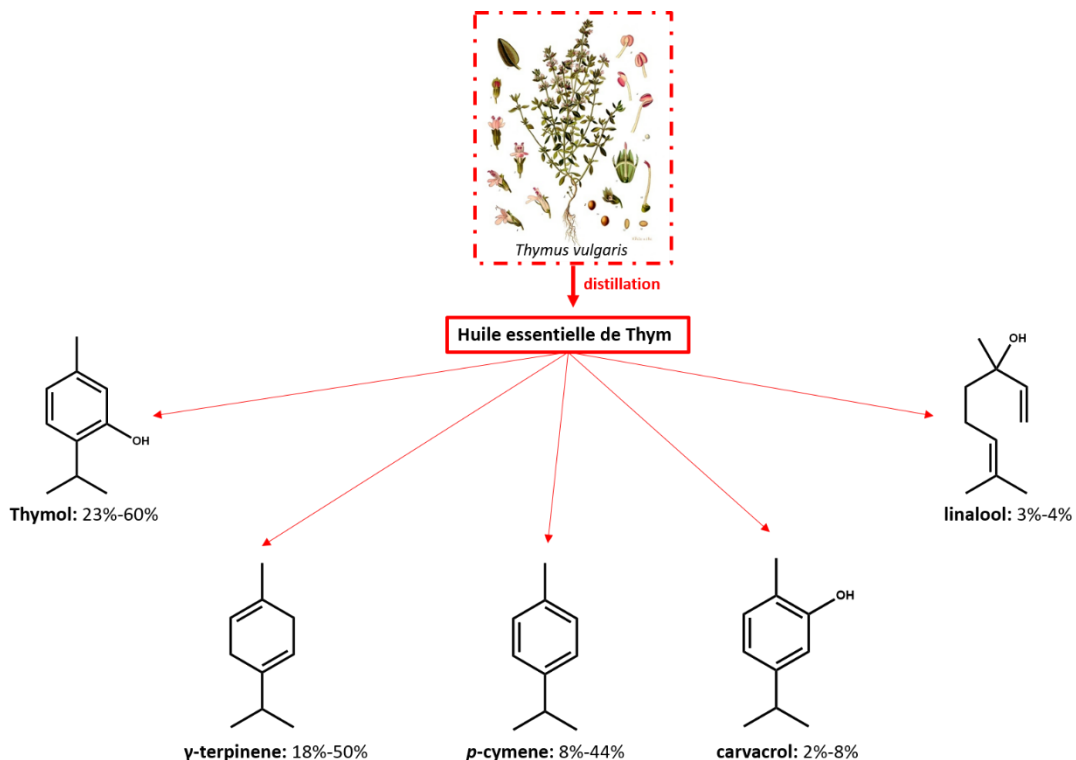


Figure 4.2. Principaux constituants de l'huile essentielle de thym. Les pourcentages indiqués dépendent des chémotypes.

4.1.2. Approche

Les NLC « classiques » développées au CEA sont composées d'un cœur lipidique (75% huile de soja (lipide liquide), 25% Suppocire™ NC (lipides solides)) et d'une membrane constituée de

phospholipides (lécithine de soja, lipoid™ s75) et d'un surfactant PEGylé, le Myrj s40™ (dont la chaîne polyéthylène glycol comporte 40 motifs) (Figure 4.3).

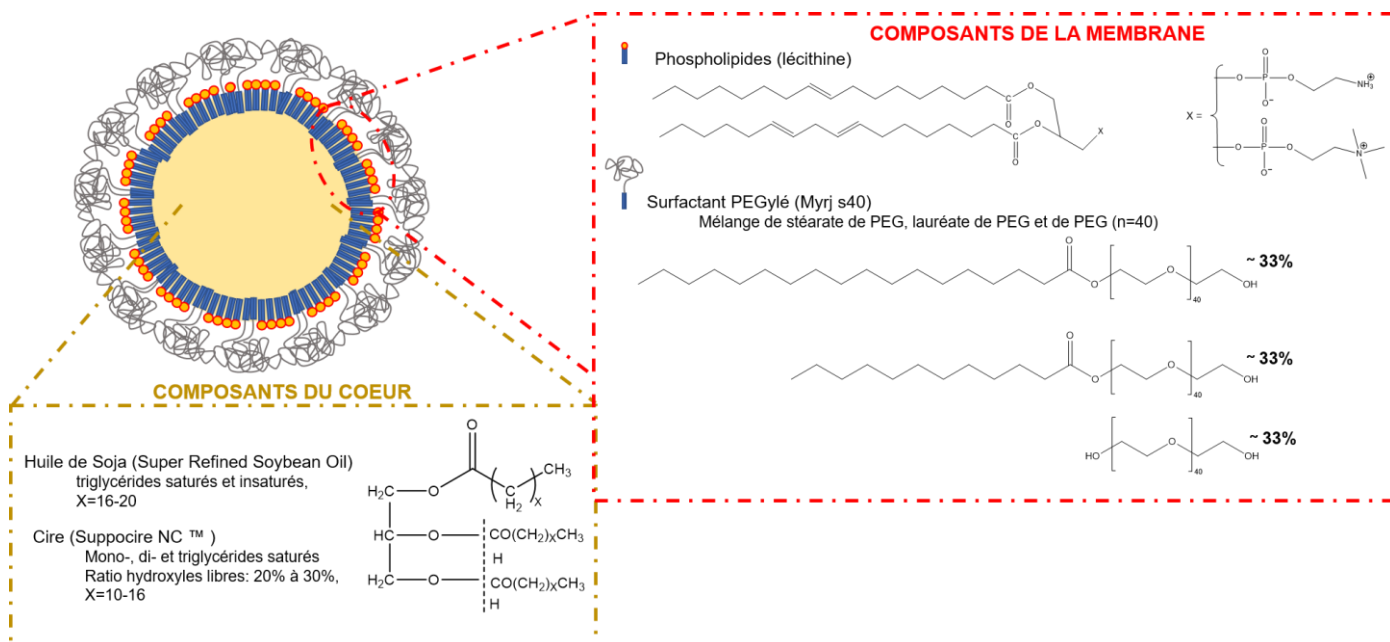


Figure 4.3. Composition des particules lipidiques nano-structurées (NLC) développées au CEA [13]

Comme pour d'autres applications déjà précédemment explorées par l'équipe du CEA (imagerie de fluorescence ou nucléaire, délivrance de SiRNA ou développements de formulations vaccinales [14–19]), la composition « classique » des NLC a ici été revisitée pour optimiser des formulations présentant des quantités encapsulées maximales pour la nicotine comme pour le thymol, tout en préservant les excellentes propriétés de stabilité colloïdale, point fort de la technologie développée par l'équipe :

- 1) Pour améliorer la stabilité et l'efficacité d'encapsulation de la nicotine dans les nanoparticules, un complexe ionique avec de l'acide laurique a été utilisé, explicité figure 4.5. Les NLC_Nic ainsi obtenues ont été caractérisées par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et étudiées par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC). Les résultats sont présentés dans la partie suivante.
- 2) Les nanoparticules lipidiques embarquant du thymol ont déjà fait l'objet d'études préalables au CEA lors d'un stage de Master 2 [20]. Pour augmenter la quantité de

thymol encapsulée, l'huile essentielle de thym avait été substituée à l'huile de soja dans la constitution du cœur des NLC. Ce travail préliminaire a été repris pour obtenir des formulations de NLC_thymol optimisées et complètement caractérisées par DLS et HPLC.

4.2. Particules lipidiques nano-structurées encapsulant de la nicotine (NLC-Nic)

4.2.1 Intérêt de l'encapsulation de la nicotine dans des nanovecteurs

La nicotine est une molécule connue pour sa facilité à pénétrer dans l'organisme à travers la peau, pour être ensuite rapidement métabolisée. Sa petite taille (162 g/mol), sa solubilité et son coefficient de partition équilibré ($\log P = 0,16$ à $\text{pH}=7$ ^[21]), ainsi que sa capacité à emprunter simultanément les voies transcellulaires et intercellulaires pour franchir le stratum corneum ont rapidement été exploités pour l'utiliser dans les traitements contre le tabagisme ^[22]. En 2016, 77% des dispositifs disponibles sur le marché proposaient une délivrance rapide de la nicotine grâce à des systèmes de chewing-gum (54%), de pastilles (19%) ou de sprays, inhalateurs et autres méthodes alternatives (4%). Les principaux effets secondaires liés à l'utilisation de ces systèmes sont des irritations du nez et de la gorge, des nausées, le hoquet et un goût désagréable en bouche. Les patchs transdermiques, à la délivrance lente et prolongée, ne représentaient alors que 23% des traitements à base de nicotine disponibles commercialement ^[7]. Dans leur format actuel, ils sont conçus pour délivrer entre 5 mg et 52.5 mg de nicotine, sur une période de quelques heures à 24 heures ^[23]. Leur structure est celle d'une matrice polymère embarquant la quantité déterminée de nicotine comme couche principale du patch. Deux couches supplémentaires, de protection à l'extérieure, et de libération en contact avec la peau, entourent cette couche principale ^[24]. La dose maximale habituelle, qui permet d'atteindre une concentration dans le plasma sanguin comparable à celle d'un fumeur très fréquent, est de 15 mg pour 16 heures d'application, ou 21 mg pour 24 heures d'application ^[25].

L'apparente facilité de la nicotine à franchir la barrière de la peau et les muqueuses devient une contrainte à partir du moment où l'on souhaite privilégier une délivrance continue de la molécule sur un temps prolongé. L'enjeu est alors de parvenir à ralentir et contrôler la pénétration de la nicotine à travers la peau avec deux objectifs : le premier est de prolonger la durée d'utilisation des patchs de nicotine à délivrance transdermique et ainsi, de diminuer le nombre de patchs utilisés quotidiennement et d'augmenter le confort du patient ; le second

est de réduire le risque d'irritation cutanée causée sur la peau par l'exposition brusque à une haute concentration en PA. La solution explorée au cours de ce travail est la double encapsulation de la nicotine au sein de particules lipidiques nano-structurées, elles-mêmes incluses dans la matrice hydrogel.

Par ailleurs, comme il a été mentionné ci-dessus, les NLC comprenant de la nicotine constituent également des particules « modèles ». Le comportement de diffusion de la nicotine à travers la peau étant connu, l'influence des particules nano-structurées sur la capacité de franchissement des barrières de la peau par la molécule active encapsulée serait ainsi plus facilement déterminée.

4.2.2 Stratégie d'encapsulation de la nicotine dans les NLC : formation de complexe ionique

L'encapsulation de principes actifs dans les NLC n'est pas toujours aisée, surtout lorsque la molécule ciblée est amphiphile comme c'est le cas de la nicotine. La molécule présente un comportement pH-dépendant en solution aqueuse, oscillant entre hydrophilie et lipophilie. A pH = 3, 7 et 9, la nicotine présente des valeurs de log P = -1,60, 0,16 et 1,25 respectivement [21]. (Figure 4.4).

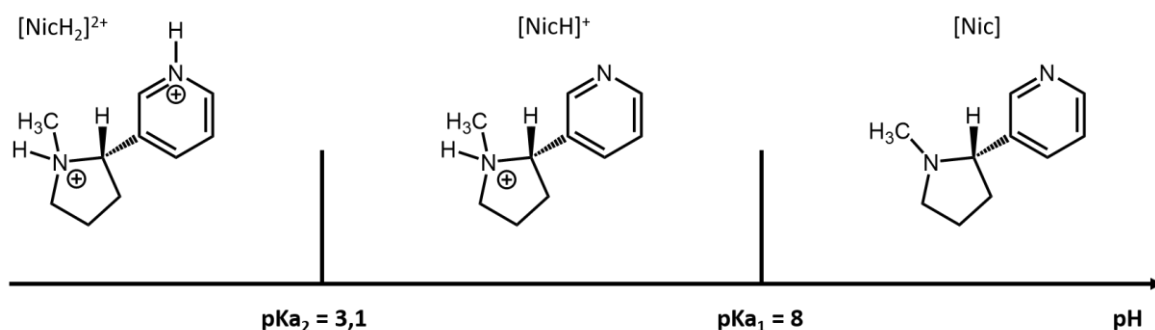


Figure 4.4. Formes acido-basiques de la nicotine et leurs pka respectifs

A pH physiologique, 69% de la molécule est sous forme ionisée $[NicH]^+$ [21] comme détaillé sur la Figure 4.4 et ne pourra donc pas se solubiliser facilement dans le cœur lipophile des NLC. Il est donc probable que la nicotine se partitionne entre le cœur des NLC et leur membrane. Au niveau de la membrane, la molécule ionisée devrait très vite diffuser dans la phase aqueuse. Cette diffusion rapide serait alors à l'origine d'un effet de relargage brutal de la molécule active, allant à l'encontre de notre objectif initial d'obtenir une libération de la nicotine contrôlée et constante sur le long terme. Notre stratégie, adaptée des nanoparticules lipidiques solides embarquant de la nicotine (solid lipid nanoparticles, « SLN ») de Ding et al.

^[7], est donc d'adapter le pH de la solution aqueuse lors de la formulation des nanoparticules et de former un complexe ionique entre la nicotine et un acide gras, soluble dans le cœur lipophile des NLC. Cet acide gras jouera ainsi pour la nicotine le rôle d'ancre dans le cœur lipophile des nanoparticules.

Plusieurs conditions de synthèse ont été testées pour optimiser au mieux le pourcentage d'encapsulation de la nicotine. Ces tests nous ont permis d'identifier deux points clefs du protocole :

- L'acide laurique (C₁₂, pKa = 5,3, Figure 4.5) a été préféré à l'acide stéarique (choisi par Ding ^[7] et ses collaborateurs), pour ses longueur de chaînes glycérides comparables à celle de la Suppocire™ NC (C₁₀-C₁₈).
- La phase aqueuse a été remplacée par un tampon à pH=8,5 pour déplacer l'équilibre acido-basique de la nicotine vers la forme non chargée de la molécule.

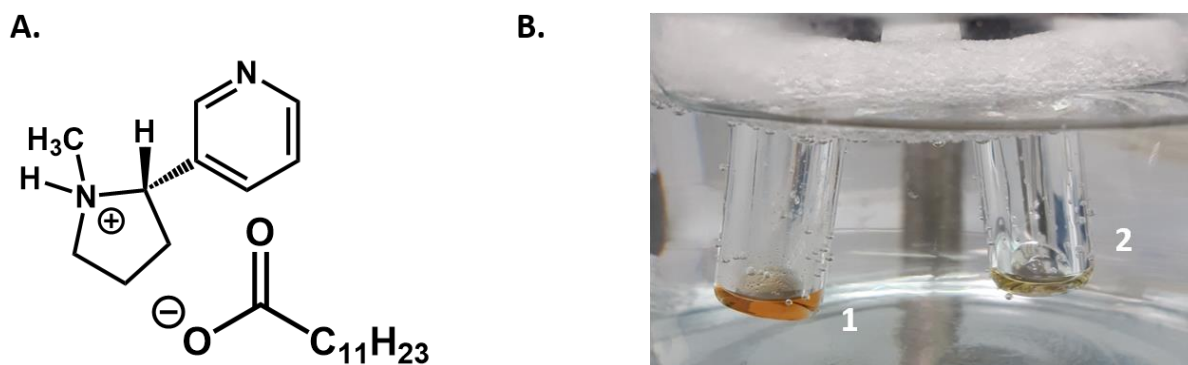


Figure 4.5. **A.** Complexe ionique formé par la nicotine et l'acide laurique. **B.** Photo du complexe ionique formé (1) et de la nicotine (2) à 75°C.

Les deux constituants du complexe ionique (la nicotine et l'acide laurique) sont introduits en quantités équimolaires et placés à 75°C (température de formation du complexe ionique). La vérification de la formation du complexe est visuelle, avec l'apparition d'une couleur rouge-orangée qui contraste avec la couleur jaunâtre de la nicotine seule à la même température (Figure 4.5.B).

Le protocole complet de synthèse des particules nano-structurées encapsulant de la nicotine est détaillé dans la partie suivante et dans la partie expérimentale (chapitre 5).

4.2.3 Synthèse des NLC-Nic

Les NLC-Nic ont été synthétisées suivant un mode opératoire adapté du protocole standard développé depuis plusieurs années au CEA-Leti ^[26]. Succinctement, le protocole standard est le suivant. La molécule active qui doit être encapsulée est dissoute dans la phase lipidique, avec la Suppocire™ NC, l'huile de Soja et les phospholipides, à une température supérieure à celle de fusion des lipides (50°C). Le Myrj™ s40 est dissout dans la phase aqueuse à 50°C. Les deux phases sont réunies, agitées et l'échantillon est passé aux ultrasons. Les particules ainsi formées sont ensuite dialysées avec une membrane à 12-14 kDa, filtrées et caractérisées par diffusion dynamique de la lumière et études HPLC.

Dans le cas de l'encapsulation de la nicotine, une phase de recherche a d'abord été nécessaire pour déterminer quelles étaient les modifications les plus judicieuses à apporter au protocole standard.

Tableau 4.1 : Composition d'une formulation de NLC-Nic à 36,5 g/L après phase d'optimisation

Phase lipidique					Phase aqueuse		
Suppocire NC™	Huile de Soja	Lipoïd s75	Acide Laurique	Nicotine	Tampon TAE	Acide Laurique	Myrj™ S40
<i>Lipide solide</i>	<i>Lipide liquide</i>	<i>phospholipides</i>	<i>Complexe ionique</i>	<i>Molécule active</i>	<i>Solvant phase aqueuse</i>	/	<i>Surfactant hydrophile</i>
85 mg	255 mg	65 mg	9,3 mg (1:1 /nicotine)	7,5 mg	3070 µL	Phase aqueuse saturée (105 mg)	345 mg

Complexe ionique et optimisation de la phase aqueuse

Un tampon Tris-acetate-EDTA (« Tampon TAE », pH=8,5) a été utilisé en remplacement de l'eau miliQ (pH=6,5) pour la phase aqueuse. A ce pH, la nicotine est majoritairement sous forme non chargée (voir Figure 4.4). Toutefois avec un deuxième pKa à 8, une proportion non

négligeable de la nicotine est toujours sous la forme $[\text{NicH}]^+$. C'est cette forme ionisée qui est captée par le complexe ionique avec l'acide gras. Comme il a été décrit dans la partie précédente, ce complexe ionique entre la nicotine et un acide gras a été utilisé pour ancrer la molécule active dans les NLC (Figure 4.5). Deux acides gras ont été testés, l'acide stéarique (longueur de chaîne des glycérides : C_{18} , Figure 4.6.) et l'acide laurique (longueur de chaîne des glycérides : C_{12} , Figure 4.6.). Cependant, les particules nano-structurées synthétisées avec le complexe ionique acide stéarique-nicotine étaient moins stables, expulsant un précipité blanc lors de l'étape de la dialyse. Leur efficacité d'encapsulation était finalement négligeable. Une alternative a été recherchée pour obtenir un mélange de lipides avec des longueurs de chaînes de glycérides plus homogènes. Pour s'adapter à la longueur de chaîne de l'acide stéarique (C_{18}), le Precirol™ (C_{16-18}) a été testé en remplacement de la Suppocire NC™ (C_{10-16}). Inversement, l'acide gras initial (l'acide stéarique) a également été changé pour l'acide laurique (C_{12}), tout en gardant la composition lipidique de base (Figure 4.6 et Tableau 4.2). C'est finalement l'acide laurique qui a été retenu, avec des efficacités d'encapsulation bien plus intéressantes (Tableau 4.2). Pour assurer la stabilité de l'acide laurique au sein des NLC et éviter le transfert de la nicotine chargée dans la phase aqueuse (solution tampon TAE, $\text{pH}=8,5$), la phase aqueuse a également été saturée en laurate. La phase aqueuse et la phase huileuse, préparées séparément et dont la composition exacte est détaillée dans le tableau 4.1 ci-dessus sont rassemblées juste avant le passage aux ultrasons.

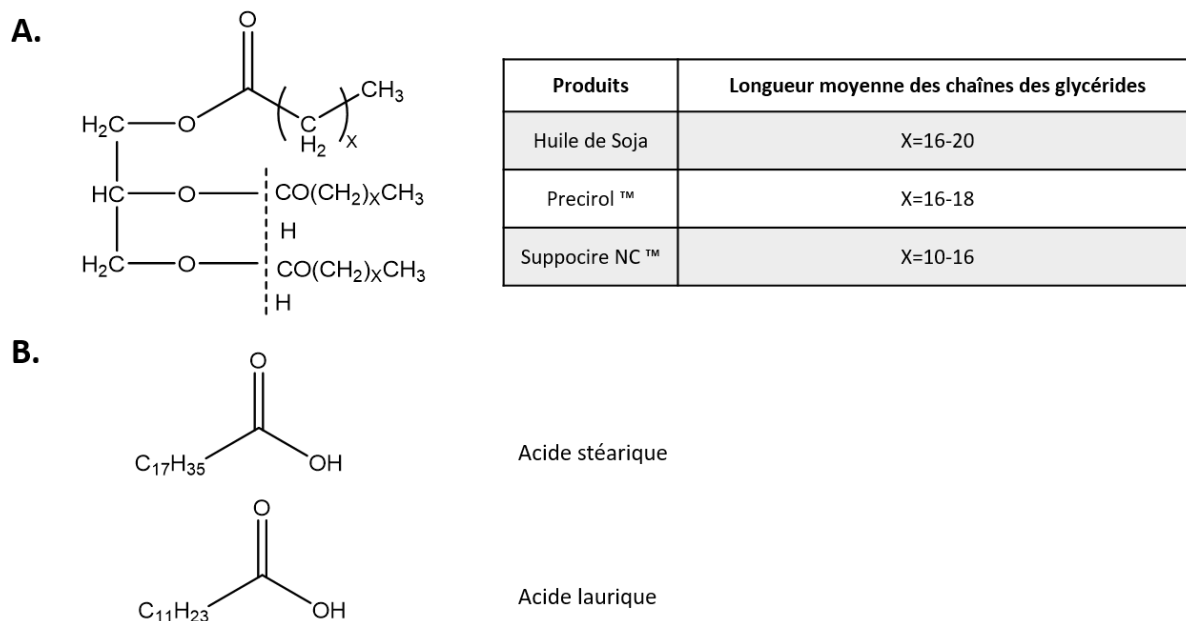


Figure 4.6. Structures chimiques des : **A.** glycérides des lipides des particules nano-structurées et **B.** des acides gras utilisés pour former le complexe ionique avec la nicotine.

Tableau 4.2 : Récapitulatif des différents tests de composition de NLC-Nic

Entrées	Couple de lipides	Acide gras	Molécule active	Ratio (moles)	Solvant de la phase aqueuse	Résultat
1	Suppocire NC™ & Huile de Soja	Acide stéarique	Nicotine	1:1	Eau miliQ (pH=6,5)	Précipité blanc EE% \approx 0
2	Suppocire NC™ & Huile de Soja	Acide stéarique	Nicotine	1:1	Tampon TAE (pH=8,5)	EE% \approx 0
3	Precirol™ & Huile de Soja	Acide stéarique	Nicotine	1:1	Tampon TAE (pH=8,5)	EE% \approx 0
4	Suppocire NC™ & Huile de Soja	Acide Laurique	Nicotine	1:1	Tampon TAE (pH=8,5)	EE% _{dialyse} = 10% EE% _{Amicon} = 67% EE% _{Amicon J7} = 59%

Etape de purification

La purification classique des nanoparticules lipidiques est la dialyse contre de l'eau miliQ (ou tout autre tampon biologique approprié). Elle permet d'obtenir un échantillon de nanoparticules mono disperses ($PDI < 0,2$). Toutefois, dans ce cas des NLC-Nic, cette technique est inapplicable car la nicotine est immédiatement évacuée des nanoparticules après dialyse dans une phase aqueuse. La technique de purification alternative proposée, qui est également celle de Ding et al. [7], est une centrifugation sur filtre Amicon avec un seuil de coupure de 3 kDa, permettant ainsi de séparer la nicotine libre de la nicotine toujours emprisonnée dans les particules avant dosage par spectrométrie UV-Visible dans l'acétonitrile et autres caractérisations.

4.2.4 Caractérisation des NLC-Nic

Pour assurer une pénétration optimale à travers la peau, la taille des NLC produites est un paramètre important. En milieu peu concentré et avec l'hypothèse qu'elles présentent une forme sphérique, la diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet de donner une indication fiable sur le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules. A la fin de l'étape de purification par centrifugation sur filtre Amicon, le diamètre moyen des NLC-Nic est de $38,1 \pm 0,5$ nm, avec un indice de polydispersité de 0,150. Les particules nano-structurées ainsi obtenues sont légèrement plus petites que les nanoparticules « standard » développées dans l'équipe du CEA (avec une taille visée de 50 nm) et mono disperses.

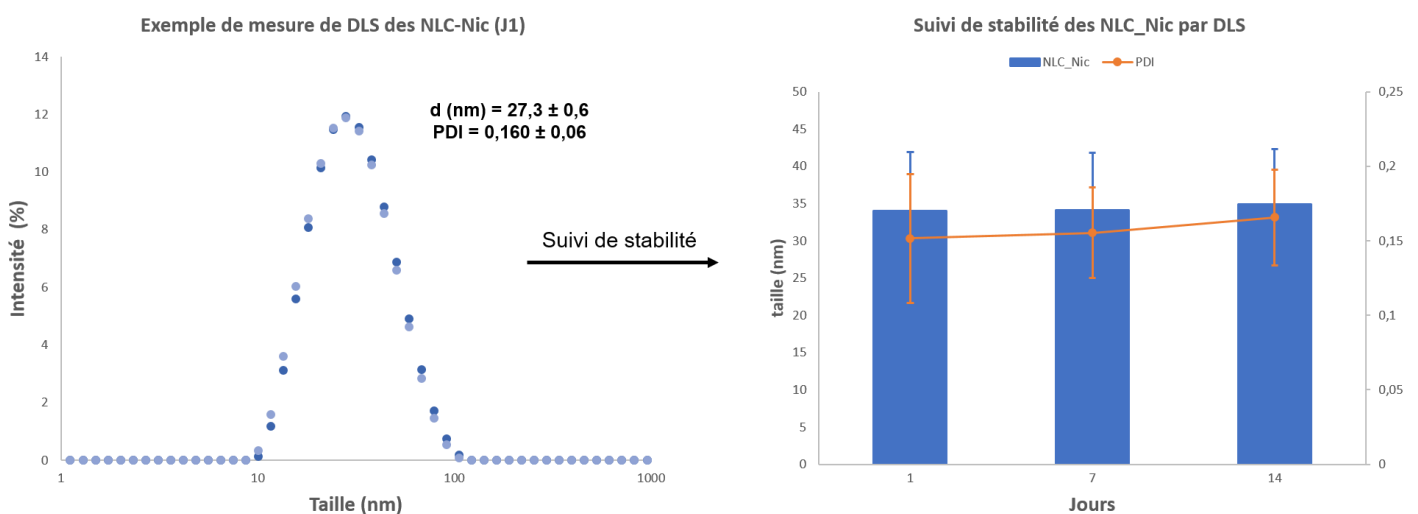


Figure 4.7. Suivi de stabilité colloïdale des NLC_Nic

Pour analyser le contenu en nicotine des formulations de NLC, la nicotine libre en solution est séparée de celle contenue dans les NLC par centrifugation sur filtres Amicon (4000 rpm, 40 min, 3 kDa). Le filtrat est dilué dans l'acétonitrile et analysé au spectrophotomètre UV-Vis. Au moyen de courbes de calibration préalablement établies, la nicotine libre en solution est donc quantifiée ($C_{\text{nicotine libre}}$, protocole détaillé dans le chapitre 5). En faisant l'hypothèse que l'intégralité de la nicotine libre est récupérée lors de la centrifugation sur filtres Amicon, on peut ainsi en déduire indirectement l'efficacité d'encapsulation des NLC-Nic, grâce à l'équation suivante :

$$EE\% = \frac{C_{\text{théo nicotine}} - C_{\text{nicotine libre}}}{C_{\text{théo nicotine}}} \times 100$$

Ainsi, il a été quantifié que les NLC-Nic produites ont une efficacité d'encapsulation de 62% juste après synthèse (Figure 4.8). Elles sont donc capables d'embarquer en nicotine l'équivalent de 0,6 % de leur poids total, soit 6 mg de nicotine pour 1 g de lipides.

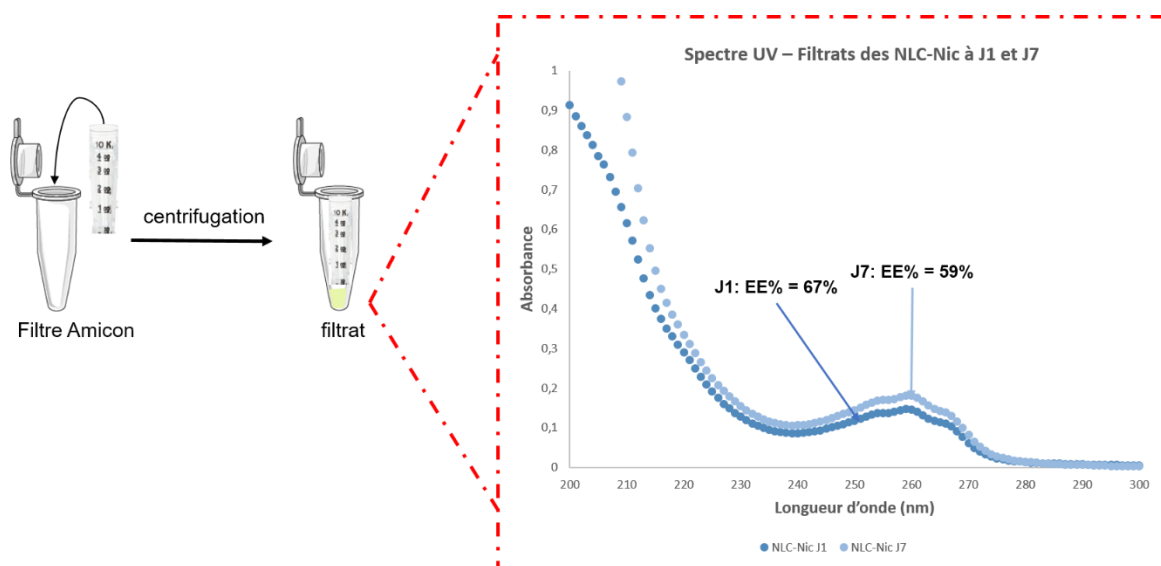


Figure 4.8. Suivi de stabilité l'efficacité d'encapsulation des NLC_Nic.

La stabilité des NLC-Nic en dispersion dans un tampon Tris-acetate-EDTA (« Tampon TAE », pH=8,5) au cours du temps a également été évaluée sur une première durée d'une semaine, pour un test préliminaire. Deux volets ont été évalués : la stabilité colloïdale par DLS et la stabilité d'encapsulation de la nicotine par absorption UV, comme précédemment décrits (figure 4.7, figure 4.8).

Après une semaine de stockage à 4°C, et après séparation de la nicotine libre en solution de celle encapsulée dans les NLC par centrifugation sur filtres Amicon, l'efficacité d'encapsulation a diminué de 8%. La valeur reste toutefois dans l'intervalle de valeurs acceptables. Cette étude préliminaire de stabilité donne donc des résultats intéressants, qui mériteraient d'être approfondis par un suivi de stabilité sur plus long terme.

4.2.5 Diffusion des NLC-Nic à travers de la peau de porc

Les particules nano-structurées ainsi synthétisées ont ensuite été utilisées dans des tests de diffusion passive réalisés à travers la peau d'oreilles de porc sur cellules de Franz (figure 4.9). Ces échantillons de tissus ont été choisis pour la ressemblance –en termes d'épaisseur et de composition- des différentes épaisseurs de la peau avec la peau humaine. Le dispositif expérimental permet ainsi de mesurer la concentration en molécule active (ici, la nicotine) dans les différentes couches de la peau (stratum corneum, épiderme, derme) et dans le compartiment de réception de la cellule –simulant alors le franchissement total de la molécule à travers la peau. Ces tests ont été réalisés grâce à l'encadrement du Dr. Renata Fonseca Vianna Lopez au "Center for Innovation in Nanostructured Systems and Topical Administration" de la faculté des Sciences Pharmaceutiques de Ribeirão Preto, Université de São Paulo au Brésil lors d'un séjour d'un mois en novembre 2018.

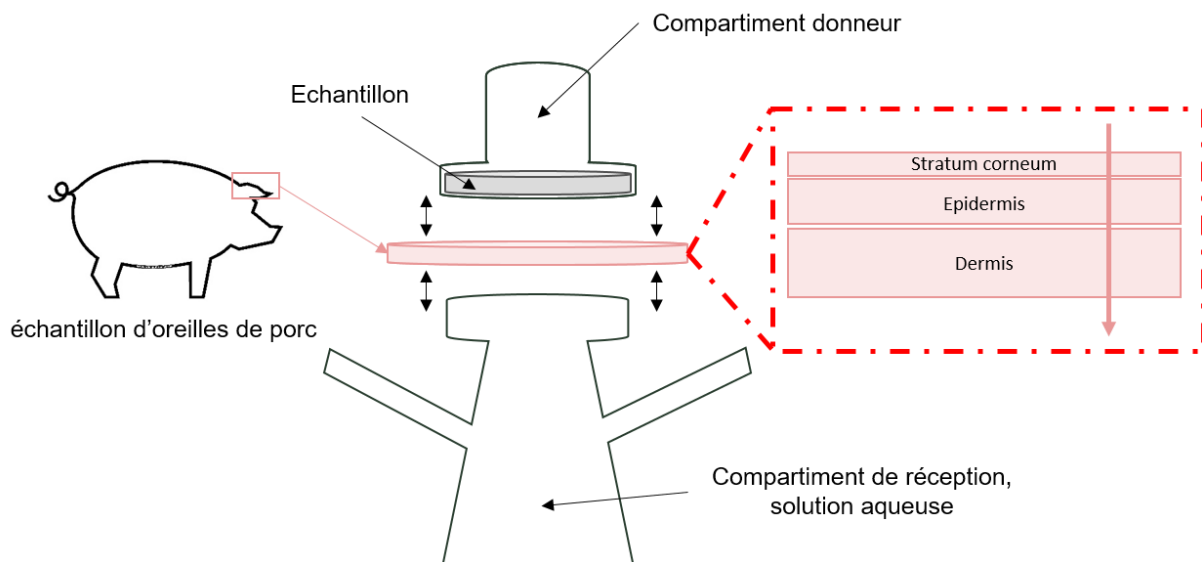


Figure 4.9. Dispositif expérimental pour les tests de diffusion passive sur cellules de Franz.

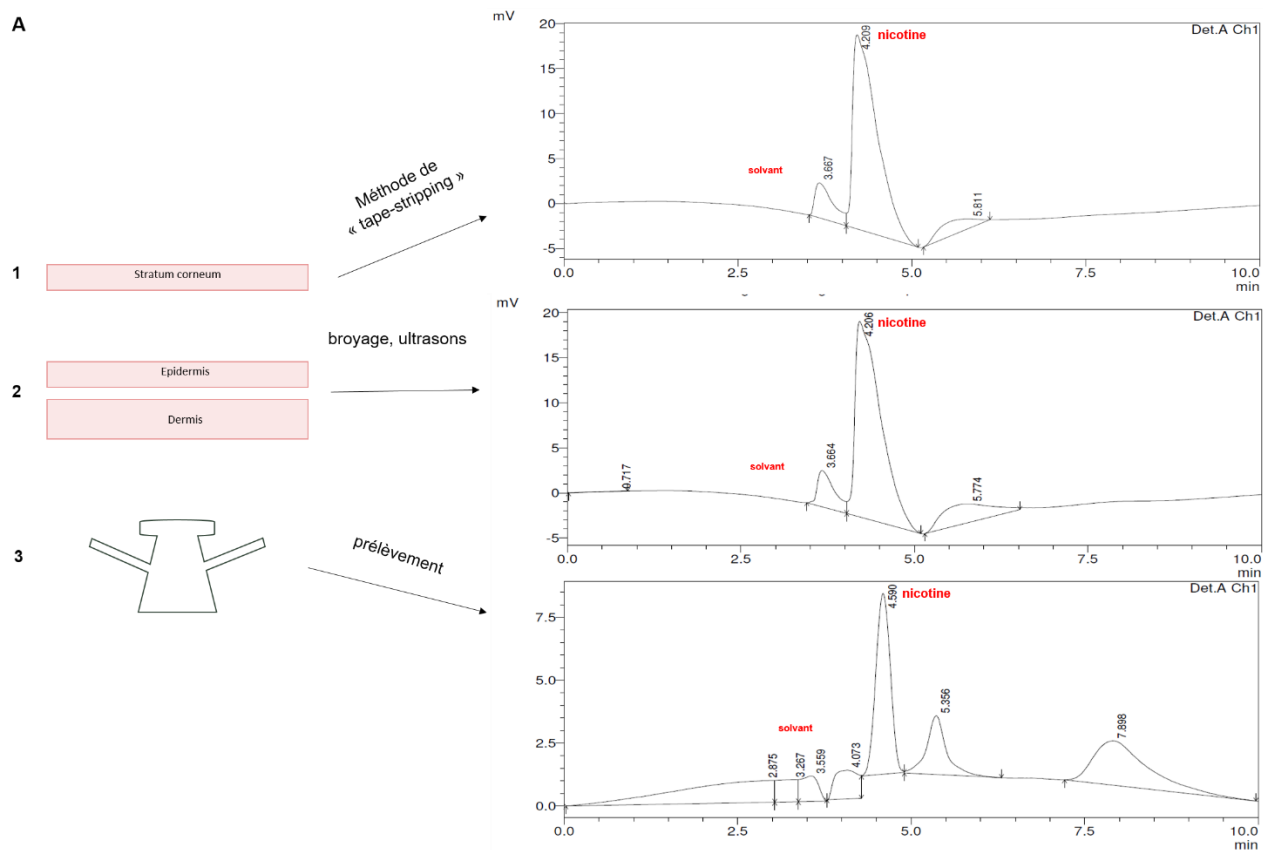
Méthodes expérimentales

Un échantillon de particules nano-structurées encapsulant de la nicotine (à 2,1 g/L, tampon Tris-acetate-EDTA à pH=8.5) a été comparé à de la nicotine pure dispersée dans un gel de chitosan à une concentration similaire (2,3 g/L, 4% en masse dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1% en masse). Après 16h de diffusion passive à travers la peau d'oreille de porc, le stratum corneum a été isolé par la technique standard du « tape stripping » alors que l'ensemble épiderme-derme a également été traité séparément. La concentration en nicotine dans le stratum corneum, dans l'ensemble épiderme-derme et dans le compartiment de réception des cellules de Franz a été mesurée par HPLC (Figure 4.10, **A**). Chaque formulation a été testée sur 6 cellules de Franz différentes en simultanément. Une solution de particules nano-structurées vides a également été testée sur 3 cellules de Franz, pour comparaison lors des analyses HPLC.

L'intégrité de chaque échantillon de peau dermatomée d'oreille de porc a été vérifiée avant chaque test, grâce à la mesure de la résistivité de l'échantillon. Seuls les échantillons présentant une résistivité supérieure à 12 kΩ.cm² [27] pour une tension alternative efficace initiale de 100 mV à 10 Hz ont été utilisés pour la suite des mesures. Le protocole complet est détaillé dans le chapitre 5.

Résultats

Grâce aux analyses quantitatives par chromatographie liquide et par comparaison avec la formulation de contrôle (chitosan – nicotine), le comportement de diffusion de la nicotine encapsulée dans les NLC à travers les différentes couches de la peau a pu être caractérisé comme détaillé sur la Figure 4.10. **B & C**. Après 16 heures de diffusion passive, la répartition de la nicotine entre les différentes épaisseurs (stratum corneum -1-, l'ensemble épiderme + derme -2- et le compartiment de réception -3) est similaire pour les deux formulations. Une grande majorité de la nicotine est capable de complètement traverser le stratum corneum, l'épiderme puis le derme. En effet, avec les deux formulations, plus de 50% de la nicotine initialement mise en contact a traversé entièrement la peau et est détectée dans le compartiment de réception de la cellule de Franz. Toutefois, la proportion par rapport à la masse initiale de nicotine mise en contact avec les échantillons y est plus grande lorsque la molécule était encapsulée dans les NLC-Nic (87% contre 54% pour la formulation chitosan-nicotine).



B

Echantillons	% W _{nicotine initiale}
Stratum Corneum NLC-Nic	11,6 ± 2
Epiderme + Derme NLC-Nic	22,4 ± 5
Compartiment de réception NLC-Nic	87,2 ± 16,6
Stratum Corneum Chitosan - Nicotine	13,9 ± 0,7
Epiderme + Derme Chitosan - Nicotine	31,3 ± 3
Compartiment de réception Chitosan - Nicotine	53,6 ± 6

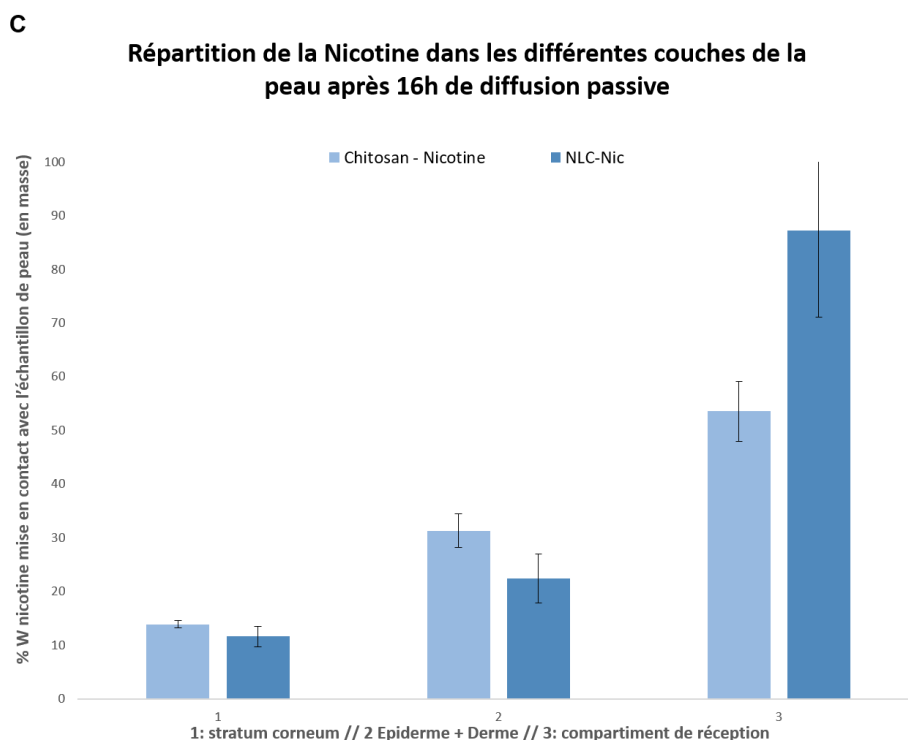


Figure 4.10. Résultats des tests de diffusion passive à travers les échantillons de peau d'oreilles de porc pour les NLC-Nic. **A** : Séparation des épaisseurs de la peau et chromatogrammes correspondants. **B & C**: Répartition de la nicotine dans les différentes couches de la peau après 16h de diffusion passive.

4.2.6 Discussion des résultats obtenus sur les NLC-Nic

Les NLC-Nic développées dans ce travail présentent des caractéristiques différentes de celles décrites dans la seule référence trouvée à ce jour encapsulant également de la nicotine. Ding et collaborateurs avaient développé des NLC mono disperses avec une taille entre 150 et 300 nm pour une efficacité d'encapsulation maximale de 60%. Cette version des NLC-Nic est également mono dispersée (PDI = 0,150) et présente une taille nettement plus petite : $38,1 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$. Avec une efficacité d'encapsulation moyenne de 62% (n=3) juste après synthèse, et une valeur maximale à 67%, les performances de nos particules sont légèrement supérieures concernant ce critère. Le choix d'un acide gras avec une longueur de chaîne de glycérides adaptée au reste de la composition lipidique a été un facteur déterminant dans cette légère augmentation du taux d'encapsulation. Après une semaine de stockage à 4°C, les NLC-Nic présentent toujours une EE% à 59%, qui reste dans un intervalle de valeurs comparables aux résultats de Ding et al. Envisagée surtout au début du projet comme un modèle de choix pour comprendre l'influence des NLC sur la pénétration transdermique des molécules actives

embarquées à l'intérieur, les particules nano-structurées encapsulant de la nicotine sont devenues un volet intéressant de ce projet de thèse, avec de nombreuses perspectives d'utilisation future.

Dans les pistes de travail futures, se trouve en priorité l'étude prolongée de la stabilité de cette formulation. Réussir à développer une formulation qui pourrait supporter la dialyse contre de l'eau milliQ serait également un plus pour garantir la pureté et l'homogénéité de l'échantillon pour une future application biologique. L'évaluation de sa stabilité colloïdale et de son efficacité d'encapsulation sur un plus long terme nous donnera des éléments pour optimiser son usage dans des systèmes de double encapsulation (avec une matrice hydrogel, par exemple).

L'effet espéré des particules nano-structurées sur la diffusion de la nicotine était de ralentir la diffusion de la nicotine à travers la peau. La traduction concrète de ce ralentissement pour l'application visée est de prolonger la durée de libération de la nicotine depuis les patches transdermiques pour le traitement contre le tabagisme afin, finalement, de réduire leur fréquence d'utilisation et de prolonger leurs effets. Il est difficile de conclure sur cet aspect sans suivi cinétique de la concentration en nicotine dans le compartiment de réception de la cellule de Franz, et sans contrôle avec la nicotine libre en solution, expériences non effectuées lors de ce test préliminaire. Ces expériences complémentaires auraient ainsi pu permettre d'établir si la répartition de la nicotine constatée après 16h était un état d'équilibre ou si cette répartition évoluait encore.

Ces résultats sont à mettre à côté de ceux de la formulation de contrôle. L'hydrogel « véhicule » utilisé pour la nicotine libre est formé à partir de chitosan de moyenne masse molaire (90-150 kg/mol, Sigma-Aldrich) à 4% en masse dans une solution aqueuse d'acide acétique à 1% en masse. Ce polysaccharide présente des propriétés intrinsèques qui améliore la pénétration à travers les premières couches de la peau des principes actifs associés. Deux mécanismes sont avancés pour expliquer ces interactions. Le premier est son excellente bio-adhésion grâce à ses groupes amines chargés positivement en interaction électrostatique avec la surface de la peau chargée négativement. Ces groupes chargés pourraient aussi être à l'origine de l'ouverture réversible des jonctions imperméables (ou *zonula occludens*) des cellules épithéliales à la surface de la peau. Présent sur la membrane de plusieurs

nanoparticules, il a ainsi été montré à plusieurs reprises que le chitosan améliore la pénétration des molécules actives à travers le stratum corneum [28–30].

Pour ces deux raisons, évoquées à posteriori de ces premières manipulations, le chitosan favorise la pénétration de la nicotine à travers la peau et ne semble pas constituer un véhicule témoin neutre dans notre étude préliminaire de diffusion.

Toutefois, nous avons montré que les NLC semble favoriser la pénétration totale de la nicotine à travers les différentes couches de la peau jusque dans le compartiment de réception (87% contre 53%), limitant ainsi la stagnation de la molécule dans les premières couches. Ces résultats se rapprochent des mécanismes expliqués dans une récente revue par Sala et ses collègues [31]. Ils ont mis en évidence que les particules lipidiques nano-structurées de moins de 200 nm forment un monocouche lipophile aux propriétés occlusives. La désorganisation de la structure du stratum corneum qui suit cette occlusion permet la formation d'un « réservoir » de particules dans les premières couches de la peau. Cette réserve permet ensuite une plus grande diffusion de la molécule active de façon plus ou moins profonde, en fonction de ses propriétés intrinsèques de diffusion à travers la peau. La nicotine étant connue pour bien pénétrer les différentes barrières de la peau humaine, elle diffuse ainsi jusqu'au compartiment de réception de la cellule de Franz.

Grâce à ces premières manipulations, nous avons mis en évidence que les particules nano-structurées encapsulant de la nicotine semblent favoriser la pénétration de cette dernière à travers la peau. La formulation des NLC-Nic en solution aqueuse présente ainsi une plus grande proportion de la nicotine initialement appliquée détectée dans le compartiment de réception des cellules de Franz. Toutefois, cette étude devrait être complétée par une étude cinétique (suivi temporel de la concentration en nicotine dans le compartiment de réception) et une comparaison avec un échantillon de contrôle utilisant un véhicule véritablement inerte sur la peau. Par manque de temps pendant le projet de thèse -lié entre autres aux difficultés à remettre en place cette expérience dans un laboratoire non équipé en période de crise sanitaire, celles-ci n'ont pas pu être effectuées pendant ces 3 ans. La double encapsulation de la nicotine dans les NLC et dans une matrice hydrogel, comme présentée dans le premier chapitre et au début de celui-ci, pourrait permettre de moduler encore différemment la pénétration de la nicotine à travers la peau.

4.3. Particules lipidiques nano-structurées encapsulant du thymol (NLC_Thymol) : Formulation of stable thyme essential oil nano-structured lipid carriers and their transdermal diffusion properties (article)

Suite à des travaux préliminaires effectués dans le laboratoire du CEA-Leti, de nouvelles formulations de NLC encapsulant du Thymol ont pu être optimisées pendant les travaux de thèse. Les propriétés anti-inflammatoires du thymol en font une molécule intéressante à inclure dans un patch transdermique. De plus la possibilité d'encapsuler un fort pourcentage de thymol par rapport au poids en lipides des nanoparticules lipidiques ont fait de ces formulations des candidats de premier ordre pour tester leur comportement de relargage passif du thymol dans des tests sur cellules de Franz. Les résultats sont présentés dans ce manuscrit de publication, qui sera soumis au cours de la fin d'année 2020.

Article en cours de finalisation

Formulation of stable thyme essential oil nano-structured lipid carriers and their transdermal diffusion properties

Claire Desfrancois ^{1,2}, Mathilde Champeau ¹, Rachel Auzely ², Isabelle Texier ^{1*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI-DTBS, F-38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, CERMAV-CNRS, F-38000 Grenoble France

* Corresponding Author:

Isabelle Texier, Isabelle.texier-nogues@cea.fr, tel +33 438 784 670

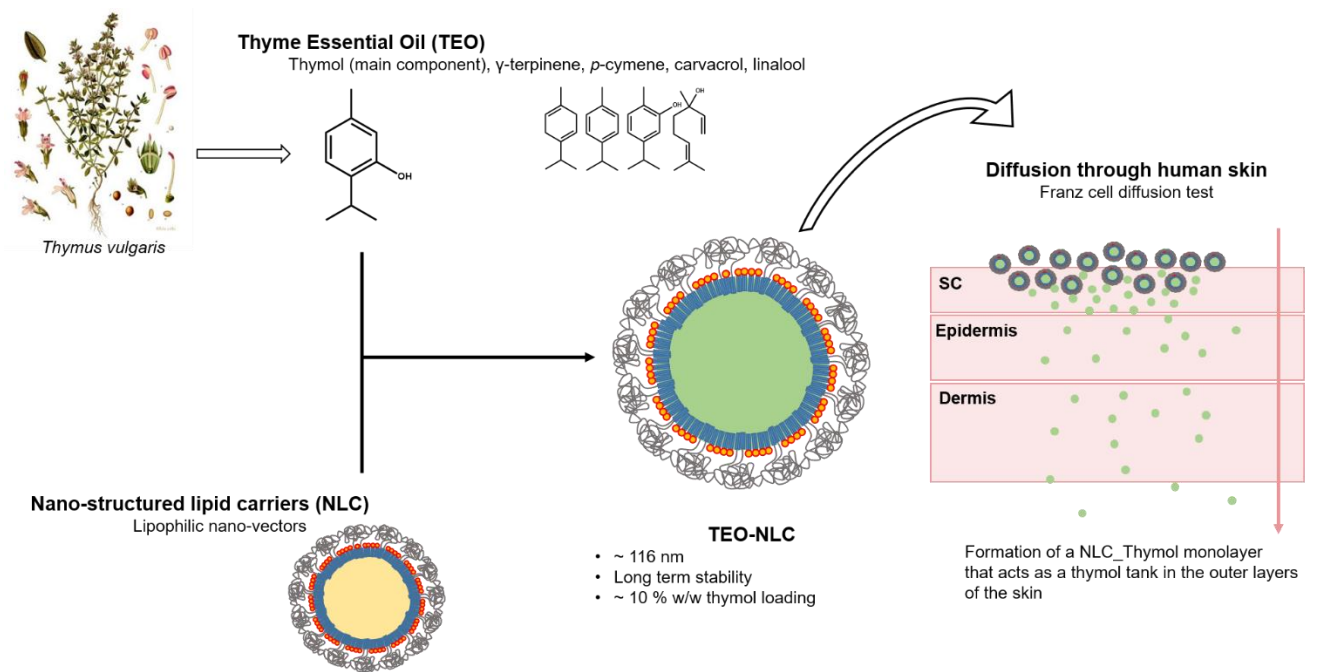
Abstract

An original formulation of nano-structured lipid carriers (NLC) encapsulating thyme essential oil (TEO), TEO-NLC, with long term colloidal stability ($d = 116$ nm, $PDI < 0,2$) have been developed and characterized by DLS and TEM. The main component of TEO, and the active molecule primarily responsible for the anti-inflammatory and anti-bacterial properties of TEO, is thymol. HPLC quantification method was used to investigate the thymol encapsulation efficiency of our new formulation. TEO-NLC demonstrated a unique and remarkable high thymol payload (around 40 mg of thymol for 100 mg of TEO-NLC just after synthesis) during this month of study that could be highly attractive for future biomedical applications, especially in the case of a transdermal route of administration. The diffusion behavior of this nanoformulation has thus been studied in *ex vivo* permeation test on human skin samples. TEO-NLC showed improved diffusion pattern through the skin, with a 20 times better permeation in the different skin layers after 24h when compared to the control sample (thymol aqueous solution). An additional investigation of TEO-NLC embedded in photo-crosslinked methacrylate-poly(ethylene glycol) hydrogel ($M_n = 2000$ g/mol) in *ex vivo* permeation test indicated that this novel TEO-NLC nanoformulation has potential to be further used in hydrophilic support matrix, as it is the case in transdermal patches.

Keywords

Transdermal diffusion, essential oil, thymol, nanoformulation, lipid nanoparticles

Graphical abstract



Introduction

Human skin is the first barrier of the human body against external aggressions ^[1], but also an interesting pathway for drug administration. The transdermal route is particularly a good alternative to the oral route when local delivery is sought for, as it by-passes the metabolic response of the liver, optimizes the amount of drug delivered to the targeted site, and hence improves the bioavailability of the drug ^[2]. It can be especially suited for the delivery of anti-inflammatory active pharmaceutical ingredients (API) - depending on the depth of the inflammation site. Usual anti-inflammatory drugs for local treatment are non-steroidal anti-inflammatory drugs or steroids (also named glucocorticosteroids). Both API families exhibit undesirable side effects (gastrointestinal bleeding, risk of acute myocardial infarction, rebound in the inflammation) and systemic toxicity ^[3-8], whatever the administration route. In a context of chronic inflammation management (psoriasis, rheumatoid arthritis, spondylarthritis, osteoarthritis and other chronic diseases) with multi-daily drug intakes, these adverse effects can become a real threat to patient's health ^[9-14]. An efficient substitute to these molecules, compatible with the transdermal administration route, would therefore be of great interest. Numerous natural extracts have been studied in animal models to screen for potential therapeutic activity ^[15-18]. The anti-inflammatory activity of some essential oils has been discovered. Among them, thyme essential oil (TEO) has demonstrated powerful anti-inflammatory effect. Its composition strongly varies depending on thyme plant location ^[19], but in most cases, thymol, a monoterpenoid derived from phenol, constitutes TEO major ingredient ^[19]. Isolated thymol has been confirmed to exhibit anti-inflammatory properties when topically applied ^[20-22].

Transdermal administration of thymol (or TEO) therefore appears as a promising alternative therapeutic strategy to treat local chronic inflammation pain. However, the majority of essential oils, including TEO, cannot be applied as such to the skin (without dilution or formulation) where they induce strong irritation ^[23,24]. TEO is also highly volatile, sensitive to oxidation and UV, and as such, do not stay available for long duration at the surface of the skin ^[24]. Because of its low surface energy, TEO is not miscible with water and so is difficult to include in hydrophilic formulation. Thymol is also listed as strong skin irritant, volatile, and UV-sensitive molecule ^[22,25]. Moreover, it is poorly soluble in water (900 mg/L in water at 20°C ^[26])

and cannot be stably formulated as such in hydrophilic matrices used for transdermal delivery. The small thymol size (150.2 g/mol) also explains its low bioavailability, as the molecule is quickly metabolized and eliminated by the kidneys [27].

To exploit thymol anti-inflammatory activity, innovative materials are therefore sought to allow its controlled and prolonged delivery by the transdermal administration route. In order to overcome poor thymol (TEO) water solubility and hence loading in hydrogels currently used for transdermal applications, a formulation of TEO-based lipid nanoparticles was herein proposed. Lipid nanoparticle dispersions have aroused high interest since 2000's to overcome the challenges of lipophilic API delivery [28–31]. In particular, nano-structured lipid carriers (NLC), with a lipid core constituted of a blend of liquid and solid lipids stabilized by a surfactant shell allowing their homogeneous dispersion and stability in water, present appealing properties for lipophilic API transdermal administration [32]. NLC are able to create on the skin an occlusive lipophilic monolayer, that disrupts the structure of the skin outer layer and improves tissue permeation [33]. NLC also provide lipophilic API with a lipid environment for increased and stable payload, and can ensure a prolonged and controlled delivery of the active molecule they encapsulate [29,32,34]. Additionally, they are made from FDA-approved ingredients with an easily up-scalable process [35].

The development of thymol-loaded NLC formulations is only at its beginnings, as less than 10 studies describing thymol-NLC systems have been published, in the last few years, [27,36–43]. Among these first examples, applications of such systems are diverse: from food [43] or wood conservation [44], to local anti-inflammatory treatment [36–38,41,42]. In the last case, NLC have proven to be able to stabilize thymol, effectively preventing the molecule from evaporating at the skin surface while demonstrating attractive shelf lives (1 year or more) with NLC of around 100 nm [36,38]. However, thymol payload in these systems remained limited (with a maximum of 2% regarding lipid content [38]) and thymol passive diffusion through skin – or a membrane mimicking the skin - was also low [36–38]. Our objective in this study was thus to design NLC with increased thymol payload, and by such, increase thymol passive diffusion through the skin, while preserving an excellent colloidal stability.

In this study, TEO-based NLC were designed, formulated, and characterized for their colloidal properties and thymol content. *Ex vivo* skin diffusion experiments were also carried out to assess the transdermal delivery of thymol from TEO-NLC suspensions. Moreover, as the TEO-

NLC suspension rheological properties were not ideal to be spread on skin samples, a supplementary hydrogel-based formulation, a photo-crosslinked poly(ethylene glycol)-methacrylate hydrogel embarking NLC suspension, more suitable for skin application, was tested as well. Three different formulations were used in Franz cell skin passive diffusion assays: thymol diluted in aqueous solution (Sol_Thymol), TEO-NLC and finally TEO-NLC dispersed in standard poly(ethylene glycol)-methacrylate hydrogel (named Gel_TEO-NLC).

Experimental Section

Materials

Thyme essential oil (*thymus vulgaris*) was purchased from Phytosun Aroms (Lab. Omega Pharma France, Châtillon, France). Suppocire™ NC was purchased from Gattefossé (Saint-Priest, France). Myrj™ S40 (poly(ethylene glycol) stearate surfactant with 40 ethylene glycol motifs) and Super-refined Soybean oil™ were supplied by CRODA (Chocques, France). Lipoid s75™ was purchased from Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). 2-Hydroxy-1-[4-(2-hydroxy-ethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone (Irgacure 2959) was kindly provided by Ciba Specialty Chemicals (Basel, Switzerland). Poly(ethylene glycol) dimethacrylate ($M_n = 2000$ g/mol), 2-Isopropyl-5-methylphenol (Thymol) and other products were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). SpectraPor dialysis membrane 12-14.000 kDa was purchased from Roth Sochiel EURL (Lauterbourg, France).

Formulation of TEO-NLC

The lipid phase was prepared by mixing solid (Suppocire™ NC, 35 mg) and liquid (thyme essential oil, 305 mg) glycerides with lipophilic surfactant Lipoid s75™ (65 mg). The aqueous phase was composed of the hydrophilic surfactant, Myrj™ S40 (345 mg), dissolved in 1.25 mL of ultrapure water. After homogenization at 45°C, both lipid and aqueous phases were crudely mixed and sonication cycles were performed at 45°C during 5 minutes with a VCX750 ultrasonic sonication probe (power output 190 W, 3-mm probe diameter, Sonics). Non-encapsulated components were separated from NLC by dialysis (ultrapure water, MWCO: 12 kDa, overnight). Prior to characterization, NLC dispersions were filtered through a 0.22 µm

cellulose Millipore membrane. Particle concentration was assessed by weighting freeze-dried samples of NLC obtained from a known volume (typically, 100 μ L).

Dynamic Light Scattering Measurements

NLC hydrodynamic diameter and zeta potential were measured at 22°C with a Malvern Zeta Sizer Nano instrument (NanoZS, Malvern, UK) in 0.1X PBS buffer. Physical stability was investigated by DLS measurements with samples stored at 4°C. At least three different NLC batches were used per condition. Reported mean average diameters and polydispersity indices were obtained from scattered light intensity results. Data were expressed in terms of mean and standard deviation of all the samples for each condition, each sample result being the mean of three independent measurements performed at 25°C.

Transmission Electron Microscopy

Negatively stained grids were prepared using the stain-on-grid technique. 10 μ L of particle dispersion were deposited on a glow discharge grid coated with a carbon supporting film for 3 minutes and the grid was stained with 30 μ L of PhosphoTungstate Acid for 2 minutes and the grid was air-dried. The sample was observed by transmission electron microscopy (TEM) with an FEI/Thermo Fisher Scientific Tecnai 12 microscope (LaB6 electron source, 120 kV) equipped with a Gatan Orius 1000 CCD camera.

HPLC analysis of thyme essential oil and of NLC thymol content

Analytical HPLC was performed with a HPLC Alliance e2695 Waters system equipped with a UV-Vis detector (2489, Waters) set at 274 nm and fitted with a Xterra Shield RP-18 end-capped column (L = 150 mm, \varnothing = 4.6 mm) operated at a flow rate of 0.8 mL/min. The injected volume was 20 μ L, the column temperature was set at 25°C. Isocratic elution was performed with a 50/50 acetonitrile/water eluent. In these chromatographic conditions, thymol eluted at 7.6 min. For quantification, a calibration curve was established using a solution of pure thymol diluted in acetonitrile at 7 concentrations, from 5 to 500 μ g/mL, each being performed in triplicates.

Thymol was quantitatively detected by UV absorbance at 274 nm in this concentration range. The calibration curve and fitted equation are reported in Supporting Information (Figure S1).

Thyme essential oil was diluted 30 times in acetonitrile, filtered (0.45 μm PTFE, 13mm of diameter, VWR international) and submitted to the same HPLC procedure described below than the NLC samples.

For the analysis of thymol content in TEO-NLC, prior to HPLC analysis, a small aliquot (typically 150 μL) of the studied nanoparticle sample was dialyzed to separate non-encapsulated components from TEO-NLC (ultrapure water, MWCO: 12 kDa, overnight). Recovered sample was diluted 30 times in acetonitrile to disintegrate the nanoparticle, sonicated for 10 minutes and filtered (0.45 μm PTFE, 13mm of diameter, VWR international).

Formation of PEG gels

PEG-(MA)₂ (15 mg, 100 g/L in ultrapure water) was completely diluted in 150 μL of NLC-thymol nano-suspension. 30 μL of Irgacure 2959 was then added (2 g/L) and the mixture was vortexed until complete homogenization. 150 μL of the mixture were cast in a PET mold (6 mm diameter, 5 mm height) and placed under UV light ($\lambda = 365 \text{ nm}$) for 15 minutes (60 mW/cm²). Just after formation, the gel was immediately applied to skin sample in *ex-vivo* permeation study.

Ex-vivo permeation study on human skin

Samples of dermatomed human skin from abdomen of consenting donors (about 1.8 cm²) were supplied by Proviskin (Besançon, France) and mounted on a Teflon holder fitted to a Franz diffusion cell (Proviskin, Besançon, France). Ex-vivo skin permeation study was performed using cells with an effective diffusion area of 0.503 cm² and a receiver chamber with a capacity of 7 mL. The skin mounted between the donor and acceptor chambers was contacted with 3 different formulations comprising 3.67 mg of thymol, maintaining constant sink conditions in the donor compartment: i) 250 μL of an aqueous solution of thymol at a concentration of 15 mg/mL (Sol_Thymol); ii) 250 μL of an aqueous solution of TEO-NLC at a thymol concentration of 15 mg/mL (TEO-NLC); iii) a poly(ethylene glycol)-methacrylate gel loaded with 250 μL of an aqueous solution of TEO-NLC with a thymol concentration of 15 mg/mL (Gel_TEO-NLC). The acceptor compartment was filled with 1X PBS at pH=7.4 and

continuously stirred by a stirring bar. The whole assembly was set at a constant temperature of 37°C with a circulating water bath. Aliquots of 1 mL were withdrawn at different time intervals from the receptor chamber and analyzed by HPLC for thymol content quantification (cf. HPLC method described above). The receptor phase was replenished with equal volume of fresh acceptor phase at each sample withdrawal.

Data of the kinetic release study were expressed as the cumulative percentage of the initial amount of thymol applied on the skin sample. The percentage (%_{thymol}), at one given time of withdrawal (t) was calculated thanks to the two following equations:

$$m_{cumulative\ thymol\ (t)} = m_{thymol\ sample\ (t)} + \frac{m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t-1)}}{7}$$

$$\%_{thymol\ (t)} = \frac{m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t)}}{m_{theoretical\ thymol}} \times 100$$

where $m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t)}$ is the cumulative weight of thymol in the reception compartment at an instant t, taking into account the successive withdrawals, $m_{thymol\ sample\ (t)}$ is the weight of thymol quantified by HPLC in the withdrawn sample at instant t, $m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t-1)}$ is the cumulative weight of thymol in the reception compartment at the previous sampling time (t-1), and $m_{theoretical\ thymol}$ is the theoretical weight of thymol applied on each skin sample (as mentioned earlier, $m_{theoretical\ thymol} = 3.67\ mg$). Experiments were performed in triplicate for each formulation (n=3, expressed as mean ± SEM).

At the end of the experiment (24 hours), excess of product was removed by washing with ultrapure water and dried with a fine cloth. The stratum corneum (SC) layer was then separated from the epidermis and dermis layers thanks to the standard tape stripping procedure^[45]. The skin samples were fixed on a plane surface and the diffusion area of SC removed with 11 strippings using n° 845 3M-scotch (3M, Cergy-Pontoise, France). The first scotch tape was discarded and the 10 following immersed in 5 mL of acetonitrile. The sample was then sonicated for 1 hour and 1 mL was withdrawn, filtered and analyzed by HPLC to quantify thymol content in SC. The remaining skin sample (composed of the epidermis and dermis layers) was chopped, immersed into 5 mL of acetonitrile, sonicated for 1 hour and centrifugated (10 minutes, 4000 rpm). Finally, 1 mL was withdrawn, filtered and analyzed by HPLC to quantify thymol content.

Each formulation was tested on three independent Franz cells. Data were expressed in terms of drug permeating per unit area in each skin layer, calculated as mean \pm SEM for each formulation.

Results and discussion

Analysis of commercial thyme essential oil

Commercial thyme essential oil (TEO) was first analyzed by HPLC in order to determine main components and respective concentrations, with special focus on thymol ingredient, acknowledged for its anti-inflammatory and anti-bacterial properties [20–22]. Thymol represented about 43% of the oil. p-cymene, carvacrol, γ -terpinen and linalool were the following most prominent components of the thyme essential oil. Therefore, TEO can be advantageously employed as a raw ingredient to prepare nano-formulations with high thymol content. However, TEO presents a very low surface energy (causing phase separation with aqueous solutions) as well as a high volatility [46] and is therefore not convenient to load as such in topic formulations. Consequently, new water-stable TEO-based nano-formulations were developed in order to obtain high thymol content materials suitable to topic delivery route.

Formulation of TEO-NLC

Based on our previous studies on the design of long-term colloiddally stable NLC formulations [47,48], TEO-lipid nanoparticles were formulated using TEO as liquid lipid, Suppocire™ NC as solid lipid, soybean lecithin (Lipoid™ s70) as lipophilic surfactant, and Myrj™ s40 (poly(ethylene glycol) stearate surfactant with 40 ethylene glycol motifs) as hydrophilic surfactants (Table 4.3). Formulation A was composed of a pure TEO core (liquid lipid nanoparticle), whereas formulations B and C comprised respectively 90% and 25% TEO.

Table 4.3. Composition of the lipophilic and aqueous phase of the NLC-Thymol.

Formulations		A	B	C
Lipid phase	Thyme Essential Oil	340	305	85
	Suppocire NC TM	-	35	255
	Lipoïd s75	65	65	65
Aqueous Phase	Myrj TM S40	345	345	345
	Buffer	1250 µL (glycerol)	1250 µL (Pure water)	1250 µL (Pure water)

The colloidal stability of these formulations was assessed by dynamic light scattering experiments performed at different time points during particle storage at 4°C (Figure 4.11). Formulation A, without SuppocireTM NC, showed clear signs of fast destabilization (increased polydispersity index) probably due to progressive evaporation of volatile thyme oil during storage (39 % decrease of particle size in 1 month). Addition of solid lipids (SuppocireTM NC) at 10% in the lipid core (formulation B) considerably slowed down the NLC size decrease with time (8% in 1 month), probably by slowing down TEO evaporation. The colloidal stability of the formulation was also confirmed by its constant polydispersity index. Formulation B displayed initially an average hydrodynamic diameter of 117 nm, larger than pure TEO-based nanoparticles (formulation A, 80 nm). With all other formulation parameters constant, this particle size increase between formulations A and B would be accounted for by the variation of the difference of viscosity between the lipid and aqueous phase during the droplet break-up of the sonication process ^[47]. Nanoparticle size and stability of formulation B were confirmed by TEM images (Figure 4.12), showing dispersed nanoparticles of around 90-130 nm diameter after negative staining (Figure 4.12.A). A few clusters of 2-5 particles were observed as well (Figure 4.12.B). However, NLC well conserved their integrity in these small clusters, certainly thanks to their dense PEG coating efficient to prevent particle coalescence ^[47,48]. The formation of these small clusters could be due to the sample preparation process for TEM imaging. At higher proportion of SuppocireTM NC (75% of SuppocireTM NC / 25% of TEO, formulation C), TEO-NLC were also destabilized with time. The concomitant increase of both the NLC hydrodynamic diameter and polydispersity index could indicate in that case a

destabilization due to Ostwald ripening [48]. Formulation C also displayed lower thymol (TEO) payload than formulation B, and was therefore discarded. With a colloidal stability of more than one month and a high thymol content (90% of thyme essential oil in the particle core), formulation B appeared as the most promising formulation for further experiments and is referred to as “TEO-NLC” in the following of the text. The size obtained was well within the usual range (100-300 nm) of other thymol-loaded nanoparticles examples from the literature [36–41].

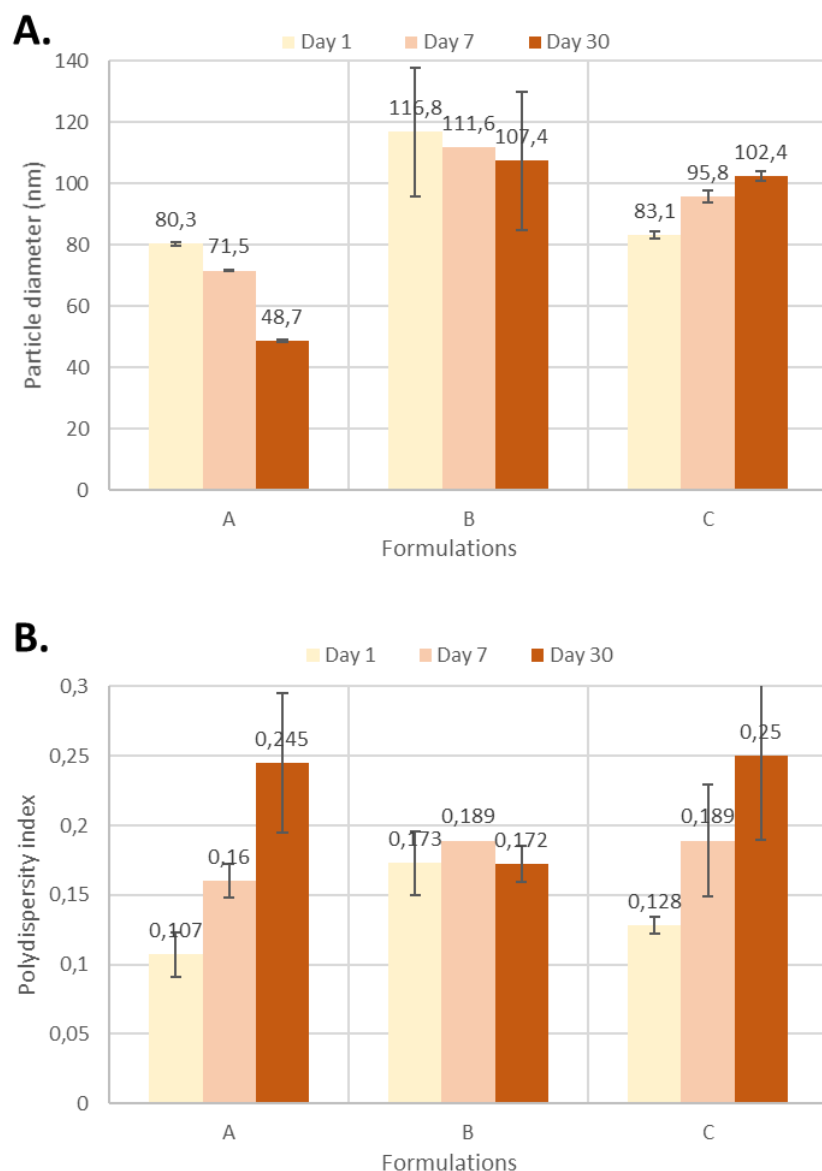


Figure 4.11. Particle hydrodynamic diameter (A) and polydispersity indices (B) of TEO-NLC formulations.

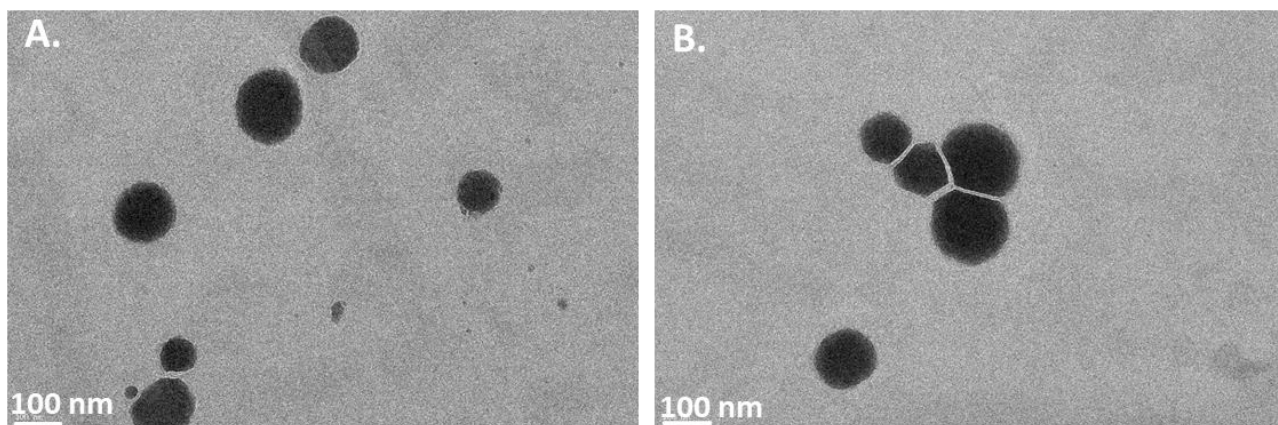


Figure 4.12. Examples of TEM photographs of TEO-NLC formulation B.

Thymol content of TEO-NLC

Thymol content of TEO-NLC was assessed by HPLC quantification. For that purpose, freshly dialyzed nanoparticle dispersion samples were disintegrated by dilution in acetonitrile, followed by sonication, and the solution filtered just prior injection in the High Pressure Liquid Chromatography system. Initial average encapsulated thymol concentration was 14.5 ± 5 g/L in TEO-NLC dispersion, corresponding to 40.2 ± 2.0 mg of thymol for 100 mg of lipid nanoparticles ($n=3$). Considering the composition of TEO-NLC particles, and the 43 % content of thymol in TEO, an initial 56 % of encapsulation efficiency was obtained for thymol in TEO-NLC.

Previous studies describing thymol-loaded lipid nanoparticles exhibited lower drug payload [36–41]. Wang and al. thus designed and synthesized chitosan beads containing thymol-loaded solid lipid and polymer hybrid nanoparticles with a smaller thymol concentration of 0.1 mg/mL of nanoparticles suspension [37]. In 2019, Shi and colleagues also tried to change the lipid matrix in solid lipid nanoparticles to increase thymol content from 4% to 16 % of thymol regarding lipid content with 1-Laurin-3-Palmitin [39]. In our case, our TEO-NLC culminated at 40.2% of thymol payload just after NLC synthesis. Pires and his team also developed an interesting system of NLC containing thymol- β -cyclodextrin complexes to improve thymol stability inside the lipid nanoparticles [38]. Thanks to this original strategy, they succeeded in producing NLC with a high payload of 2% of thymol regarding lipid content.

One month after preparation of TEO-NLC, average encapsulated thymol concentration was 8.2 ± 1.3 g/L in TEO-NLC dispersion, corresponding to 23 ± 2 mg of thymol for 100 mg of lipid

nanoparticles. The encapsulated thymol concentration slightly decreased, either from evaporation, the diffusion of the molecule out of the core of the nanoparticles or due to the degradation of the molecule itself. However, the thymol concentration remained at an interesting level after 1 month of storage, as previous studies showed that thymol exhibited anti-inflammatory activity at similar concentration [20,21,36].

Inclusion of TEO-NLC in poly(ethylene glycol)-based hydrogels

TEO-NLC formulations did not display as such rheological properties suitable for easy dermal application: at 36.1 mg/mL of lipid nanoparticles, they flowed like water. Therefore, they were further loaded in cross-linked PEG-based hydrogels to facilitate skin application (figure 4.13). In the context of this PhD work, and to be able to compare these results with further experiments including hybrid hydrogels PR-(MA)_{2,4}//PEG-(MA)₂ (described in chapter 3) methacrylate-modified PEG (M_n = 2000 g/mol) was chosen to embark TEO-NLC.

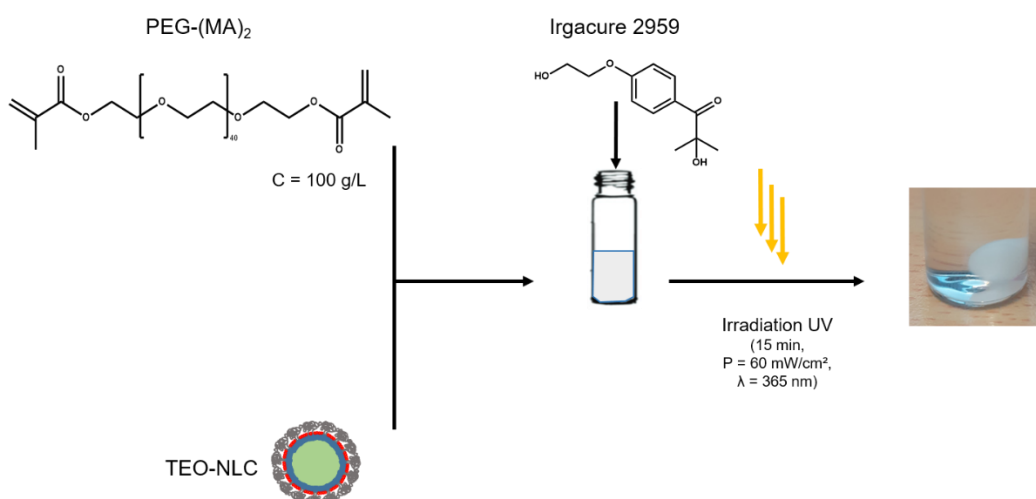


Figure 4.13. Process of TEO-NLC inclusion in PEG-(MA)₂ hydrogels

Ex-Vivo Franz cell passive diffusion experiments

To be able to act locally as an anti-bacterial and anti-inflammatory agent, thymol must be able to cross the skin and present a prolonged residence time in the different tissue layers. The diffusion through human skin of different thymol formulations (namely, aqueous dispersion of TEO-NLC (TEO-NLC), TEO-NLC dispersed in cross-linked PEG hydrogels (Gel_TEO-NLC), or thymol directly dispersed in water as control (Sol_Thymol) was thus evaluated *ex vivo* thanks

to Franz cell diffusion experiments (Figure 4.14.A). For each condition, 3.67 mg of thymol were contacted with skin, maintaining constant sink conditions in the donor chamber.

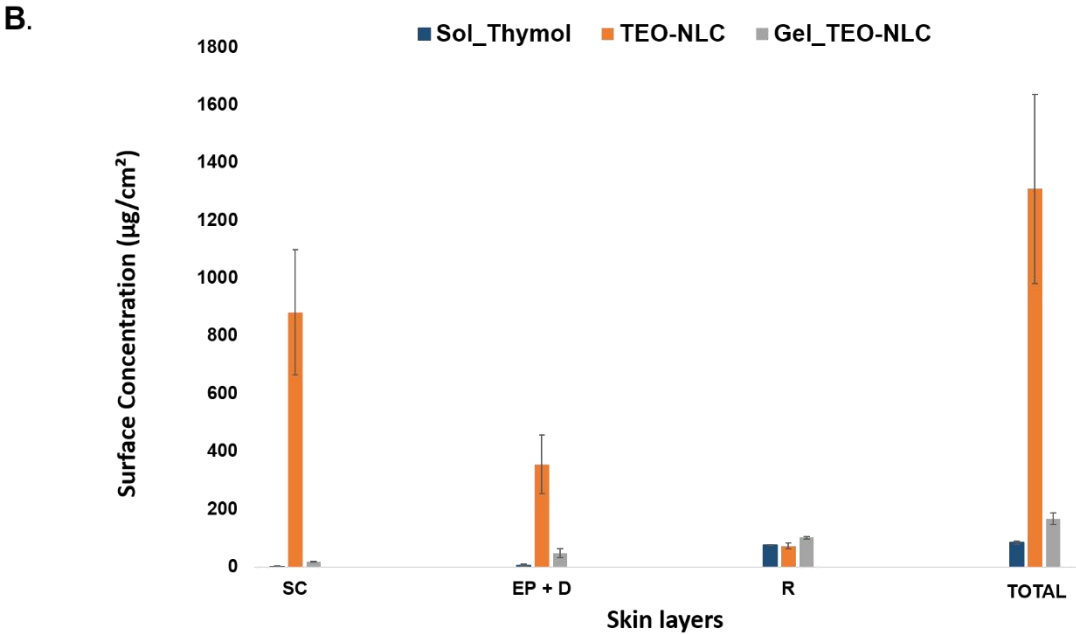
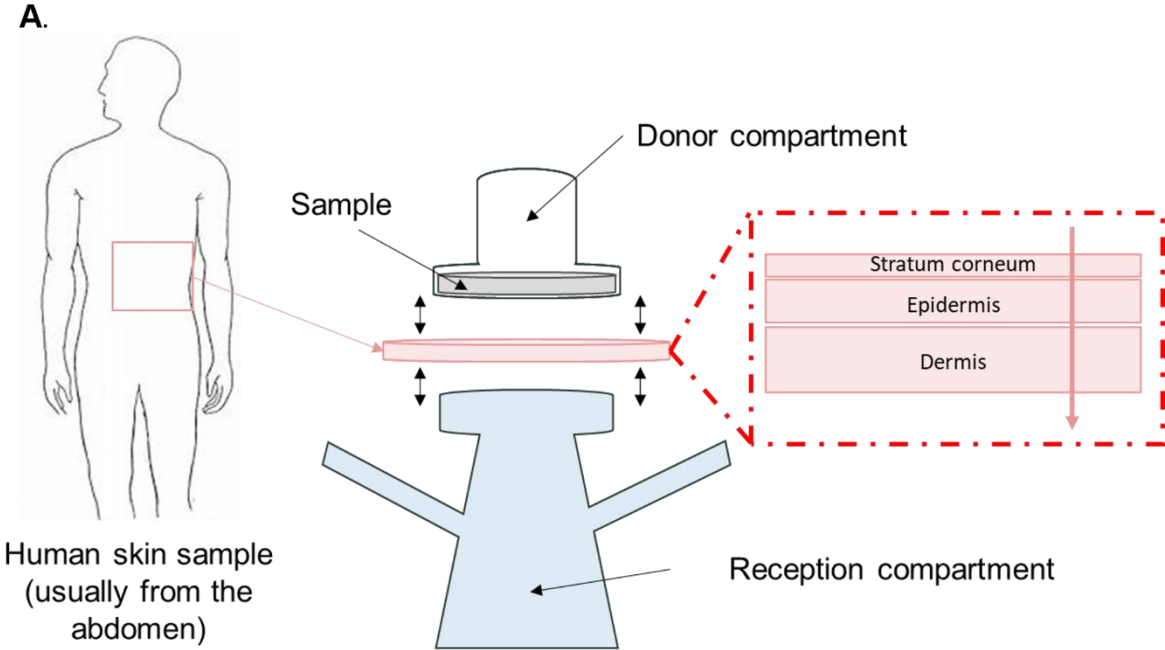


Figure 4.14 A. Representative scheme of Franz cell experiments to assess ex-vivo thymol diffusion through skin. **B.** Quantification of recovered thymol quantities (relative to tissue sample surface) in the different skin layers after 24 hours of exposition to the three different

formulations (SC = Stratum Corneum, EP+D = epidermis + dermis, R = receptor compartment) (n=3, mean \pm SEM).

After 24 hours of exposition, skin samples were always humid and the excess of products was removed (for Gel_TEO-NLC formulations, mainly).

About only 85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of thymol dispersed in water (about 1% of the initial applied dose) were recovered after the experiment, mainly in the receptor compartment after skin crossing (Figure 4.14.B) ($1.6 \pm 0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ recovered in stratum corneum, $6.1 \pm 3.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ recovered in dermis + epidermis, $76.8 \pm 0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ recovered in receptor compartment). The very large majority (about 99%) of the product evaporated during skin exposition, and the very low thymol concentrations recovered in the stratum corneum, epidermis and dermis layers, indicated the very short skin residence time for thymol. The quantity of thymol recovered in the receptor compartment did not significantly change between 19 hours and 24 hours of exposition (Figure 4.15), indicating that diffusion equilibrium was reached around 20 hours. Terpenes such as thymol are acknowledged as permeation enhancers for transdermal formulations^[49]. They present the ability to disturb the lipid organization of skin outer layer, stratum corneum^[49]. Because of this property, they are expected to completely cross the skin, do not accumulate in the intermediate skin layers (epidermis and dermis), and to be easily cleared once they reached bloodstream^[49,50], in agreement with the herein results. This short bioavailability in the skin limits their local impact as anti-bacterial and anti-inflammatory agents. In extreme cases, it can also put the patient at risk for systemic toxicity. Moreover, terpenes are small (molecular weight of thymol: 150.22 g/mol) and volatile molecules, accounting for the very low overall recovery of thymol.

Loading thymol in NLC very significantly increased its permeation and residence time through stratum corneum, epidermis and dermis layers (Figure 4.14.B). After 24 hours of application, $882 \pm 216 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of thymol remained in the stratum corneum (12% of the initial applied amount of drug), while $355 \pm 102 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (5 % of the initial applied amount of drug) were quantified in the epidermis and dermis layers. As for thymol-only formulation, about 1% of the initial amount of thymol ($72.7 \pm 9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was detected in the receptor compartment. Importantly, kinetics profile of accumulation in the receptor compartment (Figure 5) showed that equilibrium was not yet reached after 24 hours of skin contact. Encapsulation of thymol in nanostructured lipid carriers therefore very significantly increased thymol content in skin

(SC + EP + D) after 24 hours of application (1.3 mg/cm^2) and prolonged its release in the tissue. Sala and co-workers reported in a recent review ^[33] that lipid nanoparticles ($< 200 \text{ nm}$) spread on skin form an occlusive mono-layer that disorganizes the stratum corneum structure. The stratum corneum loss of cohesion is responsible for the constitution of a reservoir of drug-loaded NLC in the first layers of the skin. Drug diffusion from this resident reservoir onto the tissue is therefore prolonged, as we observed in the present study.

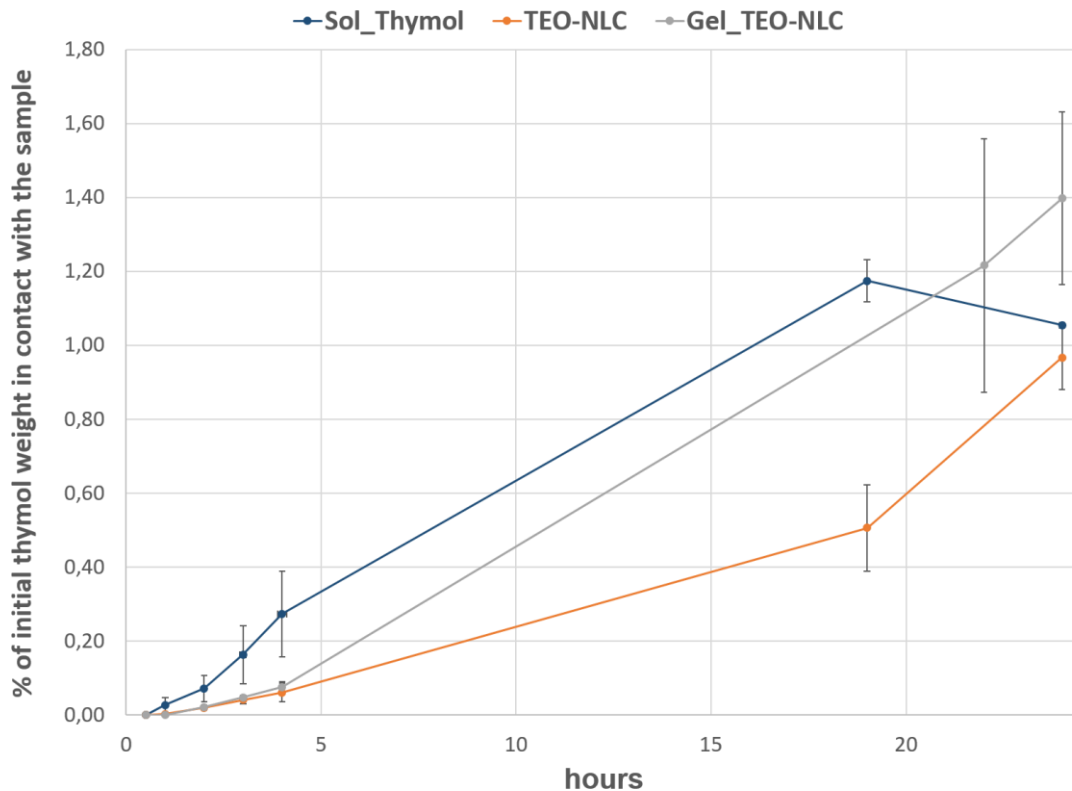


Figure 4.15. Kinetics of thymol release from the three different formulations in the reception compartment in the 24 first hours of the passive diffusion through skin test.

Thymol diffusion from the Gel_TEO-NLC encapsulation system displayed another different behavior (Figures 4.14 and 4.15). Thymol quantities recovered after 24 hours contact in stratum corneum ($18.4 \pm 0.09 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$) and dermis + epidermis ($47.4 \pm 15.5 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$) were higher than for the Sol_Thymol formulation. Though far smaller than for the TEO-NLC formulation, they demonstrated that the Gel_TEO-NLC system also displayed a “reservoir” effect on skin, and especially in the epidermis + dermis layer. Very interestingly, the amount of thymol in the reception chamber ($1.2 \pm 0.3 \%$ of the initial thymol content) at 22 hours was a bit higher than with the Sol_Thymol formulation ($1.1 \pm 0.06 \%$) at 19 hours, and continued

to increase between 22 hours and 24 hours, whereas it reached a plateau at 19 hours for the Sol_Thymol formulation. The reservoir effect of stratum corneum and more pronounced of epidermis+dermis layers could account for this prolonged delivery in the receptor chamber. Surprisingly, the diffusion process of thymol from the Gel_TEO-NLC system after 4 hours of contact was found to be slightly faster (or equivalent) than from the TEO-NLC formulation (Figure 4.15), even though the drug was loaded in a double encapsulation system in the case of Gel_TEO-NLC formulation. It could be that loading the NLC in the UV-cross-linked PEG-methacrylate gels, or the shearing force exerted during the application of the gel on the skin, partially damaged the colloidal stability of the lipid nanoparticles that therefore released faster their thymol content.

It could also happen that the amount of thymol quantified in the reception chamber in the first few hours (up to 4 hours) corresponded to the thymol immediately available to cross the skin when formulations were applied: about 0.27 ± 0.12 % for thymol in solution, higher than for thymol embedded in NLC or Gel_TEO-NLC (about 0.06 %) (small quantities of thymol present at the particle membrane, NLC present at the gel surface would be first available for diffusion). In a second phase (after 4 hours contact), for Sol_Thymol, thymol quantity in the receptor chamber continued to increase but a bit less faster, probably due to concurrent thymol evaporation on the skin surface, before reaching a plateau about 19 hours when all available thymol could have been transferred to the receptor chamber (and no further drug available in the SC and dermis + epidermis layers). For Gel_TEO-NLC, the increase of drug concentration in the receptor chamber was on the contrary a bit faster during this second phase; the small “reservoir” effect and a small disruption effect induced by the presence of NLC (diluted in the gel matrix) on the structure of the SC and D+E layers in comparison to Sol_Thymol could accelerate drug accumulation. In the receptor compartment, TEO-NLC in gels could be prone to release faster their drug content than TEO-NLC in solution during this phase, as explained above (particles damaged inside the gel), or the lower NLC concentration in the skin layers (since the PEG matrix would dilute the particle concentration) could make them be faster processed to released their thymol content. Concerning TEO-NLC formulation, acceleration of thymol accumulation in the receptor chamber seem to occur later (after 19 hours), maybe because TEO- NLC equilibrium concentration in skin layers were higher and

longer to reach in this case, for which the skin would be more exposed to restructuration of its lipid organization.

To confirm these hypotheses, prolongation of Franz cells diffusion experiments up to 48 or 72 hours would be necessary.

Conclusion

In this work, we demonstrated the possibility to produce nano-structured lipid carriers with a high thymol payload, and suitable colloidal and encapsulation stabilities over one month. The efficiency of TEO-NLC to release the antibacterial and anti-inflammatory drug in a controlled way through human skin was confirmed by Franz cell passive diffusion experiments. In particular, TEO-NLC formulation was shown to slow down the initial kinetics of release of thymol in the receptor chamber, and to increase its local concentration in the stratum corneum, epidermis and dermis layers of the skin. The inclusion of TEO-NLC in hydrogels could also be an interesting way to prolong thymol release during several days. These preliminary results show that NLC-Thymol could present interesting properties as an anti-inflammatory formulation that could be loaded in various vessels for transdermal delivery route.

Acknowledgements

This work was supported by the French National Research Agency in the framework of the “Investissement d’avenir” program Glyco@Alps (ANR-15-IDEX-02) (C. Desfrançois PhD grant). We thank Daphna Fenel (ISBG, Univ. Grenoble Alpes, France) for the acquisition of TEM images. CERMAV-CNRS and CEA-LETI are part of the Arcane Labex program supported by the French National Research Agency (ANR-12-LABX-003, CBH-EUR-GS, ANR-17-EURE-0003). This work used the EM facilities at the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UMS 3518 CNRS CEA-UGA-EMBL) with support from the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI; ANR-10-INSB-05-02) and GRAL, a project of the University Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. The IBS Electron Microscope facility is supported by the Auvergne Rhône-Alpes Region, the Fonds Feder, the Fondation pour la Recherche Médicale and GIS-IBiSA.

Formulation of stable thyme essential oil nano-structured lipid carriers and its transdermal diffusion properties

Supporting information

Claire Desfrançois ^{1,2}, Rachel Auzely ², Mathilde Champeau ¹, Isabelle Texier ^{1*}

¹ Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI-DTBS, F-38000 Grenoble, France

² Univ. Grenoble Alpes, CERMAV-CNRS, F-38000 Grenoble France

* Corresponding Author:

Isabelle Texier, Isabelle.texier-nogues@cea.fr, tel +33 438 784 670

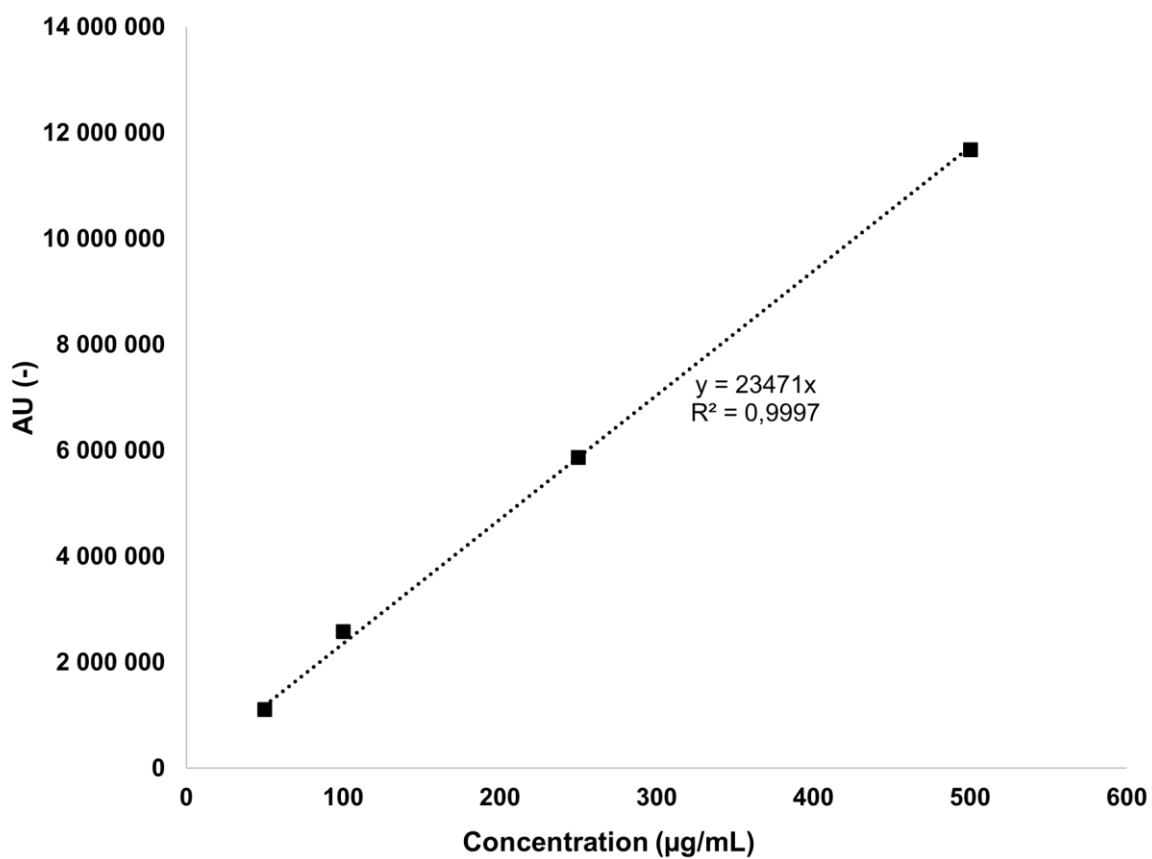


Figure S1. Calibration curve of thymol HPLC quantification method. 20µL of injection for each sample. Elution conditions are 50% acetonitrile, 50% ultrapure water at a flow of 0.8 mL/min on a 15 cm reverse phase C₁₈ column. Detection is done by UV ($\lambda = 274$ nm). Details are given in the experimental part.

References

- [1] G. Tortora, S. Reynolds Grabowski, *Principles of Anatomy and Physiology (Seventh Edition)*, Harper Collins College Publishers, **1993**.
- [2] M. R. Prausnitz, R. Langer, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1261–1268.
- [3] D. J. Graham, D. Campen, R. Hui, M. Spence, C. Cheetham, G. Levy, S. Shoor, W. A. Ray, *The Lancet* **2005**, *365*, 475–481.
- [4] M. Pirmohamed, S. James, S. Meakin, C. Green, A. K. Scott, T. J. Walley, K. Farrar, B. K. Park, A. M. Breckenridge, *BMJ* **2004**, *329*, 15–19.
- [5] I. Bjarnason, J. Hayllar, A. N. drew J. Macpherson, A. N. thony S. Russell, *Gastroenterology* **1993**, *104*, 1832–1847.
- [6] M. Fukaya, K. Sato, M. Sato, H. Kimata, S. Fujisawa, J. Yoshizawa, H. Dozono, S. Minaguchi, *Drug Healthc. Patient Saf.* **2014**, 131.
- [7] U. R. Hengge, T. Ruzicka, R. A. Schwartz, M. J. Cork, *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54*, 1–15.
- [8] E. N. Nnoruka, O. O. Daramola, S. O. Ike, *Expert Rev. Dermatol.* **2007**, *2*, 31–40.
- [9] C. Grigor, H. Capell, A. Stirling, A. D. McMahon, P. Lock, R. Vallance, D. Porter, W. Kincaid, *The Lancet* **2004**, *364*, 263–269.
- [10] C. K. S. Ong, P. Lirk, C. H. Tan, R. A. Seymour, *Clin. Med. Res.* **2007**, *5*, 19–34.
- [11] C. A. Heyneman, C. Lawless-Liday, G. C. Wall, *Drugs* **2000**, *60*, 555–574.
- [12] “Arthrose,” can be found under <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/arthrose>, **n.d.**
- [13] “Polyarthrite rhumatoïde,” can be found under <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/polyarthrite-rhumatoïde>, **n.d.**
- [14] “Spondyloarthrites,” can be found under <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/spondyloarthrites>, **n.d.**
- [15] S. Das, D. K. Das, *Inflamm. Allergy - Drug Targets* **2007**, *6*, 168–173.
- [16] R. Gautam, S. M. Jachak, *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 767–820.
- [17] J. R. S. Hault, M. Payá, *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* **1996**, *27*, 713–722.
- [18] H. P. Kim, K. H. Son, H. W. Chang, S. S. Kang, *J. Pharmacol. Sci.* **2004**, *96*, 229–245.
- [19] P. Satyal, B. Murray, R. McFeeters, W. Setzer, *Foods* **2016**, *5*, 70.
- [20] F. C. Fachini-Queiroz, R. Kummer, C. F. Estevão-Silva, M. D. de B. Carvalho, J. M. Cunha, R. Grespan, C. A. Bersani-Amado, R. K. N. Cuman, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2012**, *2012*, 1–10.
- [21] J. R. de Oliveira, D. de Jesus Viegas, A. P. R. Martins, C. A. T. Carvalho, C. P. Soares, S. E. A. Camargo, A. O. C. Jorge, L. D. de Oliveira, *Arch. Oral Biol.* **2017**, *82*, 271–279.
- [22] K. R. Riella, R. R. Marinho, J. S. Santos, R. N. Pereira-Filho, J. C. Cardoso, R. L. C. Albuquerque-Junior, S. M. Thomazzi, *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 656–663.
- [23] J. B. Christensson, P. Forsström, A.-M. Wennberg, A.-T. Karlberg, M. Matura, *Contact Dermatitis* **2009**, *60*, 32–40.
- [24] R. P. W. Scott, in *Encycl. Anal. Sci. Second Ed.* (Eds.: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole), Elsevier, Oxford, **2005**, pp. 554–561.
- [25] A. Herman, A. P. Herman, *J. Pharm. Pharmacol.* **2015**, *67*, 473–485.
- [26] D. Mackay, *J. Environ. Qual.* **1993**, *22*, 215–215.
- [27] A. R. Bilia, C. Guccione, B. Isacchi, C. Righeschi, F. Firenzuoli, M. C. Bergonzi, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2014**, *2014*, 1–14.
- [28] R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2000**, *50*, 161–177.

- [29] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 121–128.
- [30] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *25*.
- [31] R. H. Müller, R. Shegokar, C. M. Keck, *Curr. Drug Discov. Technol.* **2011**, *8*, 207–227.
- [32] S. Doktorovova, E. B. Souto, *Expert Opin. Drug Deliv.* **2009**, *6*, 165–176.
- [33] M. Sala, R. Diab, A. Elaissari, H. Fessi, *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 1–17.
- [34] X. Huang, C. S. Brazel, *J. Controlled Release* **2001**, *73*, 121–136.
- [35] C. Desfrancois, R. Auzély, I. Texier, *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 118.
- [36] T. P. Pivetta, S. Simões, M. M. Araújo, T. Carvalho, C. Arruda, P. D. Marcato, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *164*, 281–290.
- [37] T. Wang, Y. Luo, *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3112.
- [38] F. Q. Pires, J. K. R. da Silva, L. L. Sa-Barreto, T. Gratieri, G. M. Gelfuso, M. Cunha-Filho, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *182*, 110382.
- [39] H. Shi, S. Huang, J. He, L. Han, W. Zhang, Q. Zhong, *Nanomaterials* **2019**, *9*, 489.
- [40] B. Tonyali, A. McDaniel, J. Amamcharla, V. Trinetta, U. Yucel, *Food Packag. Shelf Life* **2020**, *24*, 100484.
- [41] I. Baldim, D. M. Rosa, C. R. F. Souza, R. Da Ana, A. Durazzo, M. Lucarini, A. Santini, E. B. Souto, W. P. Oliveira, *Biomolecules* **2020**, *10*, 693.
- [42] E. Esposito, C. Nastruzzi, M. Sguizzato, R. Cortesi, *Curr. Pharm. Des.* **2019**, *25*, 2323–2337.
- [43] F. Baqeri, M. Nejatian, S. Abbaszadeh, M. Taghdir, *J. Texture Stud.* **2020**, *51*, 501–510.
- [44] F. Zikeli, V. Vinciguerra, S. Sennato, G. Scarascia Mugnozza, M. Romagnoli, *ACS Omega* **2020**, *5*, 358–368.
- [45] R. F. V. Lopez, M. Bentley, M. B. D. Charro, R. H. Guy, *Eur J Pharm Sci* **2001**, *13*, 2001.
- [46] S. Burt, *Int. J. Food Microbiol.* **2004**, *94*, 223–253.
- [47] T. Delmas, A.-C. Couffin, P. A. Bayle, F. de Crécy, E. Neumann, F. Vinet, M. Bardet, J. Bibette, I. Texier, *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *360*, 471–481.
- [48] T. Delmas, H. Piraux, A.-C. Couffin, I. Texier, F. Vinet, P. Poulin, M. E. Cates, J. Bibette, *Langmuir* **2011**, *27*, 1683–1692.
- [49] A. C. Williams, B. W. Barry, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 603–618.
- [50] C.-H. Liu, F.-Y. Chang, D.-K. Hung, *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *82*, 63–70.

4.4. Conclusion

Dans ce chapitre 4, deux formulations originales de nanoparticules lipidiques (NLC) ont été développés, d'une part encapsulant de la nicotine, d'autre part encapsulant du thymol.

La formation d'un complexe ionique pour la formulation des NLC-Nic a permis d'obtenir des efficacités d'encapsulation de la nicotine inédites dans la littérature scientifique. Les résultats préliminaires sur la stabilité colloïdale de cette suspension semblent également prometteurs. Les tests sur cellules des Franz ont mis en évidence une influence certaine des NLC, avec une plus grande quantité de nicotine qui diffuse complètement au travers des échantillons de peau d'oreilles de porc, par rapport à l'échantillon de contrôle. Toutefois, ces résultats seront à confirmer avec un autre véhicule pour les échantillons de contrôle. En effet, l'hydrogel de chitosan utilisé ici pourrait avoir des propriétés d'amélioration de la pénétration du PA dispersé dans l'hydrogel au travers de la peau.

La formulation TEO-NLC développée dans la deuxième partie de ce chapitre 4 est également attractive, pour deux raisons. La quantité de thymol embarquée dans les nanoparticules est exceptionnellement haute, par rapport à la littérature existante, avec près de 40 mg de thymol pour 100 mg de NLC. La stabilité colloïdale de la formulation est acceptable, avec une dégradation de 43% de l'efficacité d'encapsulation au bout de 30 jours de stockage à 4°C, bien que l'optimisation et l'étude des nanoparticules n'aient pas été complètement achevées. La concentration de thymol présente dans les nanoparticules en suspension reste toutefois bien supérieure à la dose minimale nécessaire pour conserver l'action anti-inflammatoire du thymol et de l'huile essentielle de thym. Le comportement en diffusion passive des TEO-NLC est également intéressant. Les tests réalisés sur des échantillons de peau humaine ont mis en évidence une amélioration de la pénétration du thymol encapsulé, grâce à la formation d'une monocouche de NLC à la surface du stratum corneum qui agit comme un réservoir de PA, et vient saturer le stratum corneum en thymol.

Ces premiers tests de diffusion passive sur cellules de Franz de ces deux formulations ont prouvé l'intérêt certain des NLC pour contrôler la diffusion à travers la peau des molécules qu'elles encapsulent. Pour autant, et comme évoqué précédemment, des difficultés de mise en place de l'expérience de diffusion sur cellules de Franz pendant la crise sanitaire et le peu de produit 4'' disponibles ont fait que le système de double encapsulation hydrogel hybrides

+ NLC n'a pas pu être testé. Des essais préliminaires ont cependant été faits avec les hydrogels de référence PEG-(MA)₂ et les TEO-NLC, peu concluants. Ces hydrogels de supports ne semblent pas être les plus pertinents pour porter des particules nano-structurées, une réflexion est en cours pour changer de chimie, et finaliser ces résultats dans l'objectif de les publier. Une évaluation complète du comportement de relargage des molécules actives encapsulées dans les systèmes hydrogels de PEG-(MA)₂ et hydrogels hybrides + NLC est également prévue dans les suites à donner à ce projet de thèse. Ils pourraient ainsi donner une première conclusion sur le potentiel de la combinaison hydrogel hybride + NLC en tant que patch transdermique délivrant un traitement anti-inflammatoire pluri-journalier.

Références

- [1] C. Desfrancois, R. Auzély, I. Texier, *Pharmaceuticals* **2018**, *11*, 118.
- [2] R. H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, *Eur J Pharm Biopharm* **2000**, *50*, 161–177.
- [3] S. Wissing, A. Lippacher, R. Müller, *J Cosmet Sci* **2001**, *52*, 313–324.
- [4] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, *International Journal of Pharmaceutics* **2002**, *242*, 121–128.
- [5] R. H. Müller, M. Radtke, S. A. Wissing, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2002**, *25*.
- [6] M. R. Prausnitz, R. Langer, *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1261–1268.
- [7] Y. Ding, K. A. Nielsen, B. P. Nielsen, N. W. Bøje, R. H. Müller, S. M. Pyo, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2018**, *128*, 10–17.
- [8] P. Satyal, B. Murray, R. McFeeters, W. Setzer, *Foods* **2016**, *5*, 70.
- [9] J. R. de Oliveira, D. de Jesus Viegas, A. P. R. Martins, C. A. T. Carvalho, C. P. Soares, S. E. A. Camargo, A. O. C. Jorge, L. D. de Oliveira, *Archives of Oral Biology* **2017**, *82*, 271–279.
- [10] F. C. Fachini-Queiroz, R. Kummer, C. F. Estevão-Silva, M. D. de B. Carvalho, J. M. Cunha, R. Grespan, C. A. Bersani-Amado, R. K. N. Cuman, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**, *2012*, 1–10.
- [11] J. D. Thompson, J.-C. Chalchat, A. Michet, Y. B. Linhart, B. Ehlers, *Journal of Chemical Ecology* **2003**, *22*.
- [12] A. Herman, A. P. Herman, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2015**, *67*, 473–485.
- [13] L. Racine, Elaboration de biomatériaux pour la délivrance contrôlée de principes actifs hydrophobes, Sciences des Polymères, Université Grenoble Alpes, **2016**.
- [14] J. Vigne, C. Cabella, L. Dézsi, E. Rustique, A.-C. Couffin, R. Aid, N. Anizan, C. Chauvierre, D. Letourneur, D. Le Guludec, F. Rouzet, F. Hyafil, T. Mészáros, T. Fülöp, J. Szebeni, A. Cordaro, P. Oliva, V. Mourier, I. Texier, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2020**, *25*, 102157.
- [15] Devel, Almer, Cabella, Beau, Bernes, Oliva, Navarro, Prassl, Mangge, Texier, *Molecules* **2019**, *24*, 3499.
- [16] D. Sayag, Q. Cabon, I. Texier, F. P. Navarro, R. Boisgard, D. Virieux-Watrelet, C. Carozzo, F. Ponce, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *100*, 85–93.
- [17] Michy, Massias, Bernard, Vanwonderghem, Henry, Guidetti, Royal, Coll, Texier, Josserand, Hurbin, *Cancers* **2019**, *11*, 1760.
- [18] Ö. Tezgel, A. Szarpak-Jankowska, A. Arnould, R. Auzély-Velty, I. Texier, *Journal of Colloid and Interface Science* **2018**, *510*, 45–56.
- [19] T. Courant, E. Bayon, H. L. Reynaud-Dougier, C. Villiers, M. Menneteau, P. N. Marche, F. P. Navarro, *Biomaterials* **2017**, *136*, 29–42.
- [20] M. Champeau, *Elaboration d'un Matériau Hybride à Partir de Nanocellulose Pour Application Biomédicales*, Ecole d'Ingénieur ENSIACET, **2017**.
- [21] *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, **2010**.
- [22] N. Kanikkannan, K. Kandimalla, S. S. L. and M. Singh, "Structure-activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery," **2000**.
- [23] J. Hartmann-Boyce, S. C. Chepkin, W. Ye, C. Bullen, T. Lancaster, *Cochrane Database of Systematic Reviews* **2018**, DOI 10.1002/14651858.CD000146.pub5.
- [24] E. Keleb, R. K. Sharma, **2010**, *11*.
- [25] H. Wittchen, E. Hoch, J. Klotsche, S. Muehlig, *Int J Methods Psychiatr Res* **2011**, *20*, 28–39.
- [26] T. Delmas, A.-C. Couffin, P. A. Bayle, F. de Crécy, E. Neumann, F. Vinet, M. Bardet, J. Bibette, I. Texier, *Journal of Colloid and Interface Science* **2011**, *360*, 471–481.

- [27] H. Tang, S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2001**, *90*, 545–568.
- [28] S. Scalia, V. Trotta, V. Iannuccelli, A. Bianchi, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2015**, *135*, 42–49.
- [29] A. Dube, J. A. Nicolazzo, I. Larson, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2010**, *41*, 219–225.
- [30] A. D. Sezer, E. Cevher, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2012**, *9*, 1129–1146.
- [31] M. Sala, R. Diab, A. Elaissari, H. Fessi, *International Journal of Pharmaceutics* **2018**, *535*, 1–17.

Chapitre 5: Material and Methods

Chapitre 5: Material and Methods	187
5.1 Materials & General Procedures	189
5.2. Preliminary organic synthesis	190
5.2.1. Modification of reverse pluronic 10R5 (3)	190
5.2.2. Synthesis of β -cyclodextrins modified carboxylic acids.....	190
5.2.3. Synthesis of β -cyclodextrin-pentenamide (2)	194
5.3. Synthesis and characterizations of polyrotaxanes	195
5.3.1. Synthesis (4X).....	195
5.3.2. Characterizations	196
5.4. Gels formation and characterizations.....	198
5.4.1. Preliminary synthesis.....	198
5.4.2. Formation of the gels	201
5.4.3. Characterizations	202
5.5. Lipid nanoparticles synthesis.....	205
5.5.1. Formulation of NLC-Nic and NLC-Thymol	205
5.5.2. Characterizations	206

5.1 Materials & General Procedures

β -cyclodextrin (β -CD) was kindly provided by ROQUETTE (Lestrem, France). Pluronic 10R5 (average $M_n = 2000$ g/mol), 3-mercaptopropionic acid, (3-aminopropyl)triethoxysilane, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, 1,4-dithiothreitol, Dess-Martin periodinane, *O*-(carboxymethyl)hydroxylamine, uranyless and pentenoic anhydride were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin hydrochloride was purchased from Cyclodextrin-Shop (Tilburg, Netherlands). 2-Hydroxy-1-[4-(2-hydroxy-ethoxy)phenyl]-2-methyl-1-propanone (Irgacure 2959) was kindly provided by Ciba Specialty Chemicals (Basel, Switzerland). The Spectra/Por membranes (MWCO 3500 Da, 500-1000 Da, 12,000-14,000 Da) used for dialysis were obtained from Fisher Scientific (Rancho Domingez, CA) and Roth. The water used in all experiments was purified by an Elga Pure lab purification system, with a resistivity of 18.2 M Ω •cm.

Routine NMR 1H 1D, 13C 1D experiments

The ^1H NMR and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 400 MHz at 298 K, using deuterium oxide (D_2O from SDS, Vitry, France) as a solvent. Chemical shifts (δ in ppm) were given relative to external tetramethylsilane (TMS = 0 ppm) and calibration was performed using the signal of the residual protons of the solvent as a secondary reference.

5.2. Preliminary organic synthesis

5.2.1. Modification of reverse pluronic 10R5 (**3**)

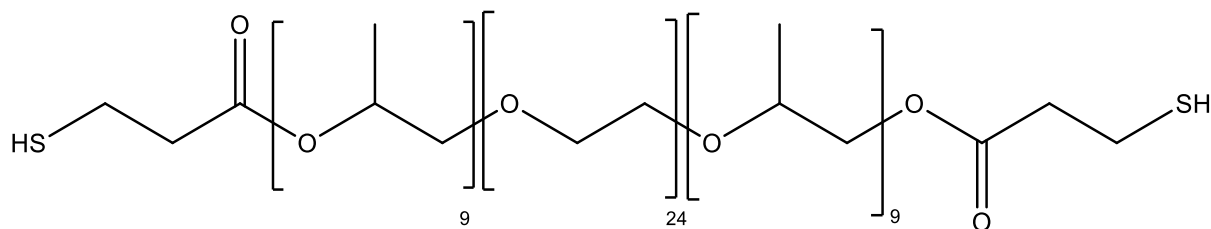


Figure 5.1. Chemical structure of thiol-modified pluronic **3**

The modification of Pluronic reverse 10R5 with thiol groups was performed using the following conditions. 10R5 (2 g, 0.940 mmol) was dissolved in dry toluene (100 mL). 3-mercaptopropionic acid (2 g, 18.9 mmol), *p*-toluenesulfonic acid (35.8 mg, 0.188 mmol), dithiothreitol (72.5 mg, 0.47 mmol) were then added to the mixture at room temperature. The mixture was then stirred at 104°C for 24 hours. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was dissolved in water and dialyzed against water (MWCO 500-1000 Da). After solvent removal (lyophilization), a yellow oil was obtained (**3**).

^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ): 1.2 ppm (54H, s, CH_3), 2.75 ppm (8H, m, $\text{CO-C}_2\text{H}_4\text{-SH}$). ^{13}C NMR (400 MHz, D_2O , δ): 15.8-18.12 ppm (s, CH_3), 66.3-66.7 ppm (s, CH_3), 69.7-72.1 ppm (s, $\text{CH}_2\text{-O}$), 73.8 ppm (s, $\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO}$), 75.5 ppm (CH-CH_3).

5.2.2. Synthesis of β -cyclodextrins modified carboxylic acids

β -CD mono- (**1a**) and di- (**1b**) carboxylic acid

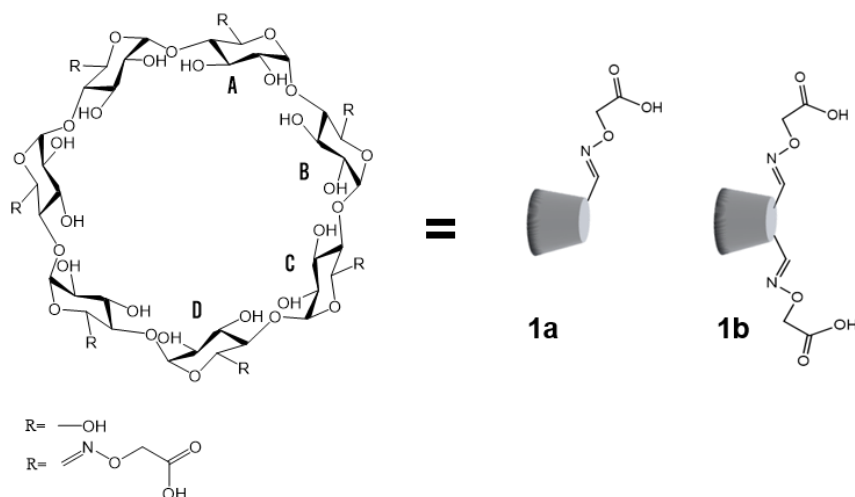


Figure 5.2. Chemical structure carboxylic acid-modified β -cyclodextrins **1a** and **1b**

β -cyclodextrin (1 g, 0.97 mmol) was dissolved in DMSO (25 mL). Dess-Martin periodinane (DMP) (1.64 g, 3.86 mmol, 4 eq) dissolved in DMSO (5 mL) was added slowly, and the reaction mixture was stirred for 45 min at room temperature. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was poured into acetone (400 mL). The crude product was isolated by filtration and dissolved again in DMSO (10 mL) to remove soluble impurities by reprecipitation with acetone. The oxidized β -CD obtained after filtration was dried under reduced pressure at 25°C for 24 h and then dissolved in water to be recovered by freeze-drying (885 mg). To an aqueous solution (75 mL) of oxidized β -CD (885 mg, 0.86 mmol) at room temperature *O*-(carboxymethyl)-hydroxylamine (93 mg, 0.86 mmol, 1eq) was added. The pH was adjusted to 4.8 using 0.5 N NaOH. The reaction mixture was stirred for 48 h at room temperature and then was neutralized to pH 7 by addition of 0.5 N NaOH. After evaporation of water and freeze-drying, 543 mg of the mixture of initial cyclodextrin, mono-, di-, tri- and tetra-carboxylic acid derivatives was recovered (61%). It was then fractionated by size exclusion chromatography on 3 Superdex columns S30 in series (4100 cm) with NaNO₃ (0.05M) as eluant, at room temperature. The flow rate was 72 mL/h. Fractions were monitored by a differential refractometer. Desalting was performed by dialysis against deionized water through a membrane of 100-500 Da. The dialysis was stopped when the dialysis water conductivity was lower than 10 μ S, and the mono- and di-functionalized cyclodextrins were recovered by freeze-drying.

Monocarboxylic acid β -CD: ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 7.62 (d, 1H, J=7.41 Hz, -CH=), 5.01 (d, 1H, H-1'), 4.97-4.88 (m, 6H, H-1), 4.35 (s, 2H, CH₂COOH), 4.29 (dd, 1H, H-5'), 3.90-3.84 (m, 6H, H-3), 3.87 (m, 1H, H-3'), 3.86-3.65 (m, 12H, H-6, H-6'), 3.83-3.73 (m, 6H, H-5), 3.65-3.45 (m, 12H, H-2, H-4), 3.62 (m, 2H, H-2', H-4').

Dicarboxylic acid β -CD: ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 7.65 (m, 2H, -CH=), 5.03-4.99 (m, 7H, H-1), 4.359-4.29 (s, 4H, CH₂COOH), 3.90-3.84 (m, 7H, H-3), 3.86-3.65 (m, 10H, H-6, H-6'), 3.83-3.73 (m, 7H, H-5), 3.65-3.45 (m, 14H, H-2, H-4).

β -CD mono- (1c) and di-(1d) carboxylic acid

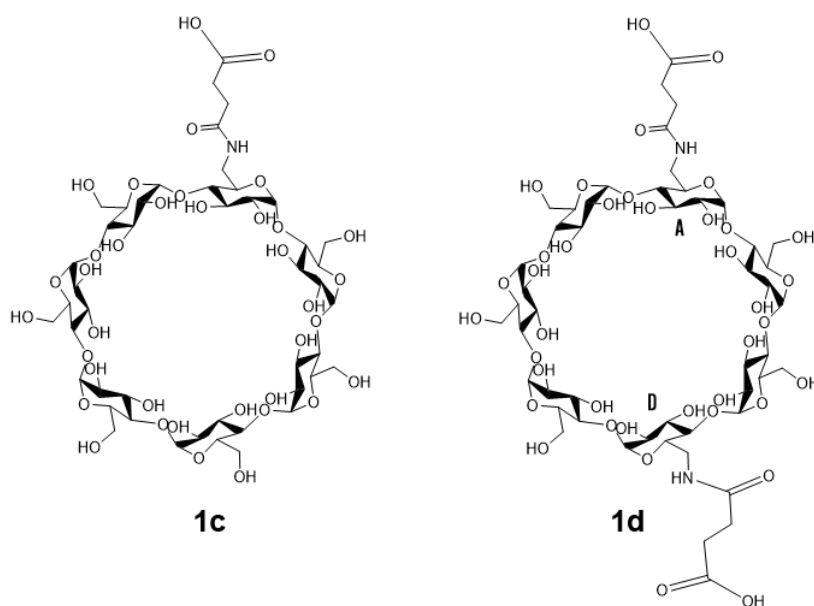


Figure 5.3. Chemical structure carboxylic acid-modified β -cyclodextrins **1c** and **1d**

To a vigorously stirred solution of 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin hydrochloride (300 mg, 0.28 mmol) in water (30 mL), 1 M NaOH (282 μ L, 0.2820 mmol) was dropped at 0°C. The mixture was kept at 0°C and stirred for 15 min. After solvent removal (lyophilization), the resulting white powder β -CD-NH₂ was used in the next step without further purification (300 mg, 100 %). To a vigorously stirred solution of β -CD-NH₂ (300 mg, 0.28 mmol) in dry dimethylformamide (DMF; 30 mL) at room temperature, succinic anhydride (55.5 mg, 0.31 mmol, 1.1 eq) was added to the mixture. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was poured into acetone (300 mL). The white precipitate was collected by filtration, washed with acetone (3 \times 100 mL), and dried to afford β -CD-(COOH) **1c** as a white powder (174 mg, 55 %).

The same procedure was applied, starting from *A,D*-6-Diamino-6-dideoxy- β -Cyclodextrin and adapting the molar equivalents of succinic anhydride (2.2 eq instead of 1.1 eq) to obtain *A,D*- β -CD-(COOH)₂ (**1d**) as a white powder and with a yield of 63%.

Monocarboxylic acid β -CD (**1c**): ¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 5.03-4.88 (m, 7H, H-1), 3.90-3.84 (m, 7H, H-3), 3.86-3.65 (m, 12H, H-6, H-6'), 3.83-3.73 (m, 7H, H-5), 3.65-3.45 (m, 14H, H-2, H-4), 3.46-3.24 (m, 2H, CH₂-NH), 2.62-2.53 (m, 4H, C₂H₄-COOH).

Dicarboxylic acid β -CD (**1d**): ^1H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 5.16-5.07 (m, 7H, H-1), 3.90-3.84 (m, 7H, H-3), 3.86-3.65 (m, 12H, H-6, H-6'), 3.83-3.73 (m, 7H, H-5), 3.65-3.45 (m, 14H, H-2, H-4), 3.50-3.20 (m, 4H, 2xCH₂-NH), 2.78-2.55 (m, 8H, 2xC₂H₄-COOH).

5.2.3. Synthesis of β -cyclodextrin-pentenamide (**2**)

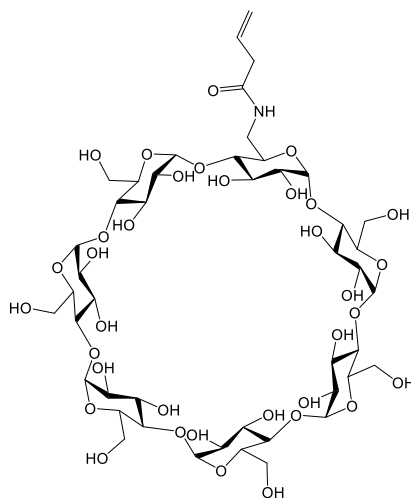


Figure 5.4. Chemical structure of the end-capping group pentenamamide-modified β -cyclodextrins **2**

To a vigorously stirred solution of 6-monodeoxy-6-monoamino- β -cyclodextrin hydrochloride (370 mg, 0.316 mmol) in water (30 mL), 1 M NaOH (282 μ L, 0.2820 mmol) was dropped at 0°C. The mixture was kept at 0°C and stirred for 15 min. After solvent removal (lyophilization), the resulting white powder β -CD-NH₂ was used in the next step without further purification (370 mg, 100 %). To a vigorously stirred solution of β -CD-NH₂ (370 mg, 0.316 mmol) in dry dimethylformamide (DMF; 50 mL) at room temperature *N,N*-diisopropylethylamine (49 mg, 0.379 mmol) and 4-pentenoic anhydride (69 mg, 0.379 mmol) were added to the mixture. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was poured into acetone (300 mL). The white precipitate was collected by filtration, washed with acetone (3 \times 100 mL), and dried to afford β -CD-pentenamide **2** as a white powder (228.5 mg, 60 %).

¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 5.8 ppm (1H, s, CH-CH₂), 5.2 ppm (7H, s, H₁), 5.1 ppm (2H, s, C-CH₂), 3.4 ppm (1H, dd, CH₂-NH), 3.3 ppm (1H, dd, CH₂-NH), 3.3-4 ppm (42H, m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H_{6'}), 2.4 ppm (4H, m, C₂H₄-CH-CH₂).

¹³C NMR (400 MHz, D₂O, δ): 29.38 ppm (s, CH₂-CH₂-CH=CH₂), 34.64 ppm (s, CH₂-CH₂-CH=CH₂), 40.15 ppm (s, CH₂-NH-CO), 60.14 ppm (s, C₆), 71.51 ppm (s, C₅), 73.06 (s, C₂), 81.08 ppm (s, C₃), 82.89 (s, C₅), 102.0 ppm (s, C₁), 115.9 ppm (s, CH=CH₂), 136.9 ppm (s, CH=CH₂).

5.3. Synthesis and characterizations of polyrotaxanes

5.3.1. Synthesis (**4X**)

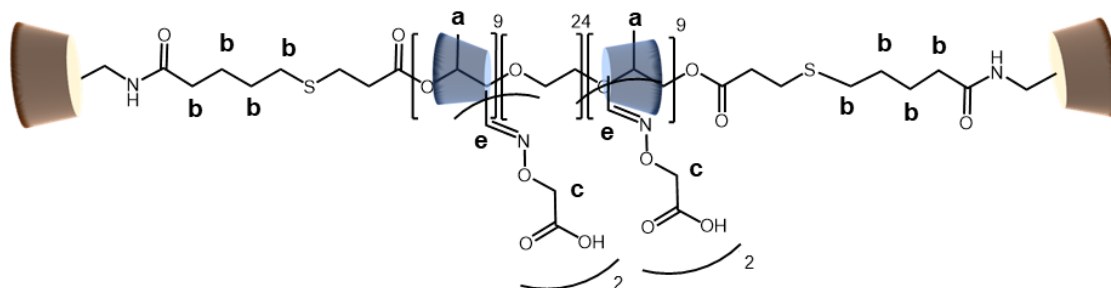


Figure 5.5. Chemical structure of the polyrotaxane **4**

All the synthesis of polyrotaxanes were performed following the same conditions as described in the following example. The thiol-end modified 10R5 (**3**, 10 mg, 4.36×10^{-6} mol) and β -CD-(COOH)₂ (derivative **1b**, 28 mg, 2.2×10^{-5} mol) were dissolved in degassed acetate buffer (pH=5.5, 0.1 M, 1.5 mL) containing tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, 4.5 mg, 1.6×10^{-5} mol). The mixture was stirred for 24 hours under nitrogen. β -cyclodextrin-pentenoate **2** was added to the mixture dissolved in 1.5 mL of the same acetate buffer. The pH of the mixture was then increased to pH=7.5 with 0.5 M aqueous NaOH and 50 μ L of an aqueous solution of Irgacure 2959 (1 mg/mL) was added to the solution to obtain a final photoinitiator concentration of 1% (w/v). The mixture was exposed under UV light (20 mW/cm², 365 nm) for 10 min. Finally, the solution was dialyzed against water (MWCO 3.5 kDa). After solvent removal (lyophilisation), 23 mg of a white powder (**4c**, polyrotaxane with two threaded β -CD-(COOH)₂, 72%) were obtained.

¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 7.75 ppm (8H, s, CH-N), 5.2 ppm (28H, s, H₁), 4.5 ppm (8H, m, CO-CH₂-COOH), 2-2.5 ppm (16H, m, CO-C₄H₈-S), 1.2 ppm (54H, s, CH₃).

¹³C NMR (400 MHz, D₂O, δ): 15.8-18.12 ppm (s, CH₃), 22.70-29.53 ppm (s, NH-CO-(CH₂)₄-S), 66.3-66.7 ppm (s, CH₃), 60.02 ppm (s, C6) 69.7-72.1 ppm (s, CH₂-O), 71.6 ppm (s, C2), 73.2 ppm (s, C5), 73.8 ppm (s, HS-CH₂-CH₂-CO), 75.5 ppm (s, CH-CH₃, C3), 80.98 ppm (s, C4), 101.2 ppm (s, C1), 148.5 ppm (s, CH-N).

5.3.2. Characterizations

Advanced NMR Characterizations: HSQC, TOCSY, NOESY, DOSY

The ^1H NMR and ^{13}C spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD spectrometer (Bruker, Wissembourg, France) operating at 400 MHz at 298 K, using deuterium oxide (D_2O from SDS, Vitry, France) as a solvent. Chemical shifts (δ in ppm) were given relative to external tetramethylsilane (TMS = 0 ppm) and calibration was performed using the signal of the residual protons of the solvent as a secondary reference.

DEPTQ 135 spectra were recorded using 90° pulses, 20,161 Hz spectral width, 65,536 data points, 1.638 s acquisition time, 2 s relaxation delay and 8,192 scans. Proton spectra were recorded with a 4000 Hz spectral width, 65,536 data points, 8,192 s acquisition times, 10 s relaxation delays, and 16 to 64 scans.

The ^1H and ^{13}C -NMR assignments were based on 1H - 1H homonuclear and ^1H - ^{13}C heteronuclear correlation experiments (correlation spectroscopy, COSY and heteronuclear single quantum correlation, HSQC). They were performed with a 3201 Hz spectral width, 2048 data points, 0.319 s acquisition time, 1.5 s relaxation delay; 32 to 512 scans were accumulated.

^1H diffusion ordered spectroscopy NMR (^1H DOSY NMR) spectra were recorded with a 5 mm broad band probe including a z-axis gradient coil with the maximum gradient strength of $53 \text{ G}\cdot\text{cm}^{-1}$. Samples were studied in 5 mm outer diameter tubes. These experiments were performed in 16 steps with the standard Bruker ledbpgp2s pulse program using stimulated echo and longitudinal eddy delay with bipolar gradients and two spoil gradients. The recycle delay was equal to 1 s whereas gradient pulses varied between 1900 and 2000 ms and diffusion times were 0.080 up to 0.150 s. Individual rows of the 2D diffusion databases were phase- and baseline-corrected. Details concerning experimental conditions are given in the figure captions.

ESI-FT-ICR mass spectrometry

Mass spectrometry measurements were performed using a 7 T Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) tandem mass spectrometer (Bruker Apex-Qe) equipped with an Apollo II ESI ion source (Bruker Daltonics), a quadrupole mass filter, and a hexapole accumulation/collision cell. The solution was introduced in the source using direct infusion

with a syringe pump at a flow rate of 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. Spray voltage of 4 kV and a capillary temperature of 180 $^{\circ}\text{C}$ were used.

Atomic Force Microscopy

The atomic force microscopy images were recorded on the AFM Shimadzu SPM-9700 (Shimadzu, France) with the dynamic mode. 3 μL of a 1 mg/mL polyrotaxane solution were deposited on a silicium surface. The drying step was performed under atmospheric conditions for at least 15 minutes. The images were then taken with the aforementioned settings.

Transmission Electron Microscopy

For TEM analysis, all samples were dispersed in ultrapure water, a drop was placed on carbon grid and stained with Uranylless (Delta Microscopies). The samples were observed with a Jeol EM 2100F (FEG) transmission electron microscope (JEOL, Massachusetts, EUA) operating at 200 kV.

5.4. Gels formation and characterizations

5.4.1. Preliminary synthesis

*Synthesis of methylated- β -cyclodextrin-pentenamide (**2'**)*

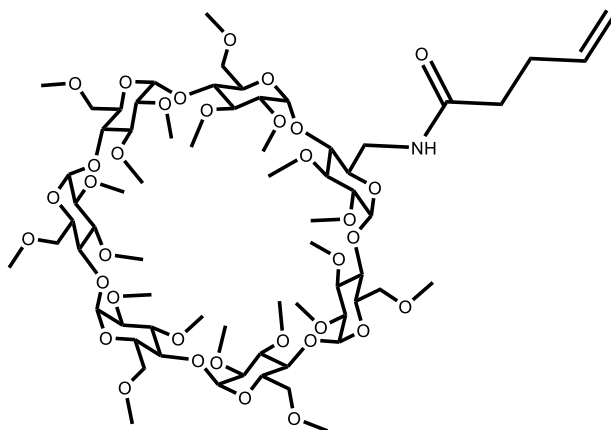


Figure 5.6. Chemical structure of the methylated end-capping group pentenamamide-modified β -cyclodextrins **2'**

To a vigorously stirred solution of 6-Monoamino-6-monodeoxy-2-O-methyl-hexakis-(2,6-di-O-methyl)- β -Cyclodextrin (647 mg, 0.460 mmol) in water (50 mL), 1 M NaOH (282 μ L, 0.2820 mmol) was dropped at 0°C. The mixture was kept at 0°C and stirred for 15 min. After solvent removal (lyophilization), the resulting white powder, methylated- β -CD-NH₂, was used in the next step without further purification (645 mg, 100 %). To a vigorously stirred solution of methylated- β -CD-NH₂ (645 mg, 0.460 mmol) in dry dimethylformamide (DMF; 50 mL) at room temperature *N,N*-diisopropylethylamine (100 mg, 0.550 mmol) and 4-pentenoic anhydride (71 mg, 0.550 mmol) were added to the mixture. The mixture was stirred for 12 hours at room temperature. After evaporation of most of the solvent, the residual syrup was dialyzed against ultrapure water (membrane cut-off: 500-1000 Da) and freeze-dried to afford β -CD-pentenamide **2'** as a white powder (370.4 mg, 54 %).

¹H NMR (400 MHz, D₂O, δ): 5.8 ppm (1H, s, CH-CH₂), 5.3 ppm (7H, s, H₁), 5.1 ppm (2H, s, C-CH₂), 3.3-4 ppm (42H, m, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H_{6'}), 2.4 ppm (4H, m, C₂H₄-CH-CH₂).

Synthesis of polyrotaxanes-methacrylate (4'') with methylated-β-cyclodextrin-pentenamide (PR-(MA)_{2.4})

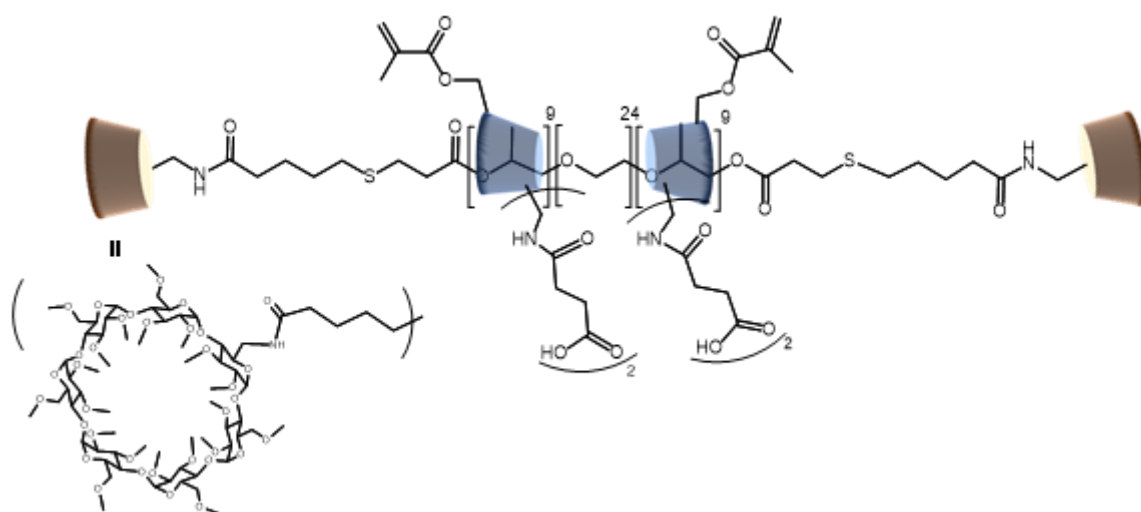


Figure 5.8. Chemical structure of the polyrotaxane 4''

The methylated-PR (polyrotaxane 4', 200 mg, 2.5×10^{-5} mol) was added in dimethylsulfoxide (15 mL) and heated at 40°C until complete dissolution. 4-Dimethylaminopyridine (DMAP, 30.5 mg, 2.5×10^{-4} mol) was added to the mixture and agitated for 30 minutes. Triethylamine (TEA, 25.3 mg, 2.5×10^{-4} mol) and methacrylate acid (MA, 38.5 mg, 2.5×10^{-4} mol) were then added. The mixture was stirred at 40°C for one night. After dialysis against ultrapure water and solvent removal (lyophilisation), 50 mg of a white powder (4'', polyrotaxane with an average of 2.4 methacrylate functions grafted, 25%) were obtained.

^1H NMR (400 MHz, D_2O , δ): 6.3 ppm (2.74H, m, $\text{CH}_2\text{-C-CH}_3$), 5.7 ppm (2.41H, m, $\text{CH}_2\text{-C-CH}_3$), 5.2 ppm (28H, m, H_1), 2.6 ppm (4.74H, s, C-CH_3), 2.5 ppm (16H, m, $\text{C}_2\text{H}_4\text{-COOH}$), 2-2.5 ppm (16H, m, $\text{CO-C}_4\text{H}_8\text{-S}$), 1.2 ppm (54H, s, CH_3).

5.4.2. Formation of the gels

All gels described below were cast in a pre-fabricated cylindrical PET mould of 6 mm diameter and 5 mm height.

Formation of PEG-(MA)₂ gel

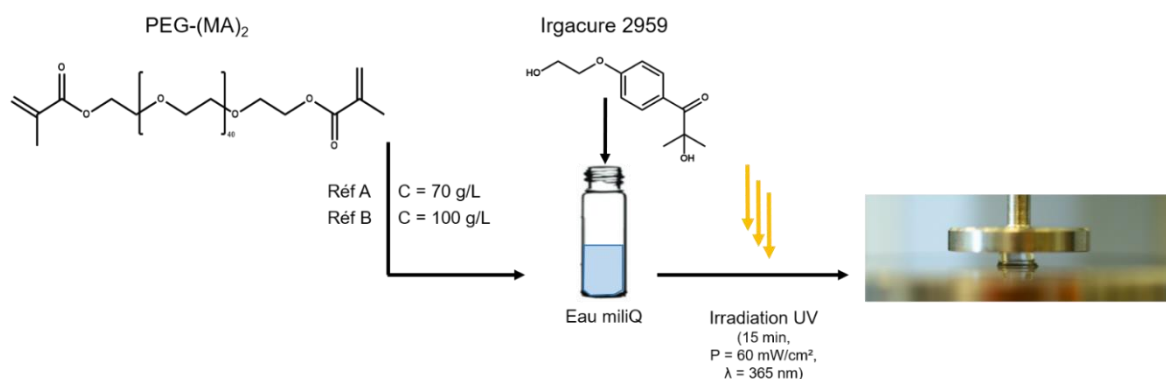


Figure 5.9. Production process of reference PEG-(MA)₂ hydrogels

All gels described in section 3.2.3. were produced as explained below. PEG-(MA)₂ (M = 2000 g/mol, 15 mg, C_m = 100 g/L) was completely diluted in 150 μL of ultrapure water. Irgacure 2959 was then added (C_{Irgacure} = 2 g/L) and the mixture was vortexed until complete homogenization. 150 μL of the mixture was cast in the PET mould and placed under UV light for 15 min (60 mW/cm²). Just after gelification, the gel was geometrically measured with a caliper, weighted and immediately used for further tests.

Formation of PEG-(MA)₂//PR-(MA)_{2,4} gels

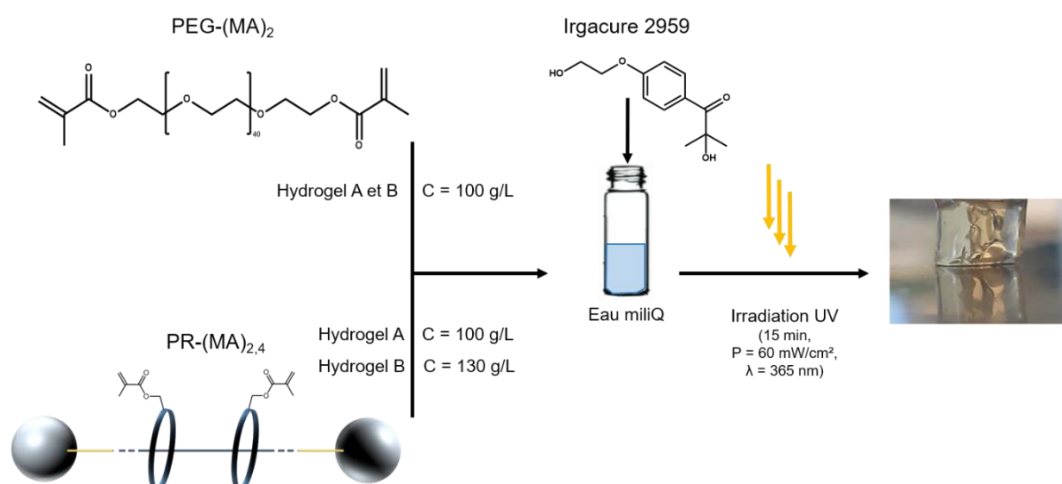


Figure 5.10. Production process of hybrid PR-(MA)_{2,4}//PEG-(MA)₂ hydrogels

The same procedure was followed to produce all the PR-(MA)_{2,4}//PEG-(MA)₂ gels described in the section 3.2.3. PEG-(MA)₂ (M = 2000 g/mol, 15 mg, C_m = 100 g/L) and PR-(MA)_{2,4} (**4''**, M = 8116.2 g/mol, 15 mg, C_m = 100 g/L) were completely diluted in 150 μL of ultrapure water. Irgacure 2959 was then added (C_{Irgacure} = 2g/L) and the mixture was vortexed until complete homogenization. 150 μL of the mixture was cast in the PET mould and placed under UV light for 15 min (60 mW/cm²). Just after formation, the gel was measured with a caliper, weighted and immediately used for further tests.

5.4.3. Characterizations

Oscillatory Rheology experiments

An AR2000Ex rheometer (TA Instruments, Inc.) fitted with a UV-curing cell (λ = 365 nm) and an aluminum plate (diameter 20 mm) was used for the *in-situ* measurement of the mechanical properties of the PEG-(MA)₂. Following the deposition of 300 μL of solution, the gap between the flat quartz plate and the aluminum plate was initially 0.8 mm (measuring at room temperature). The gap was controlled during the experiments by maintaining the normal force at 0 ± 0.1 N. On each PEG-(MA)₂ hydrogel, oscillatory time sweep and frequency sweep experiments were performed. All the dynamic rheological data were checked as a function of strain amplitude to ensure that the measurements were performed in the linear viscoelastic region. In the oscillatory time sweep experiments, the storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were measured for a period of 35 min at a fixed frequency of 1 Hz and a fixed deformation of 3.5%. Typically, after deposition of the solution of PEG-(MA)₂ in ultrapure water between the plates and equilibration time of 1.5 min, the solution was illuminated (λ = 365 nm) for 35 min at a fixed light power of 20 mW/cm² leading to gelation.

Swelling behaviour

The equilibrium swelling ratios Q of every PEG-(MA)₂ // PR-(MA)_{2,4} and PEG-(MA)₂ gel (6 mm diameter and 5 mm initial thickness) were measured in PBS. Q was determined as follows

$$Q = \frac{w_{swollen}}{w_{dry}}$$

where w_{swollen} is the gel mass after swelling in PBS and w_{dry} is the dry gel mass measured after desiccating the sample for 4 days.

NMR quantification of non-reticulated PR-(MA)_{2.4}

PBS solution used during swelling measurements was freeze-dried, weighted and diluted in deuterated D₂O NMR solvent. Maleic acid was added, with a precise known weight ($w_{\text{maleic acid}}$), to the mixture as an internal standard for NMR analysis.

Thanks to the ¹H NMR spectrum, the quantity of PR-(MA)_{2.4} remaining in PBS after swelling, $w_{\text{PR-(MA)2.4}}$, is calculated as followed.

$$w_{\text{PR-(MA)2.4}} = \frac{I_{\text{PPG}}}{54} \times \frac{w_{\text{maleic acid}} \times M_{\text{PR-(MA)2.4}}}{2M_{\text{maleic acid}}}$$

Where I_{PPG} is the integration of the signal at 1,2 ppm of the poly(propylene glycol) moiety in PR-(MA)_{2.4} on figure 5Y, $M_{\text{PR-(MA)2.4}} = 8116.2$ g/mol and $M_{\text{maleic acid}} = 116$ g/mol.

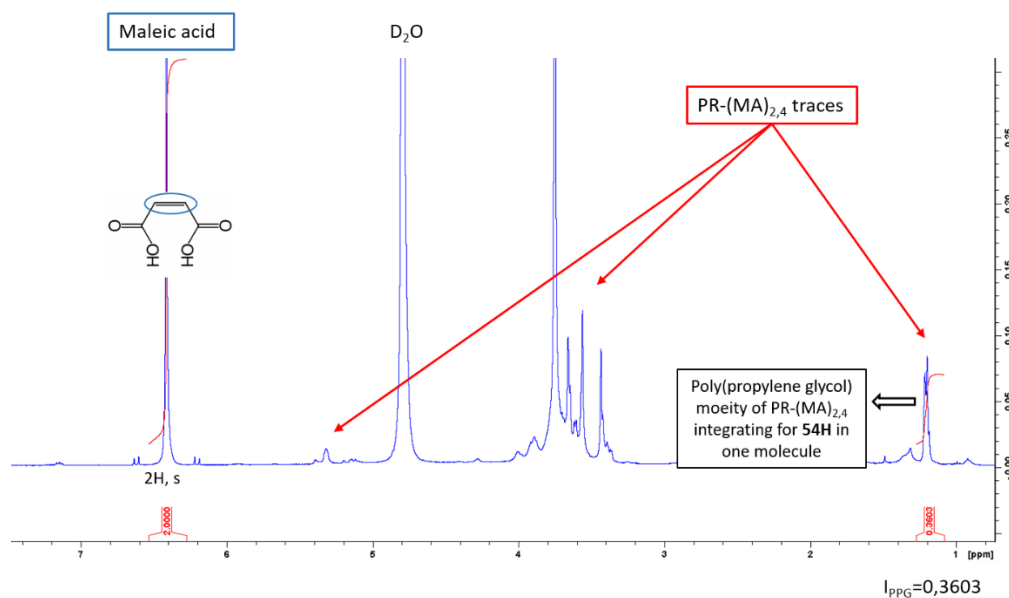


Figure 5.11: NMR spectrum (1H, D₂O, 400 MHz) of the freeze dried PBS solution used for the swelling of PR-(MA)_{2.4} with the maleic acid used as internal standard.

Hence, in this case, the non-reticulated quantity of PR-(MA)_{2.4}, $w_{\text{PR-(MA)2.4}}$ was 0.96 mg

Uniaxial compression experiments

Compression measurements were carried out using a EZ-X Texture Analyzer (SHIMADZU) equipped with a 5 N cell. The hydrogel, in the form of a cylinder (approximately 6 mm diameter and 5 mm initial thickness), was placed on the texture analyzer lower plate and put in contact with the upper plate with a pre-loading force of 0.03N. Measurements were performed at a compression speed of 17 $\mu\text{m/s}$. Compression cycles were performed as follows: the sample was compressed until reaching 10% of deformation, then the upper plate was lifted to the relaxed gel state (0% of deformation). Successive compressions of 20%, 30%, 40% and 50% of deformation then followed on the same sample, each time coming back to the 0% deformation state between each compression. The load and displacement data were collected during each experiment. The normal stress σ_{nominal} was calculated as the normal force divided by the surface area of the material whereas the displacement data were expressed as an extension ratio, $\lambda = (h_0 - \Delta h)/h_0$, where Δh is the displacement data and h_0 the initial gap. The storage modulus G' of the materials could be calculated as the slopes of $\sigma_{\text{nominal}} = f(\lambda - 1/\lambda^2)$ in the linear response of gel.

The reduced stress was calculated by the equation defined below, as described by the Mooney theory.

$$\sigma_{red} = \frac{\sigma_{nominale}}{\lambda - \frac{1}{\lambda^2}}$$

All compression tests were performed on fresh samples.

5.5. Lipid nanoparticles synthesis

5.5.1. Formulation of NLC-Nic and NLC-Thymol

The standard procedure for the synthesis of NLC is described below.

Composition of lipid and aqueous phases

Table 5.1. Composition of the lipophilic and aqueous phase of the NLC-Thymol

Lipophilic Phase			Aqueous Phase	
Thyme Essential Oil			Ultrapure water	Myrj™ S40
Suppocire NC™	(TEO)	Lipoïd s75		
<i>solid lipid</i>	<i>liquid lipid</i>	<i>phospholipids</i>	<i>solvent</i>	<i>hydrophilic surfactant</i>
35 mg	305 mg	65 mg	1250 µL	345 mg

Table 5.2. Composition of a formulation of NLC-Nic at 36,5 g/L

Lipophilic Phase					Aqueous Phase		
Suppocire NC™	Soyabean Oil	Lipoïd s75	Lauric acid	Nicotine	Buffer TAE	Lauric acid	Myrj™ S40
<i>Solid lipids</i>	<i>Liquid lipids</i>	<i>phospholipids</i>	<i>Ionic complex</i>	<i>Active molecule</i>	<i>solvent</i>	/	<i>Hydrophilic surfactant</i>
85 mg	255 mg	65 mg	9,3 mg (1:1 /nicotine)	7,5 mg	3070 µL	Saturated aqueous phase (105 mg)	345 mg

The lipid phase was prepared by mixing solid (Suppocire™ NC) and liquid (Super-refined Soybean oil™ or TEO) glycerides, lipophilic surfactant Lipoid s75™, and the active molecule

dissolved in organic solvent. The aqueous phase was composed of the hydrophilic surfactant, Myrj™ S40 (345 mg), and 1X Tris-Acetate-EDTA aqueous buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1mM EDTA, pH 8.5, qsp 3.07 mL).

In the case of nicotine, the ionic complex between nicotine and lauric acid was first formed at 70°C (7.5 mg of nicotine, 9.3 mg of lauric acid, molar ratio of 1 to 1). Then it was added to the lipophilic phase, homogenized with ethanol (200µL), evaporated and directly used in the NLC formulation.

Sonication

After homogenization at 45°C, both lipid and aqueous phases were crudely mixed and sonication cycles were performed at 45°C during 5 minutes for NLC_Thymol and 10 minutes for NLC_Nicotine with a VCX750 Ultrasonic sonication probe (power output 190 W, 3-mm probe diameter, Sonics).

Purification

For NLC_Thymol, non-encapsulated components were separated from NLC by dialysis (ultrapure water, MWCO: 12 kDa, overnight). Prior to characterization, NLC dispersions were filtered through a 0.22 µm cellulose Millipore membrane. Particle concentration was assessed by weighting freeze-dried samples of NLC obtained from a known volume (typically, 100 µL).

Prior to characterization, NLC_Nicotine dispersions were filtered through a 0.22 µm cellulose Millipore membrane, then centrifugated through an Amicon Ultra Filter (0.5mL, 3kDa, Merck) for 40 min at 4000 rpm to separate non encapsulated contents from NLC. Particle concentration was assessed by weighting freeze-dried samples of NLC obtained from a known volume (typically, 100 µL).

5.5.2. Characterizations

Dynamic Light Scattering Measurements

NLC hydrodynamic diameter and zeta potential were measured at 22°C with a Malvern Zeta Sizer Nano instrument (NanoZS, Malvern, UK) in ultrapure water. Physical stability was investigated by DLS measurements with samples stored at 4°C. At least three different NLC batches were used per condition. Mean average diameters and polydispersity indices

reported were obtained from scattered light intensity results. Data were expressed in terms of mean and standard deviation of all the samples for each condition, each sample result being the mean of three independent measurements performed at 25°C.

Transmission Electron Microscopy

Negatively stained grids were prepared using the stain-on-grid technique. 10 µL of particle dispersion were deposited on a glow discharge grid coated with a carbon supporting film for 3 minutes and the grid was stained with 30 µL of PhosphoTungstate Acid for 2 minutes and the grid was air-dried. The sample was observed by transmission electron microscopy (TEM) with an FEI/Thermo Fisher Scientific Tecnai 12 microscope (LaB6 electron source, 120 kV) equipped with a Gatan Orius 1000 CCD camera.

HPLC quantification of encapsulation efficiency for NLC_Nicotine

Prior to every HPLC analysis, a small aliquot (typically 150 µL) of the studied sample was centrifugated with an Amicon filter (MCWO 3 kDa) to separate non-encapsulated nicotine from NLC_Nicotine. Recovered sample was diluted 30 times in acetonitrile to destabilize the nanoparticles, sonicated for 10 minutes and filtered (0.45 µm PTFE, 13mm of diameter, VWR international).

Analytical HPLC was performed on a HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with a diode array detector (SPD-M20A) set at 254 nm and fitted with Licrosphere RP-18 end-capped column (L = 250 mm, Ø = 4.6 mm, Merck), with flow rates of 0.7 mL/min. The injected volume was 20 µL, the column temperature was set at 25°C. An isocratic elution solvent of H₂O 74%, MeOH 3%, 0,1M acetate buffer (pH=4,5) 20%, acetonitrile 2%, acetic acid 1% and triethylamine to balance the pH at 4.2. In these chromatographic conditions, nicotine eluted at 5.9 min.

For quantitation, a calibration curve was established using 7 concentrations from 5 to 500 µg/mL of a solution of pure nicotine diluted in acetonitrile, each being performed in triplicates. Nicotine was quantitatively detected by UV absorbance at 254 nm in this concentration range.

UV quantification of encapsulation efficiency for NLC_Nicotine

Prior to every HPLC analysis, a small aliquot (typically 150 μL) of the studied sample was centrifugated with an Amicon filter (MCWO 3 kDa) to separate non-encapsulated nicotine from NLC_Nicotine. Recovered sample was diluted 30 times in acetonitrile, sonicated for 10 minutes and filtered (0.45 μm PTFE, 13mm of diameter, VWR international).

UV-absorbance measurement was performed with a UV-Vis spectrophotometer (Cary 300 Scan, Varian) at 260 nm. Prior to the quantification, a calibration curve was established, using 6 different concentrations of pure nicotine diluted in acetonitrile from 1 to 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Nicotine was selectively quantified by UV absorbance at 260 nm in this concentration range.

HPLC quantification of encapsulation efficiency for NLC-Thymol

Prior to every HPLC analysis, a small aliquot (typically 150 μL) of the studied sample was dialyzed to separate non-encapsulated components from NLC (ultrapure water, MWCO: 12 kDa, overnight). Recovered sample was diluted 30 times in acetonitrile to destabilize the nanoparticles, sonicated for 10 minutes and filtered (0.45 μm PTFE, 13mm of diameter, VWR international).

Analytical HPLC was performed with a HPLC Alliance e2695 Waters system equipped with a UV-Vis detector (2489, Waters) set at 274 nm and fitted with a Xterra Shield RP-18 end-capped column (L = 150 mm, \varnothing = 4.6 mm, Waters), with flow rates of 0.8 mL/min. The injected volume was 20 μL , the column temperature was set at 25°C. An isocratic elution solvent of 50% of acetonitrile and 50% of ultrapure water was used. In these chromatic conditions, thymol eluted at 7.6 min.

For quantitation, a calibration curve was established using 7 concentrations from 5 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of a solution of pure thymol diluted in acetonitrile, each being performed in triplicates. Thymol was quantitatively detected by UV absorbance at 274 nm in this concentration range

Ex-Vivo skin permeation study on ear pig skin samples

Ex vivo permeation studies of NLC_Nicotine were carried out at the Center for Innovation in Nanostructured Systems and Topical Administration of the School of Pharmaceutical Sciences

of Ribeirão Preto - University of São Paulo under the supervision of Dr. Renata Fonseca Vianna Lopez using Franz-type diffusion cells (area of 0.95 cm²) with pig ear skin samples.

Ear pig skin samples preparation

Frozen pig ear skin samples of approximately 5 cm diameter were prepared ahead of the experiment with the standardized dermatomization technique. During each skin permeation experiment, two Ag/AgCl electrodes were immersed in the donor and receptor chambers in a 0.1M physiological phosphate buffer PBS at pH=7,4 to measure the electrical resistivity of the skin. A 100 mV AC voltage (RMS) at 10 Hz was generated by a signal generator, and was applied across the two electrodes. The electric current across the skin was measured using a multimeter. The electrical resistance of the skin was then calculated from Ohm's law. The skin resistivity was then obtained by multiplying the actual skin electrical resistance by the skin area (0.95 cm²). Only skin with an initial resistivity > 12 kΩ.cm² was utilized in the permeation studies.

Formulations and control samples

The experiments were performed with 6 cells for NLC_Nicotine formulation and nicotine control. Control samples were a nicotine-loaded chitosan (medium molecular weight between 90 and 150 g/mol) hydrogel (4%_{w/w} in 1%_{w/w} acetic acid aqueous solution). A final experiment with empty lipid nanoparticles formulation was also performed, with only 3 cells.

Ex-Vivo permeation study

Each cell was mounted as follow: pig ear skin was carefully set up between the donor and the receptor chamber with the stratum corneum side facing the donor chamber. The receptor chamber was filled with 16 mL of 0.5 %_{w/w} Tween 80 aqueous solution, stirred during the whole experiment at room temperature. Donor chamber was filled with 0.250 mL of lipid nanoparticles formulations or 250mg of chitosan hydrogels.

After the 16 h, the skin was removed from Franz apparatus, dried with a fine cloth and repetitive (n = 15) removal of the stratum corneum was performed with adhesive tape (3 M, Sumaré, São Paulo, Brazil) 19 mm × 50 m following the standardized tape stripping method. Tapes were immersed in 5mL of acetonitrile, vortexed for 1min, sonicated for 30min, filtered through a 0.45µm PTFE filter and analysed by HPLC.

Dermis and Epidermis were chopped into small pieces in 5mL of acetonitrile, homogenised for 1 minute, sonicated for 30min and centrifuged for 10min (4000g, room temperature). The supernatant was filtered through a 0.45 µm PTFE membrane and quantified by HPLC.

The receptor chamber content was retrieved, filtered with a 0.45µm membrane before being stored for HPLC quantification.

Each formulation was simultaneously tested on 6 Franz cells. Data were expressed in terms of drug permeating per unit area in each skin layer, calculated as mean ± SEM for each formulation.

Ex-Vivo skin permeation study on human skin

NLC_Thymol passive diffusion behavior was tested in France, at the CEA-Leti laboratory, on human skin samples. The procedure is described below.

Formation of Gel_NLC-Thymol

PEG-(MA)₂ (Sigma Aldrich, M = 2000 g/mol, 15 mg, Cm = 100 g/L) was completely diluted in 150 µL of NLC_Thymol nano-suspension. Irgacure 2959 was then added (C_{Irgacure} = 2 g/L) and the mixture was vortexed until complete homogenization. 150 µL of the mixture was cast in the PET mould and placed under UV light for 15 min (60 mW/cm²). Just after formation, the gel was immediately applied to skin sample in *ex-vivo* permeation study.

Ex-Vivo permeation study

Samples of dermatomed human skin from abdomen of consenting donors (about 1.8 cm²) were supplied by Proviskin (Besançon, France) and mounted on a Teflon holder fitted to a Franz cell diffusion cell (Proviskin, Besançon, France). Ex-vivo skin permeation study was performed using cells with an effective diffusion area of 0.503 cm² and a receiver chamber with a capacity of 7 mL. The skin mounted between the donor and acceptor compartments was contacted with 3 different formulations comprising 3.67 mg of thymol, maintaining constant sink conditions in the donor compartment: i) 250 µL of an aqueous solution of thymol at a concentration of 15 mg/mL (Sol_Thymol); ii) an aqueous solution of TEO-NLC at a thymol concentration of 15 mg/mL (TEO-NLC); iii) a poly(ethylene glycol)-methacrylate gel loaded with an aqueous solution of TEO-NLC with a thymol concentration of 15 mg/mL (Gel_TEO-

NLC). The acceptor compartment was filled with 1X PBS at pH=7.4 and continuously stirred by a stirring bar. The whole assembly was set at a constant temperature of 37°C with a circulating water bath. Aliquots of 1 mL were withdrawn at different time intervals from the receptor chamber and analyzed by HPLC for thymol content quantification (cf. HPLC method described above). The receptor phase was replenished with equal volume of fresh acceptor phase at each sample withdrawal.

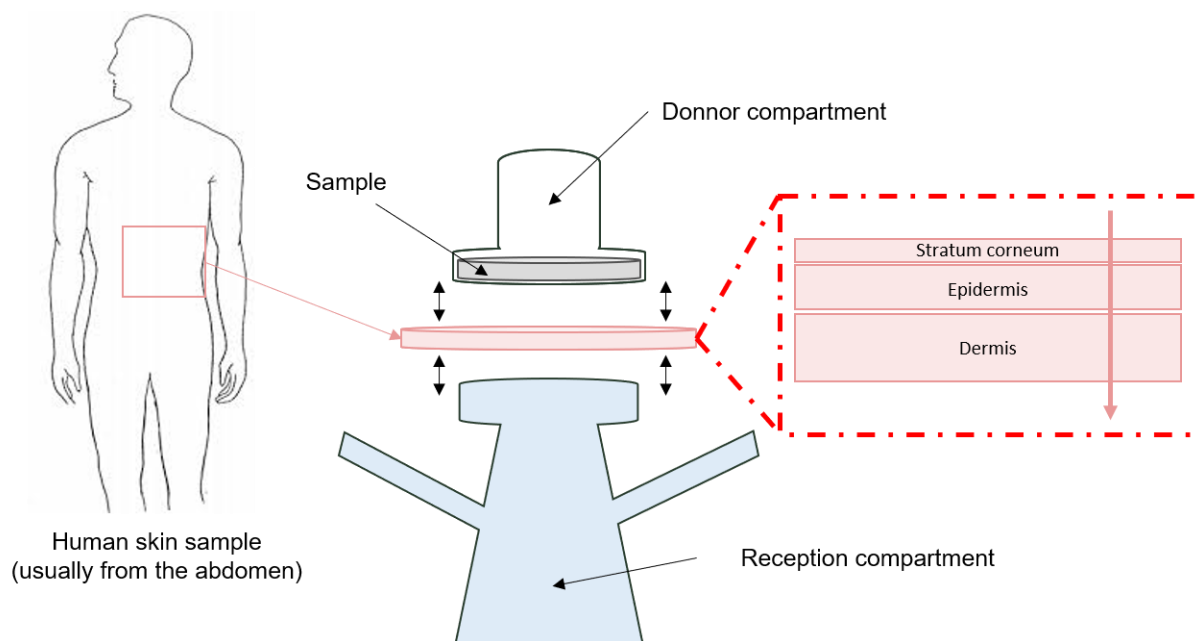


Figure 5.12. Experimental setup of the Ex-vivo Franz cells passive diffusion test through the skin.

Data of the kinetic release study were expressed as the cumulative percentage of the initial amount of thymol applied on the skin sample. The percentage ($\%_{thymol}$), at one given time of withdrawal (t) was calculated thanks to the two following equations:

$$m_{cumulative\ thymol\ (t)} = m_{thymol\ sample\ (t)} + \frac{m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t-1)}}{7}$$

$$\%_{thymol\ (t)} = \frac{m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t)}}{m_{theoretical\ thymol}} \times 100$$

where $m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t)}$ is the cumulative weight of thymol in the reception compartment at an instant t , taking into account the successive withdrawals, $m_{thymol\ sample\ (t)}$ is the weight of thymol quantified by HPLC in the withdrawn sample at instant t , $m_{cumulative\ thymol\ sample\ (t-1)}$ is the cumulative weight of thymol in the reception compartment at the previous sampling time ($t-$

1), and $m_{\text{theoretical thymol}}$ is the theoretical weight of thymol applied on each skin sample (as mentioned earlier, $m_{\text{theoretical thymol}} = 3.67 \text{ mg}$). Experiments were performed in triplicate for each formulation ($n=3$, expressed as mean \pm SEM).

At the end of the experiment (24 hours), excess of product was removed by washing with ultrapure water then the stratum corneum (SC) layer was separated from the epidermis and dermis layers thanks to the standard tape stripping procedure^[45]. The skin samples were fixed on a plane surface and the diffusion area of SC removed with 11 strippings using n° 845 3M-scotch (3M, Cergy-Pontoise, France). The first scotch tape was discarded and the 10 following immersed in 5 mL of acetonitrile. The sample was then sonicated for 1 hour and 1 mL was withdrawn, filtered and analyzed by HPLC to quantify thymol content in SC. The remaining skin sample (composed of the epidermis and dermis layers) was chopped, immersed into 5 mL of acetonitrile, sonicated for 1 hour and centrifugated (10 minutes, 4000 rpm). Finally, 1 mL was withdrawn, filtered and analyzed by HPLC to quantify thymol content.

Each formulation was tested on three different Franz cells. Data were expressed in terms of drug permeating per unit area in each skin layer, calculated as mean \pm SEM for each formulation.

Conclusion Générale

L'objectif de ces travaux de thèse était la conception et la caractérisation de matériaux originaux, capables d'être utilisés en tant que patches transdermiques dans le cadre d'un traitement anti-inflammatoire local, de longue durée, et pluri-journalier. Pour cela, nous avons développé des hydrogels hybrides aux propriétés mécaniques attractives, incluant des polyrotaxanes (PR) fonctionnalisés comme agent de réticulation, ainsi que des nanoparticules lipidiques (NLC) encapsulant des principes actifs hydrophobes, d'une part à l'activité anti-inflammatoire reconnue (thymol), ainsi qu'avec un potentiel intérêt commercial (nicotine). Ce travail de thèse a eu ainsi l'ambition d'explorer différentes facettes de ces matériaux complexes.

La première étape du projet a été la synthèse contrôlée de polyrotaxanes, élément incontournable de la synthèse des hydrogels hybrides. Partant du constat que très peu de gels hybrides décrits dans la littérature explicitent les caractéristiques du polyrotaxane utilisé, nous avons cherché à contrôler le nombre de cyclodextrines enfilées sur le polyrotaxane. Outre l'exploitation stratégique de l'interaction sélective des β -cyclodextrines avec les groupements poly(propylène glycol), trois paramètres dans les conditions de réaction ont été primordiaux. L'optimisation de la synthèse a en effet mis en évidence que le temps, la fonctionnalisation des cyclodextrines (c'est à dire, le nombre de groupements acides carboxyliques présents sur les β -cyclodextrines enfilées) et la quantité de cyclodextrines mise en réaction contrôlent le nombre de cyclodextrines enfilées sur le polyrotaxane en fin de synthèse. L'utilisation approfondie et croisée de plusieurs méthodes (RMN ^1H et ^{13}C à une et deux dimensions, spectrométrie de masse, TEM, AFM) a permis la caractérisation précise des polyrotaxanes synthétisés.

A partir de cette voie de synthèse de polyrotaxanes optimisée, une méthode de formation d'hydrogels hybrides PR-autre polymère a été décidée. La synthèse précédente a été adaptée pour ajouter plusieurs fonctions réactives méthacrylate sur les PR, leur permettant d'être inclus dans le réseau photo-réticulé d'un hydrogel poly(éthylène glycol)-bisméthacrylate. L'hydrogel hybride ainsi développé présente donc deux types de jonctions de réticulation : des jonctions PEG-(MA) $_2$ //PEG-(MA) $_2$ fixes, et des jonctions impliquant les PR-(MA) $_{2,4}$, mobiles. L'ajout de ces jonctions mobiles a modifié les propriétés mécaniques des hydrogels hybrides,

leur conférant une capacité de gonflement plus importante, une élasticité sur une large plage de déformation mécanique en compression et un durcissement de l'hydrogel aux fortes compressions. Les premiers tests ont mis en évidence pour la première fois un comportement atypique des hydrogels, mais le manque de temps et de produits synthétisés liés à la crise sanitaire n'ont pas permis d'approfondir ces résultats préliminaires. La suite des manipulations permettra ainsi d'explorer dans un premier temps une gamme de concentration en polyrotaxanes plus large, mais aussi d'élargir le type de contraintes mécaniques imposé aux hydrogels hybrides : tests en étirement jusqu'à la rupture ou cycliques, sur gels gonflés ou juste après synthèse, ... Toutefois, les résultats présentés dans ce manuscrit indiquent que l'utilisation de ces hydrogels hybrides comme matrice support pour la conception de patches transdermiques apparaît intéressante.

En parallèle, deux formulations avec des particules lipidiques nanostructurées (NLC) encapsulant des principes actifs hydrophobes ont été mises au point.

Les nanoparticules lipidiques encapsulant de la nicotine (NLC_Nic) ont nécessité l'adaptation et l'optimisation de la formulation des NLC habituellement utilisée au laboratoire du CEA-Leti. Une stratégie alternative d'encapsulation de la molécule amphiphile de nicotine a dû être trouvée, utilisant un complexe ionique avec l'acide laurique, pour ancrer la molécule dans le cœur des NLC. Cette méthode a permis la synthèse de NLC avec une efficacité d'encapsulation de 64 %, supérieure aux peu d'exemples d'encapsulation de la nicotine présents dans la littérature scientifique. L'influence des NLC sur la diffusion de la nicotine à travers la peau a été évaluée par des tests de diffusion passive sur cellules de Franz lors d'un stage d'un mois au Brésil, dans le laboratoire du Dr Renata Fonseca Vianna Lopez, à l'Université de Sao Paulo. Les premiers résultats ont montré une pénétration de la nicotine plus efficace avec les NLC, mais l'utilisation d'un échantillon de contrôle avec du chitosan pourrait fausser les résultats. Le chitosan interagit en effet avec la peau et il a ainsi déjà été rapporté qu'il améliore la pénétration à travers la peau et désorganisant la surface du stratum corneum. Ces résultats doivent donc être approfondis et confirmés par de nouvelles manipulations de diffusion à travers la peau, couplées avec des tests de diffusion lorsque les NLC_Nic sont embarquées dans des hydrogels.

Les nanoparticules synthétisées à partir d'huile essentielle de thym (TEO-NLC) ont également permis l'obtention de nanoformulations aqueuses stables et hautement chargées en thymol

(quantité de thymol 4 à 5 fois supérieure à la littérature scientifique actuelle), la molécule active majoritairement responsable de l'activité anti-inflammatoire et antibactérienne de l'huile essentielle de thym. L'influence des NLC sur la diffusion passive du thymol à travers la peau a été évaluée, grâce à la mise en place au laboratoire de tests sur des échantillons de peau humaine couplés à des cellules de Franz. Les nanoformulations de TEO-NLC ont induit une concentration du thymol dans la peau 12 fois supérieure à celle obtenue avec une solution aqueuse. Cette accumulation à la surface de la peau se traduirait par la formation d'une monocouche lipidique semblable à un réservoir de thymol, prolongeant sa diffusion à travers la peau dans le temps. Des essais de diffusion avec les TEO-NLC diluées dans une matrice hydrogel de référence (PEG-MA) ont également été réalisés. Des expériences complémentaires permettront de tester les TEO-NLC dans les hydrogels de référence et hybrides, au repos et sous compression, mimant les mouvements du corps.

Ces expériences, qui n'ont pu être menées à terme faute de temps, essentiellement pour réaliser les synthèses de quantités importantes de PR nécessaires à ces expériences sur les hydrogels hybrides, permettraient d'achever le travail ambitieux entrepris ici. La synthèse des PR en grande quantité est délicate pour plusieurs raisons : -elle demande de nombreuses petites étapes de synthèse préliminaires ; -les techniques de purification actuelles ne sont pas des plus adaptées à la production en grosse quantité des PR. La mise en place de tests de diffusion passive à travers la peau sur cellules de Franz a également été retardée par les restrictions hospitalières liées à la crise sanitaire et les contraintes sur la livraison des échantillons de peau humaine.

Néanmoins, les objectifs initiaux de ce projet de thèse ont pu être mis en œuvre et avancés jusqu'au point de démontrer l'intérêt du concept original et atypique de patches transdermiques à partir d'hydrogels hybrides et de NLC, tant sur la partie matrice résistante mécaniquement que sur la partie encapsulation de principes hydrophobes dans des nanoparticules lipidiques structurées pour favoriser leur diffusion transdermique. Ainsi, ce travail ouvre la voie vers de nouveaux matériaux plus performants pour la réalisation de patches transdermiques, dédiés notamment à une délivrance prolongée de principes actifs à l'action anti-inflammatoire.

Abstract

The local and sustained delivery of a drug of interest requires the use of a conformable support matrix, able to adjust to patient daily movements. This matrix should be biocompatible, resistant, and should show suitable compressive and stretchable properties. New composite materials for the delivery of hydrophobic active pharmaceutical ingredients (API) have been designed from stretchable hydrogels and lipid nanoparticles able to encapsulate high payloads of hydrophobic drugs. The double encapsulation system – API-loaded lipid nanoparticles embedded in a polymer network with stretchable meshes – could achieve finely-tuned control over drug delivery while improving patient compliance. First, water-soluble polyrotaxanes (PR) were synthesised with a controlled number of threaded cyclodextrins thanks to an original method. These PR were further used as cross-linkers in a photo-crosslinked network of poly(ethylene glycol)-methacrylate. This novel polymeric matrix showed increased compressive properties as demonstrated by mechanical tests. In parallel, new formulations of lipid nanoparticles loaded with two API of interest and their drug release profile were studied, for further inclusion in the stretchable hydrogel matrix.

Résumé

La délivrance locale et prolongée d'un principe actif (PA) ne peut être pleinement efficace sans matrice de libération conformable pour s'adapter aux mouvements du patient imposés par sa vie quotidienne. Cette matrice doit donc être biocompatible, résistante à la fatigue, et présenter des propriétés mécaniques adéquates (résistance à la compression, étirabilité). De nouveaux matériaux composites capables de délivrer des principes actifs hydrophobes ont été conçus à partir de matrices hydrogels résistantes à la compression et de nanoparticules lipidiques encapsulant les molécules hydrophobes. Ce système de double encapsulation du PA dans un réseau avec des mailles étirables permettrait d'assurer un contrôle fin sur sa libération tout en améliorant le confort du patient. Nous avons d'abord synthétisé et caractérisé des polyrotaxanes (PR) solubles dans l'eau grâce à une méthode originale contrôlant le nombre de cyclodextrines enfilées. Ces PR ont ensuite été utilisés comme agents de réticulation dans un réseau de poly(éthylène glycol)-methacrylate photo-réticulé pour obtenir une matrice hydrogel dont les propriétés de résistance à la compression ont été mises en évidence par des essais mécaniques. Un travail parallèle sur la formulation de nanoparticules lipidiques encapsulant deux molécules d'intérêt et leur profil de libération du PA a été mené pour leur inclusion dans les matrices hydrogels.