UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant »

Dans l'équipe Nanomédicaments et Nanosondes (EA6295)

THÈSE présentée par :

Louise VAN GHELUWE

soutenue le : **22 octobre 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Développement et étude de systèmes d'encapsulation d'actifs cosmétiques

THÈSE dirigée par :

Mme MUNNIER Emilie	Professeur des universités, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Mme BEGU Sylvie	Maître de conférences HDR, Université de Montpellier 1
M. GRISEL Michel	Professeur des universités, Université Le Havre Normandie

---

JURY :

Mme BEGU Sylvie	Maître de conférences HDR, Université de Montpellier
M. CHOURPA Igor	Professeur des universités, Université de Tours
M. GRISEL Michel	Professeur des universités, Université Le Havre Normandie
Mme HAMOUDI Mounira	Maître de conférences, Université de Lille
Mme MUNNIER Emilie	Professeur des universités, Université de Tours
M. TATIBOUET Arnaud (président)	Professeur des universités, Université d'Orléans

MEMBRE INVITE :

M.BUCHY Éric	Laboratoires ERIGER, Saint-Avertin

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir étudier avec attention mon travail. Merci pour leur présence, pour leur lecture attentive de ma thèse ainsi que pour les remarques qu'ils m'ont adressé lors de cette soutenance afin d'améliorer mon travail.

Je tiens à remercier Igor Chourpa, Professeur à l'Université de Tours et directeur de l'EA 6295 « Nanomédicaments et Nanosondes », de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir initié aux techniques spectroscopiques. Merci pour ses précieux conseils et sa disponibilité pour répondre à mes questions.

J'exprime mes sincères remerciements à Emilie Munnier, directrice de thèse à l'emploi du temps chargé, qui a su trouver la disponibilité nécessaire pour me guider, me conseiller et m'orienter. Emilie m'a toujours soutenu, s'est montrée rassurante lors des moments de doutes et enthousiaste lors des avancées significatives durant ma thèse. Merci pour toute la confiance qu'elle m'a accordée, que ce soit dans les expériences, les rédactions ou la réalisation de TP.

Merci au Programme CosmétoSciences et particulièrement à Emmanuelle Percheron. Merci à la Région Centre-Val de Loire pour avoir financé le projet MISTIC. Dans ce projet, je tiens à remercier les partenaires académiques (l'équipe ICOA, ICMN et iBrain) et industriels (BioEurope (groupe Solabia) et Transderma Systems). Merci notamment à Alain Boucaud avec qui, bien qu'il y ait eu peu d'échanges, c'était un plaisir de discuter.

Un grand merci à Franck Bonnier pour sa disponibilité, son aide et les discussions scientifiques concernant la partie Raman. Je tiens à élargir mes remerciements à l'ensemble de l'équipe EA 6295 « Nanomédicaments et Nanosondes ». Merci tout d'abord aux moins jeunes. Un grand merci à Martin Soucé pour l'encadrement en chimie analytique et notamment en CLHP. Son expertise dans le domaine se reflétait dans les réponses à mes questions ; des réponses claires et détaillées. Enfin, merci de m'avoir fait confiance pour réaliser certains TP de la licence Pro. Merci à Stéphanie David pour sa disponibilité et ses conseils concernant ce « fameux » plan d'expériences. Merci au duo, Emilie Allard-Vannier et Katel Hervé-Aubert pour leur bonne humeur quotidienne et leurs encouragements. Merci à Hervé, grâce à qui il m'était possible de rester tard certains soirs. Merci à Xavier et Jean-François pour leur disponibilité mais surtout leur humour (décalé ?)! Merci à eux pour m'avoir épaulée pendant les TP. Merci à Éric pour son encadrement en chimie organique.

Place aux jeunes ! Merci aux stagiaires qui ont contribués à la fois à la vie de recherche du labo mais surtout à la bonne ambiance générale : Coline, Somaya, Youssri, Tao, Nia, Joacquim, La(r)hcen, Marianne, etc. NMNS c'est un laboratoire où se croisent cultures et personnalités très hétéroclites. Ces trois ans passés dans cet univers enrichissant m'ont ouvert les portes et les yeux sur d'autres mondes. Merci aux soudanaises,

Alaa, Suha et Sahar d'avoir été là, toujours souriantes ! Petite mention spéciale à Sahar avec qui c'était un plaisir d'échanger sur la vie de tous les jours, notamment du syndrome de l'imposteur. J'espère qu'on ira se faire cette pièce de théâtre ! Merci à Vinh et Iveta, mes collègues de bureau pour votre présence et nos échanges quotidiens. Merci à Ayyoub dont le caractère et réflexions m'auront bien fait rire. Parmi les personnes du labo qui ont contribué à rendre ma thèse des plus agréables, je remercie sincèrement Hichem, Yohan et « Manu ». Je suis très heureuse d'avoir eu l'opportunité de discuter et d'échanger sur des sujets divers et variés. C'était un plaisir de discuter cuisine et organisation mariage avec Yohan. Hichem, « Qui aime bien châtie bien » est sûrement l'expression qui nous définit le mieux. Merci Manu pour nos discussions (plus ou moins) intéressantes ! Merci aux doctorants/post-doc/ingénieurs qui ne sont dorénavant plus dans le laboratoire mais qui auront marqué ma thèse : Lynda pour m'avoir entraîné dès mon arrivée à l'Orange Bleue, Sandra pour sa gentillesse, Almar et Sanaa pour avoir tenté de m'apprendre quelques paroles de chansons en arabe, Yuri pour son calme et son humour, et Mathias pour avoir été Mathias.

Un peu plus loin dans le couloir, j'aimerais remercier l'ensemble des permanents de l'équipe SIMBA et notamment Leslie, Emilie, Pierre-Olivier et Isabelle. Dans cette équipe, j'ai notamment trouvé une amie ; Laura. J'ai partagé des soirées, des repas, de la danse mais surtout des galères. Ma thèse n'aurait pas été la même sans toi à mes côtés. Encore un peu plus loin dans le couloir (avant déménagement !), je tiens à remercier une grande partie de l'équipe IMT/McSaf. D'un point de vue scientifique, un grand merci à Cécile et Sylvain pour leur aide en chimie organique. D'une manière générale, merci de m'avoir accueilli dans votre salle de pause et surtout merci pour la bonne ambiance ! Je n'oublierais pas le rire communicateur de Cécile, les blagues foireuses d'Ofélia, les sifflotements de Sylvain, l'agacement quotidien de Steeve, etc. Merci, merci, merci à : Cécile, Stéphanie, Badia, Gildas, Sylvain, Steeve, Nicolo, Etienne, Imen, Estelle, Christine, Ofélia et j'en oublie sûrement (volontairement).

On sort maintenant du labo. Merci à Ofélia et José. Des connaissances qui sont devenus des amis. Merci pour les soirées match de foot (sans trop regarder), pour les apéros, l'escalade (plutôt les burgers),… et on espère des vacances. Merci à mes *chiquitas*, Magali, Madeleine et Mathilde. A nos week-end trimestriels, nos parties d'escape game, nos soirées au camping ! Merci à toute la « team » de Fontainebleau ! Il était de plus en plus difficile de tous vous retrouver mais c'était à chaque fois un plaisir et une bouffée d'oxygène. Merci à mes témoins, Lalia et Audrey, d'avoir été présentes tout du long. Loin des yeux, près du cœur.

Merci à ma famille qui depuis le début me voyait exercer un métier d'humoriste et non pas de chercheur. Je vous aurais surpris jusqu'au bout en réalisant une thèse ! Merci à mes grands-parents de m'avoir encouragé. Voir la fierté dans vos yeux est ce qui me rend le plus fière. Merci à ma belle-famille et notamment Carmo, Hubert et Thomas. Toujours à se soucier de mon bien-être durant ces 3 années de thèse.

The last but not the least. Merci à Vincent sans qui je n'aurais jamais tenté cette folle aventure qu'a été la thèse. Toujours là à m'encourager, à me redonner confiance en moi, à m'aider et me pousser dans mes raisonnements. Tout simplement, merci d'avoir été et d'être mon pilier.

Résumé

L'encapsulation des actifs cosmétiques dans des nanosystèmes polymères pourrait permettre de répondre aux besoins des consommateurs qui recherchent des soins cosmétiques sûrs, efficaces et innovants. Cette thèse propose des réponses à deux défis rencontrés dans l'industrie cosmétique 1) concevoir une nouvelle génération de produits cosmétiques personnalisés permettant une libération stimulée d'actifs cosmétiques, et 2) développer des approches analytiques capables d'évaluer la pertinence et l'efficacité de ces nouvelles formes cosmétiques. La première partie de cette thèse concerne donc le développement d'un nanosystème polymère conçu pour répondre à une variation du potentiel redox des cellules de la peau, à l'origine de la libération de l'actif encapsulé. Pour cela, une synthèse organique en trois étapes a été mise au point afin de produire un mélange de polymères sensible à une élévation du potentiel réducteur du milieu. Ce mélange stimuli-sensible a ensuite été utilisé pour encapsuler un actif hydrophobe, le rétinol, par nanoprécipitation. Le caractère stimuli-sensible du nanosystème a été confirmé. Pour finir, l'impact des caractéristiques physico-chimiques du mélange polymères (taille des blocs polymères, ratio et concentrations) sur l'élaboration d'un nanosystème stimuli-sensible a été investigué. La seconde partie de ce travail est focalisée sur l'utilisation de techniques microspectroscopiques pour la caractérisation et l'objectivation de formules cosmétiques chargées en nanosystèmes polymères. Tout d'abord, des nanosystèmes polymères ont été incorporés dans un produit fini de type film et la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman a été utilisée pour étudier la distribution de l'actif au sein du film. D'autre part, les performances de cette technique pour effectuer une analyse semi-quantitative de ces films chargés en actif encapsulé ont été explorées. Enfin, la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale de fluorescence a été utilisée pour évaluer l'intérêt de l'utilisation de nanosystèmes polymères pour véhiculer des actifs ou colorants dans la fibre capillaire.

Mots clés : encapsulation, actifs cosmétiques, nanosystèmes polymères, libération stimulée, imagerie, microspectroscopie confocale Raman et de fluorescence.

Abstract

The encapsulation of cosmetic active ingredients in polymer nanosystems could meet the needs of consumers who are looking for safe, effective and innovative personal care. This PhD thesis proposes answers to two challenges encountered in the cosmetics industry 1) design a new generation of personalized cosmetic products allowing a triggered release of cosmetic active ingredients, and 2) develop analytical approaches capable of evaluating the relevance and the effectiveness of these new cosmetic forms. The first part of this PhD thesis concerns the development of a polymeric nanosystem designed to respond to a variation in the redox potential of skin cells, at the origin of the release of the encapsulated active ingredient. To achieve this, a three-step synthesis was developed and produced a blend of polymers sensitive to an increase in the reducing level of the medium. This stimuli-sensitive polymer blend was then used to encapsulate a hydrophobic active ingredient, retinol, by nanoprecipitation. The stimuli-sensitive nature of the nanosystem was confirmed. Finally, the impact of physico-chemical characteristics of the polymer blend (size of the polymer blocks, ratio and concentrations) on the development of an efficient stimuli-sensitive encapsulation system was investigated. The second part of this work is focused on the use of microspectroscopy techniques for the characterization and to demonstrate the efficacy of cosmetic products loaded with polymeric nanosystems. First, polymeric nanosystems were incorporated into an end film-like product and the confocal Raman microspectroscopy imaging technique was used to study the distribution of the active within the film. On the other hand, the performance of this technique to provide a semi-quantitative analysis of these films loaded with encapsulated active ingredient was explored. Finally, confocal fluorescence microspectroscopy imaging technique was used to evaluate the interest of using polymeric nanosystems to convey active agents or dyes in the hair fiber.

Key words: encapsulation, cosmetic active ingredients, polymeric nanosystems, triggered release, imaging, confocal fluorescence/Raman microspectroscopy

Liste des communications

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Acceptées

- L. Van Gheluwe, E. Munnier, H. Kichou, K. Kemel, F. Mahut, M. Vayer, C. Sinturel, H.J. Byrne, F. Yvergnaux, I. Chourpa, F. Bonnier. Confocal Raman spectroscopic imaging for evaluation of distribution of nano-formulated hydrophobic active cosmetic ingredients in hydrophilic films. Molecules, 2021, 26 (24), 7440. (IF 2020 : 4.412)
- L. Van Gheluwe, I. Chourpa, C. Gaigne, E. Munnier. Polymer-based smart drug delivery systems for skin application and demonstration of the stimuli-responsiveness. Polymers, 2021, 13 (8), 1285. (IF 2020 : 4,329)
- L. Van Gheluwe, E.Buchy, I. Chourpa, E. Munnier. Three-Step Synthesis of a Redox-Responsive Blend of PEG–block–PLA and PLA and Application to the Nanoencapsulation of Retinol. Polymers, 2020, 12 (10), 2350. (IF 2020 : 4,329)
- E. Munnier, A. Al Assaad, S. David, F. Mahut, M. Vayer, L. Van Gheluwe, F. Yvergnaux, C. Sinturel, M. Soucé, I. Chourpa, F. Bonnier. Homogeneous distribution of fatty ester-based active cosmetic ingredients in hydrophilic thin films by means of nanodispersion. International Journal of Cosmetic Science, 2020, 42 (5), 512-519. (IF 2020 : 1,673)

Soumise dans *Pharmaceutics*

- L. Van Gheluwe, S. David, E. Buchy, I. Chourpa and E. Munnier. Redox-responsive PEG-block-PLA/PLA nanosystems: impact of the characteristics of the polymer blend on the stimuli-responsiveness.

PROCEEDING

- Stimuli-responsive encapsulation systems as a new way to customized beauty. L. Van Gheluwe, E. Buchy, M. Soucé, S. Asstito, A. Al Assaad, I. Chourpa, A. Boucaud, F. Yvergnaux, E. Munnier. IFSCC Virtual Congress, 21-30 octobre 2020 (initialement prévu à Yokohama, Japon).

POSTERS

- Matériaux intelligents pour la libération stimulée de bioactifs cosmétiques. F. Bonnier, C. Tauber, A. Al Assaad, F. Mahut, A. Stella, F. Ta, L. Van Gheluwe, A. Tatibouet, C. Sinturel, F. Yvergnaux, A. Boucaud, E. Munnier. Colloque Cosmétosciences (Orléans, 15 février 2019).
- Nanomicelles de PEO-PPO-PEO : caractéristiques et propriétés thermosensibles. L. Van Gheluwe, E. Buchy, S. Asstito, M. Soucé, K. Hervé-Aubert, I. Chourpa, E. Munnier. Colloque RITS 2019 (Tours, 20-22 mai 2019)

- Thermoresponsive nanomicelles prepared by a green emulsion-evaporation process for a cosmetic use. L. Van Gheluwe, E. Buchy, S. Asstito, S. Altindag, F. Yvergnaux, K. Hervé-Aubert, M. Soucé, I. Chourpa, E. Munnier. Skin and Formulation 5th Symposium & 17th Skin Forum (23-24 Septembre 2019, Reims, France).
- Nanomicelles de PEO-PPO-PEO : caractéristiques et propriétés thermosensibles. L. Van Gheluwe, E. Buchy, S. Asstito, M. Soucé, K. Hervé-Aubert, I. Chourpa, E. Munnier. 32ème Colloque Biotechnocentre (Seillac, 10 - 11 Octobre 2019)
- Thermoresponsive nanomicelles prepared by a green emulsion-evaporation process for a cosmetic use. L. Van Gheluwe, E. Buchy, S. Asstito, K. Hervé-Aubert, M. Soucé, F. Yvergnaux, I. Chourpa, E. Munnier. Skin Models in Cosmetic Science: Bridging Established Methods and Novel Technologies, Le Studium Conference (Tours, 2-4 Décembre 2019)
- Synthesis of a Redox-Responsive Blend of Polymers and Application to the Nanoencapsulation of Retinol. L. Van Gheluwe, E. Buchy, I. Chourpa, A. Boucaud, F. Yvergnaux, E. Munnier. 12th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical technology online conference (11-14 mai 2021 initialement prévu à Vienne, Autriche)

COMMUNICATIONS ORALES

- Des polymères intelligents au service de la cosmétique : exemple d'un polymère thermosensible. L. Van Gheluwe*, E. Buchy, M. Soucé, S. Asstito, A. Al Assaad, I. Chourpa, E. Munnier. 40èmes journées de la Section Grand Ouest du Groupe Français d'Études et d'Applications des Polymères (GFP) (Orléans, 23-24 mai 2019)
- **(pitch)** Nanomicelles de PEO-PPO-PEO : caractéristiques et propriétés thermosensibles. L. Van Gheluwe, E. Buchy, S. Asstito, M. Soucé, K. Hervé-Aubert, I. Chourpa, E. Munnier. 32ème Colloque Biotechnocentre (Seillac, 10 - 11 Octobre 2019)
- **(pitch)** Thermoresponsive nanomicelles prepared by a green emulsion-evaporation process for a cosmetic use. L. Van Gheluwe, E. Buchy, S. Asstito, K. Hervé-Aubert, M. Soucé, F. Yvergnaux, I. Chourpa, E. Munnier. Skin Models in Cosmetic Science: Bridging Established Methods and Novel Technologies, Le Studium Conference (Tours, 2-4 Décembre 2019)
- Stimuli-responsive encapsulation systems as a new way to customized beauty. L. Van Gheluwe, E. Buchy, M. Soucé, S. Asstito, A. Al Assaad, I. Chourpa, A. Boucaud, F. Yvergnaux, E. Munnier. IFSCC Virtual Congress, 21-30 octobre 2020 (initialement prévu à Yokohama, Japon)

Table des matières

Remerciements 1
Résumé 4
Abstract 5
Liste des communications 6
Liste des abréviations 11
Liste des Figures 12
Liste des Tableaux 14
Introduction Générale 15
1. La peau, voie d'administration de molécules actives 16
1.1. Structure de la peau 16
1.2. Absorption cutanée 18
2. La (nano)vectorisation 19
2.1. Les avantages de l'échelle nanométrique en Cosmétique 20
2.2. Les principaux nanosystèmes utilisés en Cosmétologie 21
2.3. Les défis du développement de produits (dermo-)cosmétiques. 23
3. Les objectifs de la thèse 24
PARTIE 1 : Etude bibliographique 27
Préambule de la revue 28
Revue : "Polymer-based smart drug delivery systems for skin application and demonstration of the stimuli-responsiveness" 29
PARTIE 2 : Développement d'un nanosystème stimuli-sensible pour une application topique 60
Introduction 61
1. Intérêt du stimulus redox en pharmaceutique et cosmétique 61
2. Les liaisons sensibles au potentiel redox des cellules 61
3. Les systèmes sensibles au potentiel redox et leurs applications 62
3.1. Les systèmes lipidiques 62
3.2. Les systèmes polymères 62
Chapitre 1 : Voies explorées pour la synthèse du polymère mPEG-SS-PLA 64
1. Stratégie 1 – utilisation de polymères commerciaux et insertion d'un bras espaceur -SS- 64
2. Stratégie 2 65
2.1. Polymérisation du lactide - généralités 65
2.2. Stratégie de synthèse 2 67
3. Stratégie 3 – polymérisation du lactide à partir du polymère mPEG-SS-$(CH_2)_2$-OH 69
Chapitre 2 : Synthèse en trois étapes de mélanges stimuli-sensibles polymères (mPEG-SS-PLA/PLA) 71
Article 1 : "Three-Step Synthesis of a Redox-Responsive Blend of PEG–block–PLA and PLA and Application to the Nanoencapsulation of Retinol" 73
Article 2 : "Redox-responsive PEG-block-PLA/PLA nanosystems: impact of the characteristics of the polymer blend on the stimuli-responsiveness" 92
Conclusion et perspectives 109

PARTIE 3 : Caractérisation et évaluation de formulations chargées en nanosystèmes polymères. 111
Introduction 112
1. Généralité sur les Poloxamères 112
2. Formulation de nanomicelles de poloxamères 113
Chapitre 1 : Caractérisation de nanosystèmes polymères incorporés dans un film cosmétique 115
1. Incorporation de nanosystèmes polymères dans des films cosmétiques 115
1.1. Intérêt des films cosmétiques 115
1.2. Contrôle qualité des films cosmétiques 116
1.3. Objectifs du chapitre 117
2. Bases théoriques de la spectroscopie Raman 118
2.1. Principe de la diffusion Raman 118
2.2. Imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) 119
3. Analyse semi-quantitative de la distribution d'un actif nanoencapsulé dans un film mince par Imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) 119
Article 3 : "Confocal Raman spectroscopic imaging for evaluation of distribution of nano-formulated hydrophobic active cosmetic ingredients in hydrophilic films" 121
4. Propriétés mécaniques et caractérisation du mouillage des films 140
4.1. Propriétés mécaniques du film 141
4.2. Mesure de la mouillabilité des films par goniométrie 143
Conclusion et perspectives 146
Chapitre 2 : Etude préliminaire de caractérisation et objectivation de nanosystèmes de polymères pour une application capillaire par imagerie de fluorescence 147
1. Développement de nanosystèmes pour des produits capillaires 147
1.1. Généralité sur le cheveu 147
1.2. Des nanosystèmes pour une application capillaire 148
1.3. Méthodes d'analyse *in vitro/in vivo* du cheveu 149
2. Objectifs de l'étude 150
3. Matériel et Méthodes 151
3.1. Matériels 151
3.2. Modification chimique du Pluronic® commercial F127 151
3.3. Formulation de nanomicelles de polymères 152
3.4. Etude préliminaire de l'intérêt de l'imagerie confocale de fluorescence pour évaluer l'intérêt des nanosystèmes pour une application capillaire 152
4. Résultats et Discussion 153
4.1. Modifications chimiques et caractérisations 153
4.2. Préparation de nanomicelles par méthode d'émulsion-évaporation de solvant 155
4.3. Imagerie confocale de fluorescence pour évaluer l'intérêt des nanosystèmes pour une application capillaire 156
5. Conclusion et Perspectives 163
Discussion générale de la thèse 165
1. Rendre la synthèse organique des polymères plus éco-responsable 167

1.1. Choix des polymères 168
1.2. Choix des solvants 168
1.3. Choix des procédés utilisés 169
2. Formulation 170
2.1. Choix du procédé de formulation des nanosystèmes 170
2.2. Choix des composants de la formule cosmétique 171
3. Caractérisation des nanosystèmes et/ou formules – vers une analyse éco-responsable 172
Conclusion générale de la thèse 174
Bibliographie 177
Annexe 187

Liste des abréviations

Composés Chimiques

CDI : 1,1'-Carbonyldiimidazole
$CDCl_3$: Chloroforme deutéré
DBU : 1,8-Diazabicyclo [5.4.0)-undec-7-ène
DCM : dichlorométhane
DMAP : N,N diméthylaminopyridine
EtOH : éthanol
EtOAc : Acétate d'éthyle
MeOH : Méthanol
PBS : Tampon phosphate salin (en anglais, *phosphate buffered saline*)
PEG : polyéthylène glycol
PEO : poly(oxyde d'éthylène)
PLA : acide polylactique
PPO : poly(oxyde de propylène)
PVA : Poly(alcool vinylique)
TBD : 1,5,7-triazabicyclo-[4.4.0]déc-5-ène
THF : tétrahydrofurane
TNBS : acide 2,4,6-trinitrobenzenesulfonique
$Sn(Oct)_2$: bis(2-éthylhéxanoate d'étain)

Acronymes et symboles

ACI : ingrédient actif cosmétique
D_H: diamètre hydrodynamique
CMC : concentration micellaire critique
CMT : température micellaire critique
HLB : *Hydrophilic-Lipophilic Balance*
FDA : *Food and Drug Administration*
LCST: *lower critical solution temperature*
Mn: masse molaire moyenne en nombre
MWCO : *moleculair wieght cut-off*
NS : nanosystème(s)
PdI : indice de polydispersité
pH: potentiel hydrogène
pKa: constante d'acidité
ROP : polymérisation par ouverture de cycle (en anglais, *ring opening polymerization*)
ROS : Espèces réactives de l'oxygène (en anglais, *reactive oxygen species*)
SDDS: systèmes polymères intelligents (en anglais, *smart drug delivery systems*)
TA : température ambiante
UCST: *upper critical solution temperature*
UV : Ultra-violet
UE : Union Européenne
ZP : *zêta potential*
λ: longueur d'onde
ρ: masse volumique

Techniques de caractérisation

ATR*: attenuated total reflection*
DLS: *dynamic light scattering*
FTIR: *Fourier transform Infrared spectroscopy*
CLHP: Chromatographie liquide haute pression
IR : Infrarouge
RMN: *resonance magnetic nuclear spectroscopy*
TEM: *transmission electron micrograph*
UV-Vis: *ultraviolet-visible spectroscopy*

Liste des Figures

Figure 1: Représentation de la structure de la peau humaine (Mélissopoulos et al., 2012) 16
Figure 2: Représentation schématique des voies de pénétration de molécules à travers le stratum corneum. 18
Figure 3: Présentation des points positifs des nanocosmétiques 20
Figure 4: Analyse rétrosynthétique de la Stratégie 1 pour synthétiser le copolymère mPEG-SS-PLA 64
Figure 5: Schéma de la synthèse du mPEG-b-PLA 65
Figure 6: A. Structure de l'initiateur de $Sn(Oct)_2$ formé en présence d'un alcool. B. Mécanisme de coordination-insertion dans le cadre de la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) : (1) coordination du monomère (lactide) avec le centre métallique, (2) liaison métal-alcoolate via une addition nucléophile, (3) ouverture du cycle du monomère via le clivage acyl-oxygène et (4) insertion continue de monomères. 66
Figure 7: Catalyseurs à base d'amidine (DBU), de guanidine (TBD) et d'un motif thiourée (Takemoto) 67
Figure 8 : Analyse rétrosynthétique de la Stratégie 2 pour synthétiser le copolymère mPEG-SS-PLA 67
Figure 9: Résultats RMN ^1H de la polymérisation du lactide à partir du composé 1 et de différents types de catalyseurs. Les étoiles correspondent à du solvant résiduel (ici THF). 69
Figure 10: Analyse rétrosynthétique de la Stratégie 3 pour synthétiser le copolymère mPEG-SS-PLA 69
Figure 11: Technique de nanoprécipitation 71
Figure 12: Structure des Poloxamères® (PEG pour polyéthylène glycol et PPO pour poly(oxyde de propylène)) 112
Figure 13: Formulation de nanomicelles de Pluronic® F127 chargées en actif lipophile à l'aide de la méthode dite d'émulsion-évaporation de solvant. Successivement, 1. Mélange de la phase aqueuse et de la phase organique, 2. Emulsion assistée par ultrasons et 3. Evaporation du solvant organique. 114
Figure 14: Structure du punicate de tyrosol (isomère ZEZ) 117
Figure 15: Phénomènes de diffusion de la lumière 118
Figure 16: De la formation du film à son analyse Raman 120
Figure 17: Cartographies d'intensité en z des bandes caractéristiques des composés principaux des films à base de PVA 139
Figure 18: Montage de l'étude d'étirement des films PVA-GS 141
Figure 19: Résultats typiques obtenus après étirement du film PVA-GS, chargé ou non en nanosystèmes NanoPHE – Représentation de la force exercée par la sonde pour étirer le film à 100% de sa longueur en fonction du temps du test 142
Figure 20: Résultats typiques obtenus après étirement du film PVA-GS, chargé ou non en nanosystèmes NanoPHE - Représentation de la force exercée par la sonde pour étirer le film à 100% de sa longueur en fonction de la distance parcourue (mm). 142
Figure 21: Angle de contact θ_A entre une surface solide et un liquide 143
Figure 22: Profil de l'angle de contact de l'eau en fonction de l'hydrophilie de la surface 143
Figure 23: Méthode dépôt-goutte 144
Figure 24 : Images typiques obtenues après dépôt d'une ou de 5 gouttes d'eau distillée sur un film PVA-GS chargé en NanoPHE ou sur des films contrôles PVA-GS (sans nanosystèmes). 145
Figure 25: Structure du cheveu (https://activilong.com) 147
Figure 26: Synthèse du $PF127\text{-}NH_2$ 153
Figure 27: Spectre RMN ^1H du PF127 commercial (bas) et du $PF127\text{-}NH_2$ (haut) dans le chloroforme deutéré 154
Figure 28 : Chromatogramme CLHP-UV du dosage des amines terminales du $F127\text{-}NH_2$. En rose, les amines terminales du Pluronic modifié après réaction avec le TNBS. En violet, l'éthylènediamine après réaction avec le TNBS. 154
Figure 29: Intensité moyenne de fluorescence du rouge de Nile (NR) sur des cheveux blancs (n = 3) incubés 10 minutes dans une solution éthanol de NR (abrégée NR éthanol) ou dans la suspension de nanomicelles $PF127\text{-}NH_2$ (2%) (abrégée NanoNR). 156
Figure 30 : Spectres caractéristiques d'émission de fluorescence des NanoNR dispersées en solution aqueuse (trait plein, émission max. à 629 nm) ou séchées à température ambiante (~ 20°C) (trait pointillé, émission max. à 617,5 nm). 157

Figure 31: Spectres caractéristiques d'émission de fluorescence du rouge de Nile à partir de divers endroits sur/dans les fibres capillaires incubées pendant 10 min avec la nanosuspension NanoNR et séchées à l'air libre. 158
Figure 32: A. Image en lumière blanche (objectif x50) d'une zone sélectionnée (traits pointillés) à la surface d'une fibre capillaire incubée 10 mn dans la suspension de NanoNR et séchée à l'air libre. B. Cartes de fluorescence de la zone sélectionnée. En haut : intensité de fluorescence globale ; en bas : superposition de cartes de trois spectres caractéristiques (modèles rouge, vert et bleu montrés dans la fenêtre C). C. Spectre moyen de la zone reconstitué avec une combinaison des trois spectres modèles : les coefficients de la reconstitution (% de contribution) sont montrés en haut à gauche du spectre. 159
Figure 33: A. Image en lumière blanche (objectif x50) d'une zone sélectionnée (trait pointillé) sur une fibre capillaire incubée 10 mn dans la suspension de NanoNR et séchée à l'air libre. B. Cartographie spectrale de fluorescence d'une coupe optique du cheveu située à 5 micromètres sous la surface de la fibre. Gauche : intensité globale de fluorescence - droite : superposition de cartes des trois spectres caractéristiques (modèles rouge, vert et bleu montrés dans la fenêtre C). C. Spectre moyen de la zone reconstituée avec une combinaison des trois spectres modèles : les coefficients de la reconstitution (% de contribution) sont montrés en haut à gauche du spectre. 159
Figure 34 : Spectres d'émission de fluorescence caractéristiques du rouge de Nile chargé au sein de nanomicelles de polymères commerciaux (PF127, en gris) ou modifiés (PF127-NH_2, en noir) dispersées en solution aqueuse. 160
Figure 35: Image en lumière blanche (objectif x10) d'une zone sélectionnée (trait jaune) sur une fibre capillaire incubée 10 mn dans la suspension de nanomicelles modifiées (PF127-NH_2) et séchée à l'air libre. A. Image en lumière blanche de la surface de la fibre capillaire (contours de la fibre nets, surface au milieu claire). B. Image en lumière blanche du cœur de la fibre capillaire (repère : la medulla noire aux bords nets). 161
Figure 36: Intensité moyenne de fluorescence du rouge de Nile (n > 5), à la surface ou au cœur de fibres capillaires incubées 10 mn dans la suspension de nanomicelles dites modifiées (PF127-NH_2, en noir) ou commerciales (PF127, en gris) et séchées à l'air libre. *$p < 0.05$ (test de Student) 162
Figure 37: Intensité moyenne de fluorescence du rouge de Nile (n > 5), à la surface ou au cœur de fibres capillaires incubées 10 mn dans la suspension de nanomicelles dites modifiées (PF127-NH_2, en noir) ou commerciales (PF127, en gris), puis rincées 2 mn à l'eau et séchées à l'air libre. 162

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Liste non exhaustive d'études récemment publiées concernant le développement de nanosystèmes pour une application topique 22
Tableau 2 : Liste non exhaustive d'études récemment publiées concernant le développement de nanosystèmes sensibles à une élévation du niveau réducteur 62
Tableau 3 : Conditions réactionnelles pour produire le composé 2 de la stratégie 2 68
Tableau 4: Caractéristiques structurelles et CMC (à 37°C) de certains poloxamères 113
Tableau 5 : Allongement du film (en mm) en fonction du nombre d'étirement exercé sur le film 143
Tableau 6: Caractéristiques des lots de nanomicelles de polymères préparés 155

Introduction Générale

1. La peau, voie d'administration de molécules actives

1.1. Structure de la peau

La peau est l'organe le plus étendu et le plus lourd du corps humain : il représente 12-15% du poids du corps avec une surface de $2m^2$ environ. La peau possède des fonctions multiples et complexes: protection, thermorégulation, fonction immunitaire et hormonale, etc. (Montagna and Parakkal, 1974). La peau est composée de trois couches : l'épiderme (couche externe), le derme (couche intermédiaire) et l'hypoderme (couche interne) (Figure 1).

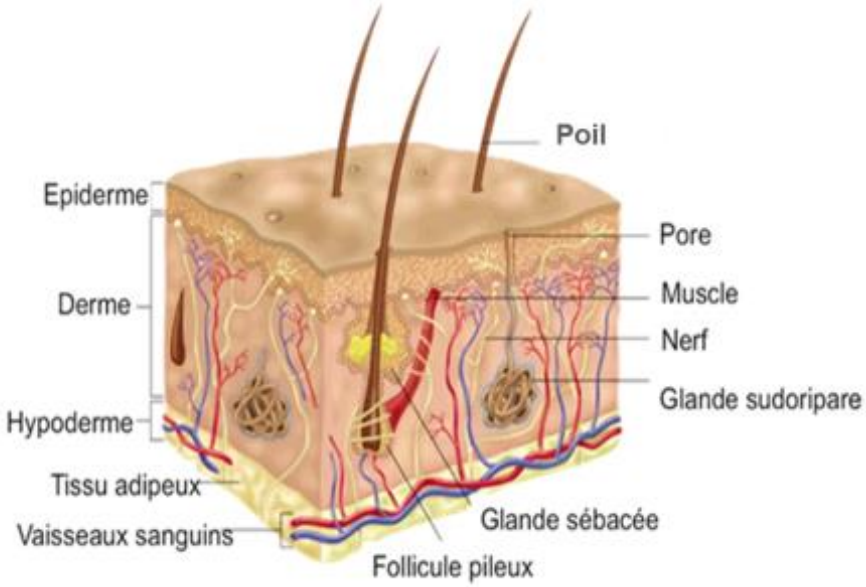


Figure 1: Représentation de la structure de la peau humaine (Mélissopoulos et al., 2012)

L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Elle est composée principalement de tissu conjonctif lâche et de tissu adipeux semi perméable. Cette couche est traversée par les vaisseaux et les nerfs et assure plusieurs rôles comme l'isolation thermique et le stockage des graisses (Mélissopoulos et al., 2012).

Le derme est un tissu conjonctif fibro-élastique composé de cellules, les fibroblastes et d'une matrice intercellulaire. La matrice est formée de protéines fibreuses (collagène, élastine, réticuline) et d'un gel interfibrillaire composé de protéoglycanes, glycoprotéines, sels et eau. Le derme comprend également d'importantes ramifications vasculaires, un vaste réseau nerveux et des annexes cutanées. Son épaisseur varie considérablement selon le sujet et la région mais on pense qu'elle est comprise entre 1 et 4 mm. Il assure à la peau souplesse, hydratation, nutrition et élasticité (Mélissopoulos et al., 2012; Potts, 1997).

L'épiderme représente la couche la plus superficielle de la peau avec une épaisseur qui varie en fonction de l'endroit du corps. Elle se compose de quatre types cellulaires : les kératinocytes (80% des cellules de l'épiderme), les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel (Mélissopoulos et al., 2012).

L'épiderme est agencé en quatre couches qui sont, de la plus profonde à la plus superficielle :

- **La couche basale (*stratum germinativum*, SB).** Il s'agit d'une couche monocellulaire de cellules cylindriques, les kératinocytes, reliés par des canaux transmembranaires, dont le cytoplasme est riche en organites cellulaires et en mélanosomes. Ces cellules ont une intense activité mitotique, chaque kératinocyte se divise en deux cellules-filles identiques, l'une restant sur place, l'autre migrant vers la couche supérieure en se différenciant. A ce stade débute la synthèse de kératine. Les mélanosomes sont des grains de mélanine synthétisés par les mélanocytes. Ces grains de mélanine se concentrent autour du noyau pour protéger l'ADN de l'action des rayons ultraviolets. Au niveau de la couche basale, se situent également les cellules de Langerhans, qui sont des cellules appartenant au système immunitaire. Les cellules de Merkel se trouvent également à ce niveau et elles assurent la fonction sensorielle de la peau.

- **La couche épineuse (*stratum spinosum*, SS).** La couche épineuse se compose de cinq à six sous-couches de kératinocytes. Ces cellules sont reliées entre elles par des desmosomes. La couche épineuse se compose également de cellules de Langerhans et de Merkel.

- **La couche granuleuse (*stratum granulosum*, SG).** Cette couche se trouve uniquement dans la peau très épaisse. Elle est constituée de plusieurs assises cellulaires, plates et claires, avec un aspect homogène.

- **La couche cornée (*stratum corneum*, SC).** Cette couche se compose de cellules mortes et sans noyau (appelées cornéocytes) reliées entre elles par une matrice riche en lipides permettant leur cohésion. On peut différencier deux sous-couches, la couche granuleuse compacte qui fait suite à la couche où les cellules sont étroitement soudées, et au-dessus la couche desquamante où s'effectue la desquamation des cellules cornées. Cette couche, la plus externe de la peau, crée une barrière efficace à l'entrée de molécules dans le corps.

Ces quatre couches peuvent être divisées en deux parties distinctes : l'épiderme viable (couche basale, épineuse et granuleuse) étant une couche hydrophile (70% d'eau) et le *stratum corneum*, une couche hydrophobe constituée de cellules mortes. L'épiderme est la couche la plus étudiée dans les domaines dermo-pharmaceutique et dermo-cosmétique. D'une part, l'administration cutanée des molécules actives à travers la barrière considérée comme imperméable du *stratum corneum* est un véritable défi pour les traitements locaux. D'autre part, une fois passé le *stratum corneum*, l'actif doit atteindre les cellules cibles dans l'épiderme vivant pour que des effets thérapeutiques soient observables (Kwan, 2014).

1.2. Absorption cutanée

L'application d'un produit sur la peau est appelée "application topique". Cette voie d'administration concerne des formulations pharmaceutiques et cosmétiques. La peau peut être une voie d'administration de molécules actives aussi bien pour une action locale (traitement de pathologies locales ou dermatoses, traitement de blessures superficielles) que pour une action systémique en utilisant le passage transdermique. Dans le cadre de cette thèse, seulement l'application locale d'ingrédients actifs cosmétique (ACI, pour *active cosmetic ingredient*) sera abordée.

Il existe deux principales voies de passage des molécules à travers la peau intacte : la pénétration par la couche cornée ou par les annexes cutanées. Dans la majorité des cas, les deux voies de passage sont utilisées simultanément (Juan Escobar-Chavez and Merino, 2012; Uchechi et al., 2014). Le passage d'une molécule active par la couche cornée représente la voie de passage majoritaire et peut être effectué par 2 voies : la voie transcellulaire ou intercellulaire (Figure 2). La voie transcellulaire traverse les cellules de la peau mais également le ciment intercornéocytaire. Il faut donc que la molécule soit amphiphile pour pouvoir emprunter cette voie transcellulaire. Concernant le transport intercellulaire, les molécules actives lipophiles sont transportées autour des cornéocytes dans les régions extracellulaires riches en lipides.

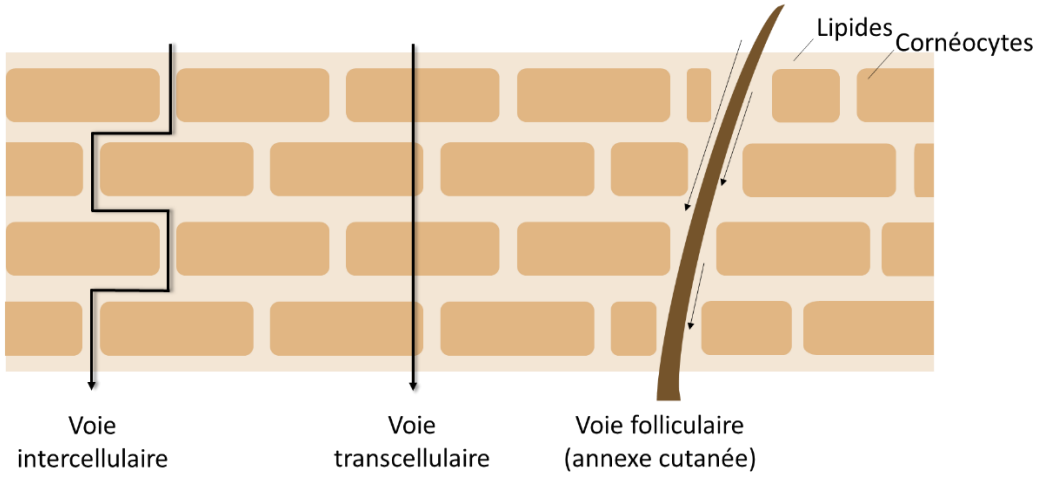


Figure 2: Représentation schématique des voies de pénétration de molécules à travers le stratum corneum.

La voie de passage par les annexes cutanées correspond au passage par les follicules pilo-sébacés (voie trans-folliculaire) et par les glandes sudoripares. Ces annexes cutanées occupent environ 0,1% de la surface totale de la peau humaine. Bien que cette voie de passage soit minoritaire, elle présente une possibilité de stockage et de diffusion non négligeable de la molécule directement dans le derme, sans avoir à franchir le *stratum corneum* (McAuley and Caserta, 2015).

L'absorption cutanée d'un ACI se déroule selon plusieurs étapes successives. Tout d'abord, la substance se sépare de son véhicule et gagne l'environnement cutané. Cette étape dépend de l'affinité de l'ACI (lipophile ou non) avec les lipides du *stratum corneum*. On parle de coefficient de partage. Une fois au sein du SC, la molécule va diffuser vers les couches les plus profondes suivant un processus de diffusion proche de la loi de la diffusion de Fick (Agache, 2000). La diffusion est un processus cinétique passif qui se déroule selon un gradient de concentration à partir d'une région de concentration élevée vers une région de faible concentration. Deux éléments sont donc particulièrement importants pour une diffusion optimale de l'ACI dans les couches de la peau : le gradient de concentration de la molécule, responsable du mécanisme de diffusion, et le coefficient de partage qui décrit l'affinité relative de la molécule pour son véhicule et pour les différentes couches de la peau.

La vitesse de diffusion d'une molécule dépendra de ses caractéristiques physico-chimiques. Les caractéristiques idéales seraient : un poids moléculaire inférieur à environ 600 Daltons, une affinité pour les phases lipophile et hydrophile, et un point de fusion bas (Uchechi et al., 2014). En plus des caractéristiques physicochimiques de la molécule, il faut prendre en considération les facteurs physiologiques de la peau tels que : la variabilité anatomique, la variabilité liée à l'âge, l'intégrité de la peau, l'hydratation, la température cutanée et les modalités d'application (Mélissopoulos et al., 2012).

De toute évidence, de nombreuses molécules médicamenteuses ou cosmétiques ne répondent pas à aux critères physico-chimiques idéals de pénétration. Par conséquent, bien souvent, la problématique du passage cutanée de molécules implique d'utiliser des véhicules capables de faciliter ce passage.

2. La (nano)vectorisation

Il existe une multitude d'actifs cosmétiques avec des propriétés physicochimiques propres (polarité, poids moléculaire, état physique, etc.). Un actif n'est jamais utilisé directement sous sa forme pure ; il est intégré à un système de distribution, une forme galénique cosmétique telle que : baume, crème, gel, lotion, etc. Bien que ce soit le rôle et les propriétés de l'actif qui soient mis en avant dans un produit cosmétique, l'actif n'est présent qu'en très faible quantité. Les ingrédients sans activité biologique revendiquée, désignés sous le terme d'excipient ou d'ingrédients fonctionnels, sont le plus souvent de l'eau, des corps gras, des émulsifiants, des tensioactifs, des antioxydants, des conservateurs antimicrobiens, des colorants, des parfums ou encore des agents de texture. La difficulté majeure que relève les formulateurs cosmétiques est de faire coexister dans un même système physiquement, chimiquement et microbiologiquement stable, des substances qui n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques.

Une fois le produit cosmétique appliqué sur la peau, il doit favoriser la pénétration de l'ACI afin qu'il atteigne sa cible biologique. La vectorisation des molécules actives peut aider à leur pénétration. Il s'agit de développer des entités dans lesquels sont placées les substances actives. La pénétration cutanée est alors

contrôlée par les propriétés physico-chimiques conjuguées de l'actif et de son vecteur. Le vecteur va pouvoir protéger l'actif de sa potentielle dégradation chimique (au cours du stockage) ou biologique (au cours de son utilisation). Dépendant de la nature du vecteur, il peut permettre le contrôle spatio-temporel de la libération de l'actif. Le vecteur doit être compatible avec les autres composants de la formulation et avec les attributs physico-chimiques et qualitatifs du produit final (c'est-à-dire l'apparence, la texture et la durée de conservation).

L'utilisation de la version nanométrique de ces vecteurs est de plus en plus répandue. En effet, les nanosciences et nanotechnologies ont connu un essor fulgurant ces dernières décennies au sein de diverses industries, dont la Cosmétique.

2.1. Les avantages de l'échelle nanométrique en Cosmétique

Le terme « nano » est utilisé de préférence pour les systèmes de taille de 1 à 100 nm, mais dans le design des véhicules de délivrance des médicaments, les systèmes de 50 à 500 nm sont également considérées comme nanovecteurs en fonction de la voie d'administration (Uchechi et al., 2014).

Cela fait pratiquement 40 ans que les nanotechnologies se sont introduites dans le domaine des cosmétiques, des produits de santé et des préparations cutanées. La Figure 3 présente les principaux avantages des nanosystèmes (NS), notamment dans le domaine des cosmétiques (Kaul et al., 2018; Mu and Sprando, 2010; Salvioni et al., 2021).

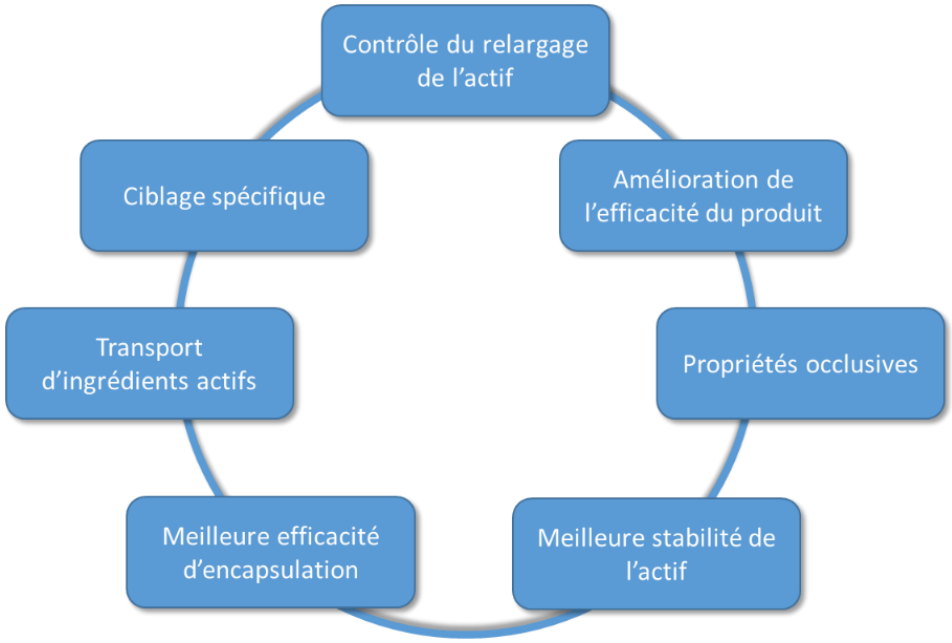


Figure 3: Présentation des points positifs des nanocosmétiques

Jusqu'à présent, la nanotechnologie a prouvé qu'elle est capable d'améliorer les performances des cosmétiques de diverses manières, en particulier : en augmentant la pénétration cutanée de l'ingrédient actif ; en contrôlant la libération du principe actif ; en améliorant la stabilité physique des ingrédients ; et en offrant une meilleure protection contre les UV.

Comme mentionné ci-dessus, le SC est le principal obstacle auquel est confronté tout ingrédient. Il a été observé que les NS pénètrent dans la peau par les trois mêmes voies décrites pour d'autres substances (voie transcellulaire, intercellulaire et annexe) (Nafisi and Maibach, 2018). La taille des NS joue un rôle majeur dans ce processus (Salvioni et al., 2021). L'utilisation des NS permet également d'améliorer la stabilité de divers ingrédients sensibles tels que les acides gras insaturés, les vitamines ou les antioxydants. Le vecteur peut protéger les actifs en limitant les échanges avec l'extérieur (chaleur, lumière, pH, etc.). De plus, de nombreux ingrédients peuvent ne pas être compatibles avec d'autres composants de la formulation. Améliorer la stabilité des actifs permet alors d'accroître l'efficacité du produit cosmétique. L'utilisation des nanotechnologies permet également d'augmenter l'efficacité et la tolérance des filtres ultraviolet (UV) à la surface de la peau. En effet, à l'échelle nanométrique, les spécificités d'une substance (couleur, solubilité, réactivité chimique, etc.) peuvent être différentes et donc permettre d'améliorer les propriétés d'un produit cosmétique ou de le rendre plus esthétique. Cette propriété-là est notamment observé pour les nanomatériaux. L'exemple le plus courant sont les écrans solaires minéraux, où rendre les particules du minéral actif plus petites leur permet d'être appliqués sans laisser de traces blanches visibles. Cette transparence des nanomatériaux s'explique par le fait que leur taille est inférieure à la longueur d'onde du spectre visible (400 - 800 nm).

2.2. Les principaux nanosystèmes utilisés en Cosmétologie

Les NS peuvent être classés selon différents critères : leur nature (organique ou inorganique), leur forme, leur taille, leur charge de surface ou encore leurs caractéristiques physicochimiques. Mais bien souvent, les nanosystèmes appliqués au domaine de la Cosmétique sont divisés d'une part en systèmes souples dont la forme peut varier temporairement qui sont plutôt des nanosystèmes organiques et, d'autre part en systèmes rigides non déformables qui sont classiquement constituées de matériau inorganique. Le Tableau 1 compile des exemples d'études récemment publiées faisant état de l'évaluation *in vivo* et/ou *in vitro* de formulations de nanosystèmes appliquées localement pour la prise en charge des troubles cutanés ou de soins de la peau (Papakostas et al., 2011).

Tableau 1 : Liste non exhaustive d'études récemment publiées concernant le développement de nanosystèmes pour une application topique

	Type de Nanosystèmes	Actif encapsulé	Taille (nm)	Application	Références
Nanosystèmes rigides	TiO_2, ZnO	-	30-150	Filtres UV (photoprotection)	(Schneider and Lim, 2019)
	Particules SLN-Silice	Octyl methoxycinnamate	200 nm	Protection solaire	(Andreani et al., 2020)
	ZnO	-	60 nm	Soin antibactérien	(Aditya et al., 2018)
	Nanoparticules d'argent	+/- tetracycline	20 nm	Cicatrisation des plaies	(Ahmadi and Adibhesami, 2017)
	Nanoparticules d'or	Methotrexate	4 ± 1 nm	Psoriasis	(Bessar et al., 2016)
Nanosystèmes souples	Particules lipidiques	Resveratrol, Vitamine E Epigallocatechin Gallate	100-300 nm	Procurer à la peau des bienfaits antioxydants durables	(Chen et al., 2017)
	SLN	Extrait de feuilles de *Prunus persica*	170 nm	Crème anti-âge	(Mostafa et al., 2021)
	Nanoparticules à base de lignine	Curcumine	100 nm	Cicatrisation des plaies	(Alqahtani et al., 2020)
	Nanoparticules de PLGA	Naringénine	130 nm	Crèmes solaires	(Joshi et al., 2018)
		Pranopofen	385 nm	Inflammation	(Abrego et al., 2016)
	Gel à base de NLC	Clobetasol propionate	130-200 nm	Eczéma	(Nagaich and Gulati, 2016)
	Nanoparticules de chitosane	Hydrocortisone/Hyroxy tyrosol	190-220 nm	*Atopic dermatitis*	(Siddique et al., 2016)
	Nanoparticules de PLA	Extrait de feuilles d'olivier	246 nm	Améliorer la stabilité de l'actif (antioxydant)	(Kesente et al., 2017)

SLN : nanoparticules lipidiques solides ; NLC : lipides nanostructurés ; PLGA : poly(acide lactique-co-glycolique) ; PLA : acide polylactique

2.2.1. Nanoparticules « souples »

Les nanosystèmes dits souples sont les nanosystèmes à base de lipides tels que les liposomes, les nanoparticules lipidiques solides (SLN), les transporteurs de lipides nanostructurés (NLC) et les nanoémulsions. Mais également, les nanosystèmes à base de polymères (nanomicelles, nanocapsules, nanosphères, nanogels).

Les liposomes permettent une meilleure absorption des principes actifs par la peau par fusion de leur bicouche lipidique avec la membrane cutanée. Les liposomes sont utilisés dans les crèmes anti-âge, les crèmes hydratantes, les crèmes solaires, les crèmes de beauté et le traitement de la chute des cheveux (Kaul et al., 2018).

Les nanoémulsions sont des dispersions de gouttelettes nanométriques. Leur petite taille fournit une plus grande stabilité, améliore la performance des ingrédients actifs et la durée de conservation du produit. On les retrouve dans les produits tels que les déodorants, les écrans solaires, les shampooings, les lotions, les vernis à ongles, les revitalisants et les sérums capillaires.

L'utilisation des nanosystèmes polymères est en augmentation dans le domaine des cosmétiques, en particulier dans les produits de soin de la peau tels que les crèmes antirides, les crèmes hydratantes et les crèmes anti-acnéiques (Guterres et al., 2007).

2.2.2. Les nanoparticules « rigides » (nanomatériaux)

Les nanoparticules rigides sont des structures colloïdales de différentes formes et différentes tailles, constituées de carbone (fullerènes) ou d'éléments tels que des métaux (or, argent…), des oxydes métalliques, des céramiques (silice). Les oxydes métalliques les plus courants, car produits à grande échelle, sont le dioxyde de titane (TiO_2) et l'oxyde de zinc (ZnO).

L'utilisation la plus connue des nanotechnologies en cosmétique est celle retrouvée au sein des produits solaires. Les particules de dioxyde de titane (TiO_2) et d'oxyde de zinc (ZnO) ont la capacité d'absorber et de refléter les rayonnements UV conférant ainsi une photo-protection. Etant visibles, ces particules laissaient un film blanc sur la peau. La réduction de leur taille aux dimensions nanométriques a permis l'élaboration de crèmes solaires « invisibles » tout en conservant leur propriété photo-protectrice (Schneider and Lim, 2019).

Les nanoparticules d'or et d'argent peuvent être intégrées dans des formules cosmétiques en raison de leurs propriétés antibactériennes (Ahmadi and Adibhesami, 2017; Bessar et al., 2016).

Les fullerènes entrent dans la composition de nombreuses crèmes pour le visage très coûteuses car ils constituent un capteur de radicaux libres. Ils peuvent également être utilisés comme pigments. Les compositions cosmétiques dans lesquelles les fullerènes sont utilisées concernent essentiellement le maquillage du visage (ombres à paupières, eye-liners, mascaras, poudres, fonds de teint, fards à joues, crèmes teintées, des rouges à lèvres, sticks anticerne, vernis à ongles, etc.).

2.3. Les défis du développement de produits (dermo-)cosmétiques.

Aujourd'hui, les consommateurs s'inquiètent de plus en plus de la composition des produits, ainsi que sur leur impact écologique. En effet, les consommateurs sont de plus en plus exigeants et souhaitent utiliser des produits respectueux à la fois de la peau mais aussi de la planète. Contrairement aux médicaments, la notion bénéfice/risque n'existe pas en cosmétique. L'innocuité des nanovecteurs doit donc être strictement contrôlée et prise en compte, que ce soit pour leur utilisation mais également lors de leur fabrication. En parallèle, les nanosystèmes doivent nécessiter d'une attention particulière car, une fois rejetés dans le milieu extérieur, ils peuvent devenir des polluants de l'environnement.

Le développement de systèmes innovants nécessite du temps et de l'argent. Il faut donc faire la balance entre l'aspect économique que nécessitera le développement d'un nouveau produit et l'intérêt du consommateur pour celui-ci. Si le produit concurrence des produits déjà existants, il devra montrer des améliorations significatives pour justifier du prix d'achat, très certainement plus élevé. Par exemple, une application plus facile du produit, un meilleur contact avec la zone à traiter, une application plus sélective sur les zones cutanées malades, voire une population cellulaire, etc. D'une manière générale, il faut chercher à

diminuer un maximum les coûts de production. Cela peut notamment passer par la diminution du nombre d'étapes de production ainsi que les moyens utilisés. Il faut également se rappeler qu'il y a bien souvent un écart entre la recherche universitaire explorant de nouveaux systèmes et leur développement industriel. Si une production à grande échelle est envisagée, il faut alors penser en amont aux méthodes qui seront employées afin que la transposition industrielle se fasse facilement et que la production puisse se réaliser dans des conditions conformes aux réglementations des bonnes pratiques de fabrication.

Aujourd'hui, les entreprises cosmétiques cherchent à améliorer l'efficacité de leurs produits (stabilité, pénétration cutanée, etc.), mais également à les personnaliser. La personnalisation est souvent décrite comme le nouveau luxe dans le domaine cosmétique avec des parfums, des fonds de teint et des soins élaborés selon les propres goûts et la nature de la peau et/ou du cheveu du consommateur. Le mouvement a commencé avec des emballages personnalisés et un choix accru de produits cosmétiques. De nos jours, la tendance est à l'extrême personnalisation avec des produits sur-mesure, faisant référence à la qualité de la peau du consommateur. Outre les questionnaires proposés aux consommateurs, il existe aujourd'hui des outils de haute technologie permettant de suivre l'évolution de la peau (évaluation du taux d'hydratation, de sébum, l'étendue des taches et des rides, etc.). La prochaine étape de la beauté personnalisée pourrait se concentrer sur la libération de l'actif cosmétique au bon moment et au bon endroit. La libération peut être déclenchée par le consommateur lui-même, consciemment par un geste précis ou inconsciemment par une modification de l'état physiologique de la peau.

3. Les objectifs de la thèse

De plus en plus, les entreprises cosmétiques font appels aux chercheurs universitaires pour les aider à relever la multitude de défis auxquels ils sont confrontés. Depuis 2015, le programme Ambition recherche et développement Cosmétosciences, financé par la Région centre Val de Loire, a pour ambition de favoriser les partenariats entre chercheurs académiques et industriels de la filière cosmétique. Il s'appuie sur une dynamique régionale bien établie pour un soutien à la recherche transversale, à la formation et à l'entrepreneuriat. Ce programme regroupe plusieurs projets de recherche, dont le projet MISTIC (pour Matériaux Intelligents pour la libération STImulée de bioactifs Cosmétiques).

Ce projet MISTIC vise à répondre à une partie des défis rencontrées en cosmétiques tels que 1) développer une nouvelle génération de produits cosmétiques permettant une libération stimulée d'ACI, 2) exploiter le potentiel de la forme « film » pour disperser des nanosystèmes et 3) développer des méthodes capables d'évaluer la pertinence et l'efficacité de nouvelles formes cosmétiques. Il s'agit d'un projet collaboratif public/privé qui s'appuie sur la complémentarité des équipes académiques Nanomédicaments et Nanosondes (NMNS EA6295), l'unité Imagerie et Cerveau (U930 IC), l'Institut de Chimie Organique et

Analytique (ICOA), l'unité Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN), ainsi que les entreprises Bioeurope, centre de Recherche et Développement du Groupe Solabia fournisseur d'actifs cosmétiques et pharmaceutiques, et *Transderma Systems,* TPE spécialisée dans l'évaluation de l'efficacité des cosmétiques.

Cette thèse a permis de faire avancer le projet MISTIC sur différents volets, avec les objectifs suivants :

1) **Développer des nanosystèmes stimuli-sensibles permettant une libération contrôlée de l'ACI.**

Dans le domaine pharmaceutique, la libération contrôlée d'un actif provient d'un besoin d'optimiser son activité thérapeutique et de minimiser les effets secondaires. On parle souvent de *Smart Drug Delivery Systems* (SDDS) ; systèmes qui ont pour but d'administrer l'actif à la bonne concentration, au bon endroit et au bon moment. Ces SDDS, bien souvent composés de polymères, sont conçus pour répondre à un signal déclencheur spécifique, appelé stimulus, qui sera à l'origine de la libération de l'actif. Le stimulus peut être qualifié de stimulus interne (par exemple, pH, potentiel redox ou enzymes) ou de stimulus externe (par exemple, température ou lumière).

En cosmétique, la libération contrôlée de l'ACI est une nouvelle approche de la personnalisation des produits cosmétiques. L'un des premiers objectifs de la thèse va donc être de développer et d'étudier un SDDS sensible au potentiel redox, pour une application topique. Le SDDS développé sera sensible à un dérèglement du potentiel redox des cellules de la peau du consommateur et libérera alors l'ACI en fonction de l'état de santé de sa peau.

Pour obtenir ces objets, il conviendra de s'inspirer des recherches menées dans le domaine pharmaceutique, tout en tenant compte des contraintes propres à l'industrie cosmétique, notamment le coût de production et l'innocuité totale.

2) **Caractériser et évaluation de formules galéniques chargées en nanosystèmes.**

Le développement de nouveaux produits cosmétiques soulève des défis, à la fois en formulation mais également en chimie analytique. L'incorporation de nanosystèmes dans des formulations cosmétiques nécessite d'utiliser, ou de développer, de nouvelles méthodes de caractérisation de ces nouveaux ingrédients mais également des produits finis qui les contiennent. Dans le cadre du projet MISTIC, il s'agira d'explorer quelles informations pourra nous apporter la technique d'imagerie Raman sur un produit fini de type film dans lequel est incorporé des nanosystèmes polymères.

Une fois les formules caractérisées, il est nécessaire d'évaluer leur efficacité au niveau biologique, que ce soit pour attester de leur biocompatibilité ou encore de leur efficacité. Concernant l'étude des produits dits de soins de la peau, de nombreuses méthodes sont décrites dans la littérature (par exemple, les cellules de Franz pour évaluer la pénétration cutanée de l'ACI).

Cependant, les études concernant les soins capillaires sont moins décrites, ce qui en fait un objectif pour cette thèse.

Cette thèse se présente donc en trois parties :

- **La première partie** est une étude bibliographique traitant des SDDS développés en vue d'une application cutanée et des méthodes de caractérisation employées pour évaluer ces systèmes.

- **La deuxième partie** décrit le développement d'un SDDS sensible à un déséquilibre du potentiel redox des cellules de la peau. Pour cela, une synthèse organique en 3 étapes a été mise au point afin de produire un mélange de polymères stimuli-sensible qui a été utilisé pour développer les SDDS. Après formulation des SDDS, leur caractère stimuli-sensible a été étudié en suivant notamment l'évolution de la fluorescence des actifs encapsulés dans des milieux plus ou moins riches en agents réducteurs. Les caractéristiques du mélange polymères (taille des blocs, ratio, concentrations du mélange) ont également été investiguées afin de connaître leur impact sur l'élaboration d'un SDDS efficace.

- **La troisième partie** expose le développement de méthodes pour la caractérisation et l'objectivation de formulations cosmétiques chargées en nanosystèmes polymères. Un premier chapitre a été dédié à l'étude de films cosmétiques dans lesquels sont incorporés des nanosystèmes polymères chargés avec un actif cosmétique. La technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) a été utilisée pour 1) étudier la distribution de l'actif au sein du film et 2) évaluer l'intérêt de cette technique pour effectuer une analyse semi-quantitative de l'actif. Des études mécaniques des films ont également été réalisées afin d'étudier l'impact de l'incorporation des nanosystèmes sur les propriétés du film.
  Pour finir, un deuxième et dernier chapitre est axé sur l'exploration de la technique de microspectroscopie de fluorescence pour évaluer l'intérêt de l'utilisation de nanosystèmes polymères pour véhiculer des actifs ou colorants dans la fibre capillaire.

PARTIE 1 : Etude bibliographique

Préambule de la revue

Les *Smart Drug Delivery Systems* (SDDS), initialement envisagés pour le domaine pharmaceutique, se voient de plus en plus utilisés pour d'autres types d'applications, par exemple la dermo-cosmétique. En effet, en fonction du type de stimulus, interne ou externe, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Par exemple, lorsque le stimulus est externe (température, lumière, etc.), le consommateur pourra alors être l'instigateur de la libération de l'ACI (utilisation d'équipements auxiliaires). Si le stimulus est interne (pH, température, potentiel redox, etc.), ce sera l'état physio-pathologique de la peau qui dictera la cinétique de libération de l'actif.

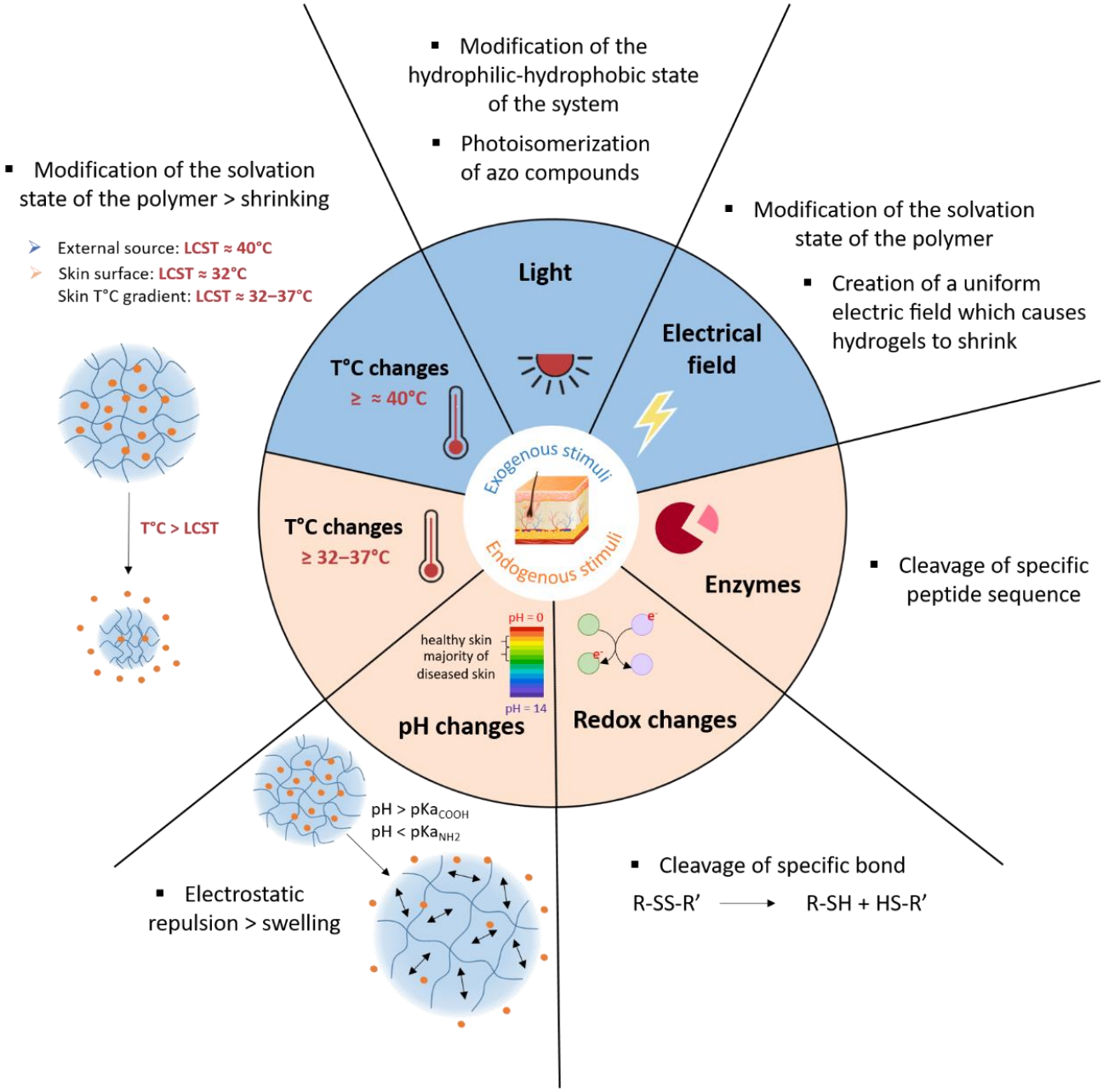
La revue qui va suivre fait un état des lieux des SDDS développés pour une application dermatologique ainsi que les méthodes utilisées pour attester de leur intérêt *in vitro*, *ex vivo* et/ou *in vivo*.

Les systèmes SDDS les plus couramment développés sont des gels ou des nanosystèmes. Le pH et la température sont parmi les stimuli les plus étudiés pour stimuler la libération d'un actif à son site d'action. Les variations de pH peuvent correspondre à une différence entre la formulation et la peau (pH 5,5) ou encore entre la peau saine et la peau lésée (pH plus basique). De même pour la température, les variations peuvent correspondre à une différence entre la formulation et la surface de la peau (32°C), entre une peau saine et lésée ou après application d'une source de chaleur (par exemple un patch chauffant, ~ 40°C). Concernant ces deux stimuli, beaucoup de polymères commerciaux existent et permettent le développement de tels SDDS.

D'autres stimuli tels que le potentiel redox des cellules de la peau, les enzymes et la lumière ont également montré leur potentiel pour une application topique. **Le développement de tels SDDS est cependant moins répandue du fait de la difficulté à produire/synthétiser les polymères dits stimuli-sensibles. Plusieurs défis doivent donc encore être relevés tels que rendre la conception de ces SDDS plus facile pour une production à grande échelle.** Mais également ; uniformiser les techniques d'objectivation des systèmes SDDS, maîtriser les stimuli externes (profondeur, spécificité), avoir l'approbation d'un point de vue réglementaire des matériaux polymères utilisés, et bien comprendre les mécanismes de libération.

Revue : "Polymer-based smart drug delivery systems for skin application and demonstration of the stimuli-responsiveness"

Polymers 2021, 13 (8), 1285. https://doi.org/10.3390/polym13081285



polymers

MDPI

Review

Polymer-Based Smart Drug Delivery Systems for Skin Application and Demonstration of Stimuli-Responsiveness

Louise Van Gheluwe, Igor Chourpa, Coline Gaigne and Emilie Munnier *

EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France; louise.vangheluwe@univ-tours.fr (L.V.G.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.); coline.gaigne15@laposte.net (C.G.)
* Correspondence: emilie.munnier@univ-tours.fr

Abstract: Progress in recent years in the field of stimuli-responsive polymers, whose properties change depending on the intensity of a signal, permitted an increase in smart drug delivery systems (SDDS). SDDS have attracted the attention of the scientific community because they can help meet two current challenges of the pharmaceutical industry: targeted drug delivery and personalized medicine. Controlled release of the active ingredient can be achieved through various stimuli, among which are temperature, pH, redox potential or even enzymes. SDDS, hitherto explored mainly in oncology, are now developed in the fields of dermatology and cosmetics. They are mostly hydrogels or nanosystems, and the most-used stimuli are pH and temperature. This review offers an overview of polymer-based SDDS developed to trigger the release of active ingredients intended to treat skin conditions or pathologies. The methods used to attest to stimuli-responsiveness in vitro, ex vivo and in vivo are discussed.

Keywords: smart drug delivery systems; polymers; dermatology; cosmetics

check for updates

Citation: Van Gheluwe, L.; Chourpa, I.; Gaigne, C.; Munnier, E. Polymer-Based Smart Drug Delivery Systems for Skin Application and Demonstration of Stimuli-Responsiveness. *Polymers* **2021**, *13*, 1285. https://doi.org/10.3390/polym13081285

Academic Editor: Rafał Konefał

Received: 19 March 2021
Accepted: 12 April 2021
Published: 15 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Smart drug delivery systems (SDDS) have been designed to control the release of active molecules into the intended site of action when a biological or a physical stimulus occurs. The interest of such systems can be the control of the release kinetics and/or minimization of side effects [1]. Such systems can be made of stimuli-responsive polymers, the properties of which will change depending on environmental conditions. Depending on the polymer, a very slight modification of the environment can produce a noticeable macroscopic alteration in their characteristics (physical state, shape and solubility, solvent interactions, hydrophilic and lipophilic balances). Light-responsive, temperature-responsive, pH-responsive or redox-responsive polymers can be utilized to prepare such systems [1]. After the specific stimulation, the responses of SDDS vary widely from swelling/contraction to disintegration, favoring the release of encapsulated drugs. The most interesting features of the smart polymers arise from their versatility and sensitivity tuning by means of chemical modifications.

SDDS has been widely explored in oncology, where stimuli are specific to the tumor environment [2,3]. Lately, much effort has been focused on the development of stimuli-responsive systems adapted to the dermatology and cosmetology fields. The delivery of active ingredients (AI) to the skin is a true challenge for researchers trying to combine efficacy with this local and non-traumatic route of administration. SDDS is a promising research path since skin conditions or dermatoses can lead to imbalances in the skin physiological parameters like pH, temperature or redox potential [4–7]. Moreover, easy access to the skin surface opens a wide field for the use of external triggers including UV, infrared (IR) light and heat [8–10]. Smart polymers are then used for two main purposes: the protection of the AI in the formulation and the increase in its efficacy when applied to the skin.

This review sheds a light on the last development in polymer-based SDDS designed for skin application found in the literature. After a reminder of the specificity of drug administration to skin, it will focus on the major stimuli applicable. Finally, it will raise the topic of the assessment of SDDS in triggered release in vitro, ex vivo or in vivo, still in the context of skin application.

2. The Skin, A Well-Established Route for Drug Delivery But Still Challenging

Human skin is the largest and the most accessible organ of the human body, making it a promising alternative to oral and injectable drug delivery. Other superior aspects of skin administration are ease of application and enhanced patient compliance, the possibility of local (dermal) and systemic (transdermal) delivery, and avoidance of systemic adverse effects due to drug concentration at a local site [11]. The intention of local delivery is to directly treat cutaneous disorders on the skin surface or within the skin directly beneath the application site, such as eczema or psoriasis. For cosmetic AI, any systemic absorption that may occur is undesirable. Systemic delivery implies application of the drug to the skin to treat systemic disorders.

However, drug delivery by cutaneous route is not a simple task. Human skin is a stratified tissue that can be divided in three functional layers: the epidermis (the outermost layer of the skin), dermis and hypodermis. The outermost structure of the epidermis is the stratum corneum (SC), a region rich in proteins and lipids that minimizes the inlet and outlet of water, oxygen and chemicals. This defensive membrane structure restricts the penetration of active ingredients into the deeper layers of the skin. It is the main component of the so-called skin barrier.

Skin penetration depends on physicochemical properties of the active ingredient (AI) and is favored if the latter meets the following criteria: low molecular weight (<500 Da), satisfactory polarity (log $P_{o/w} \cong 1$–3) and low melting point [12,13]. Drug penetration will also vary according to several physio-pathological parameters: skin areas, temperature and skin circulation, skin condition (the existence of lesions increases absorption), and the age of the patient. In view of the diversity of AI and their physicochemical properties, the penetration rules imposed by the composition and structure of the skin limit the cutaneous drug delivery. An active ingredient is never used directly in its pure form; it is integrated into an appropriate dosage form (mainly composed of excipients), which conducts it on the skin and accelerates its diffusion in the epidermis. The rate and extent to which an AI penetrates the skin depend on formulation-related factors [14]. The choice of dosage form will mainly depend on the body area of application of the product, on the nature of the active ingredient of interest, and on the level of penetration needed. Conventional cutaneous drug delivery systems include semisolid and liquid dosage forms. The semisolid dosage forms include ointments, creams, gels, or pastes, while the liquid dosage forms include lotions that may be an emulsion, suspension, or a solution.

A variety of physical or chemical methods has been proposed to overcome skin barrier functions momentarily in order to enhance drug delivery. Physical enhancers employ electrical, thermal (laser ablation), ultrasound, and mechanical effects (microneedles) [15,16]. However, these physical enhancers could severely damage the SC barrier and cause skin drying, irritancy, and hypersensitivity [17,18]. Chemical enhancers are molecules such as surfactants, terpenes, propylene glycol, fatty acids, alcohols, sulfoxides, etc. [19,20]. Many potent enhancers that disrupt the skin barrier also disrupt viable cells and cause toxicity. Moreover, enhancer effects are hard to predict (they are drug-specific and differ on animal and human skin) [20].

To facilitate drug delivery by topical application, smart drug delivery systems (SDDS) can be used as an alternative or complement to the above-mentioned skin delivery technologies.

3. Polymer-Based Smart Drug Delivery Systems for Topical Applications

3.1. Types of SDDS Formulations for Topical Applications

Polymer-based nanogels or hydrogels are the most widely described systems when it comes to developing smart systems for skin applications.

Hydrophilic gels, also called hydrogels, are common pharmaceutical forms used to deliver drugs to the skin. Gels are transparent or translucent semisolid formulations containing a high ratio of solvent/gelling agent. When dispersed in an appropriate solvent, gelling agents merge or entangle to form a three-dimensional colloidal network structure, which limits fluid flow by entrapment and immobilization of the solvent molecules. Hydrogels have been used for a long time in dermatology and cosmetology fields due to their biocompatibility, their good spreading and adherence to the site of application, their long resident time on the site of action facilitating diffusion of the AI in the skin. The core of a hydrogel is a polymeric channel system, which may be formed through physical or chemical cross-linking of homopolymers or copolymers [21], resulting in swelling when subjected to an aqueous surrounding (Figure 1).

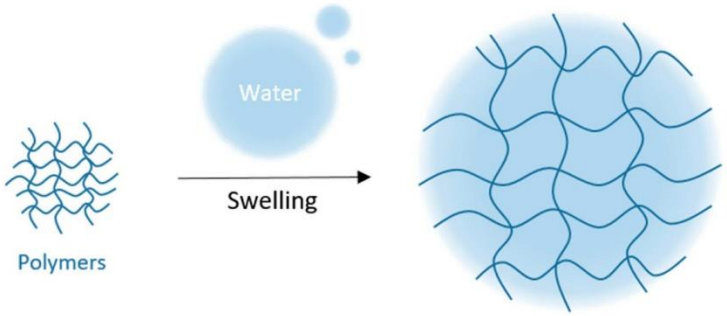


Figure 1. Hydrophilic gel formation by swelling of polymers in water.

Thanks to their small size (1–100 nm) and physicochemical composition, polymeric nanosystems offer many advantages over free drug solution: (1) they protect the drug from premature degradation, (2) they prevent drug from prematurely interacting with the biological environment, (3) they enhance absorption of the drug into a selected tissue such as skin, (4) they control the pharmacokinetics and drug tissue distribution profile, (5) they improve intracellular penetration, (6) they solve formulation problems [22,23]. Polymeric nanosystems include nanomicelles, polymersomes, nanoparticles, and nanogels [24]. Nanogels are three-dimensional hydrogel materials in the nanoscale size range [25].

The preparation of these smart gels is obtained by using stimuli-responsive polymers. The associated stimulus will cause a conformational or structural change in the gels, which is mediated by various factors including, but not limited to, transition in the temperature below or above its lower critical solution temperature (LCST) or the ionization of acidic or basic functional groups on the polymer chains. These changes also alter the hydrophilicity and/or hydrophobicity of the gels or, in other words, the extent of interaction of the system with water molecules. It is mostly manifested in the form of swelling, shrinking or disintegration of the gel network, which in turn causes responses like release of the entrapped cargo. Figure 2 compiles the different stimuli and their mode of action used in the skin area.

In a general way, SDDS can be constructed with polymers of synthetic, semi-synthetic or natural origin. Although a number of synthetic biodegradable polymers have been developed for biomedical applications, the use of natural biodegradable polymers remains attractive because of their abundance in nature, good biocompatibility and ability to be readily modified by simple chemistry.

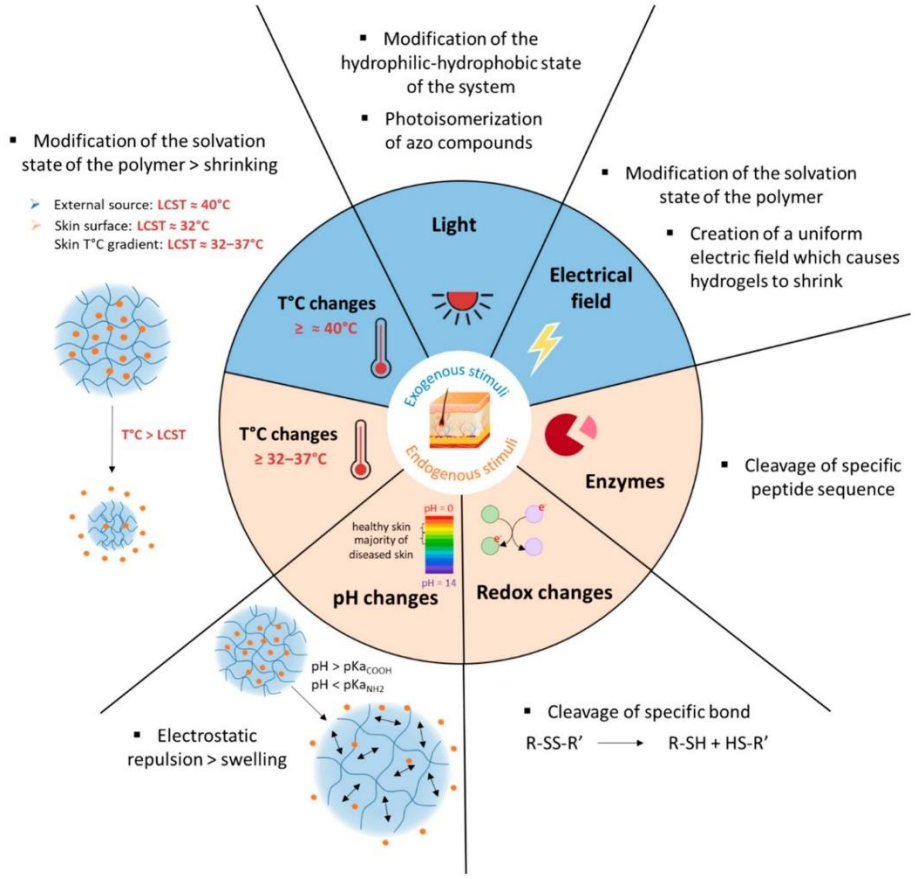


Figure 2. Schematic overview of stimuli and their mode of action, applied to the design of smart drug delivery systems for skin applications.

3.1.1. pH-Responsive Delivery Systems

3.1.1.1. Skin pH and Its Variations

Maintenance of a low skin pH (4–6) is vital for many normal human skin functions (homeostasis, integrity/cohesion of the SC, and desquamation) [18,26]. Deviations in skin pH, notably its elevation, lead to disturbances of the skin barrier and the skin microbiome and consequent infection and inflammation. Examples are atopic dermatitis (AD) [6,27–29], irritant contact dermatitis [30], candidiasis [31] and acne [32]. pH variation is also observed in the wound healing process, which can be divided into four stages: hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling. The shift from the inflammatory stage to the proliferative stage results in a gradual pH increase from 5.7 to 7.6 [33]. As several skin diseases are associated with an imbalance in the pH of the skin, systems based on pH-responsive polymers have been explored for controlled drug release in the area to be treated.

3.1.1.2. Mechanisms of pH-Responsiveness in Smart Polymeric Systems

All pH-responsive polymers are based on functional groups that can either accept or release a proton in response to changes in the pH of the environment. pH-responsive polymers are then classified into two types: anionic and cationic polymers (Table 1).

Table 1. Structure of pH-responsive polymers used to design smart drug delivery systems for skin application.

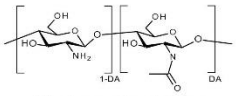
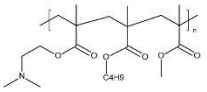
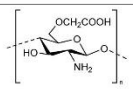
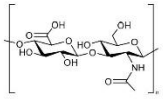
pH-Sensitive Polymers		Structure of the Monomer	Type of SDDS	Application	Ref.
Cationic System	Chitosan (≅ chitin with % degree of de-acetylation)	 DA: degree of acetylation	Nanosystems	Topical therapy of skin cancers	[34–39]
				Treatment for atopic dermatitis	[40]
			Hydrogels	Textile-based transdermal therapy	[41]
				Wound dressings	[42]
	Dimethylaminoethyl-functional methacrylate Eudragit E100		Microsystems	Skin care	[43]
Anionic System	Carboxymethyl Chitosan		Hydrogels	Transdermal drug delivery system	[44]
	Hyaluronic acid (HA)		Hydrogels	Transdermal delivery systems for skin lesions	[45]
				Transdermal delivery system for psoriasis skin relief	[46]
				Textile-based transdermal therapy	[41]
				Wound healing to treat skin burn lesions	[47]

Table 1. Cont.

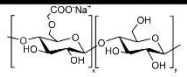
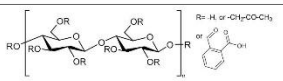
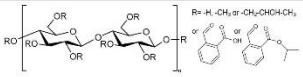
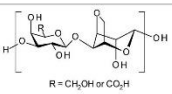
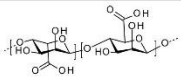
pH-Sensitive Polymers		Structure of the Monomer	Type of SDDS	Application	Ref.
Anionic System	Carboxymethyl cellulose (CMC)		Hydrogels	Potential treatment of atopic dermatitis	[48]
	Cellulose acetate phthalate		Nanosystems	Dermal carriers	[49]
	Hydroxypropyl methyl cellulose phthalate (HPMCP)		Nanosystems	Dermal carriers	[49]
	Carboxylated agarose		Hydrogels	Wound dressings	[50]
	Alginate		Microsystems	Wound healing	[51]
	Keratin	-	Hydrogels	Antimicrobial wound dressing	[52]
Anionic System	Poly(acrylic acid)		Hydrogels	Wound healing	[53]
				Treatment of chronic wounds	[54]
				Antibacterial wound dressing application	[55]

Table 1. Cont.

pH-Sensitive Polymers		Structure of the Monomer	Type of SDDS	Application	Ref.
Anionic System	Poly(methacrylic acid)		Nanosystems	Dermal carriers	[49,56]
				Transdermal delivery system	[57]
				Delivering cosmetic agents to melanocytes	[58]
			Microgel	(Trans)dermal drug delivery system	[59]
			Hydrogel	Smart delivery system for cosmetic ingredients	[60]
	Poly(maleic acid)		Hydrogels	Local therapeutic transdermal delivery applications	[61]
	Poly(itaconic acid)		Hydrogels	Treatment of bacterial infections	[62]

Anionic polymers are often composed of carboxylates i.e., of carboxylic acid groups ionized at pH above their pKa ≈ 4. Cationic polymers are composed of amine groups ionized to NH_3^+ form at pH below their pKa ≈ 6.5. The ionization of the functional groups presented along the backbone and side chains of the polymer leads to a conformational change in the polymer resulting in its swelling/shrinking or dissolution [42,62,63]. For hydrogels and nanogels, rapid ionization leads to rapid swelling of the system due to electrostatic repulsion inside the polymer network. This swelling increases the size of the pores in the system, which causes or accelerates the release of the cargo on the target site (Figure 3).

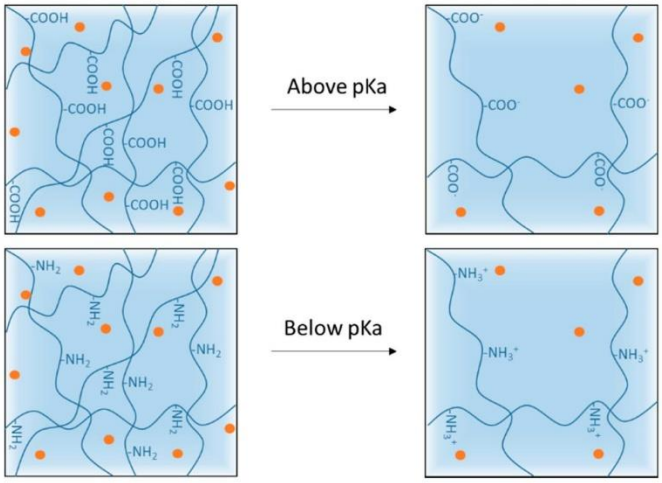


Figure 3. Schematic illustration of pH-responsive hydrogel response to surrounding medium pH variations (above: anionic polymer, below: cationic polymer).

3.1.1.3. pH-Responsive Systems Based on Anionic Polymers

As several skin diseases are associated with a rise in pH (e.g., wounds, dermatitis) compared with healthy skin, anionic polymer systems are more relevant and explored for smart topical treatment of skin diseases. For example, acrylic acid, methacrylic acid, maleic acid, itaconic acid, cellulose derivatives, hyaluronic acid, etc., have already been explored to develop pH-responsive systems for dermal applications.

Poly(acrylic acid). Poly(acrylic acid) (PAA), also known as carbomer, is of particular interest because it is biocompatible and biodegradable. PAA is a synthetic high-molecular weight polymer of acrylic acid with a pKa of ~4 [64]. Acrylic acid-based polymers have been used to develop SDDS sensitive to the rise in pH of wounds. For example, Koehler and co-workers developed pH-regulated hydrogel dressings based on alginate, poly(ethylene glycol) diacrylate and acrylic acid (AA). Important properties of wound dressings, such as swelling capacity and mechanical strength, were adjusted by varying the AA concentration. Swelling behavior could help to absorb exudates and provide mechanical resiliency to the delivery system at the biological site of action. The most promising formulation (hydrogels with 0.25% acrylic acid) was tested on injured human skin constructs and increased keratinocyte growth in the wound by 164% [54]. Zhu and co-workers reported the preparation of pH-responsive hydrogels for wound dressing application, comprised of peptide-based bis-acrylate and acrylic acid. The authors reported that the hydrogels possessed a tough and non-toxic nature with pH-dependent swelling behavior efficiently releasing the antibacterial drug triclosan when the preparation became alkaline [55].

Poly(methacrylic acid). Poly(methacrylic acid) has a pKa of ~4.5 [64]. Methacrylic-acid-based polymers have been used to develop systems sensitive to the rise in pH of several skin diseases. Eudragit® L100 (methacrylic acid-*co*-methyl methacrylate, 1:1) is

a biocompatible polymer known to be soluble above pH = 6, a pH close to the skin pH in many inflammatory skin diseases, which makes it a good candidate for developing pH-responsive particles [49,56,63,65]. For example, Sahle et al. used Eudragit® L100 to develop pH-responsive nanoparticles (NPs) that would release dexamethasone in a controlled manner on the skin but dissolve in hair follicles [49,56]. Rizi et al. developed hydrocortisone-loaded Eudragit® L100 microparticles that deliver essentially no drug at normal skin pH. The delivery can be triggered and targeted to atopic dermatitis skin where the pH is increased [65]. Eudragit® L100 was also used by Dong P. et al. to develop dexamethasone-loaded nanoparticles. Results showed that these NPs improved cutaneous penetration and controlled the release of a lipophilic drug, especially on barrier-disrupted skin [63]. Eudragit® S100 (methacrylic acid-*co*-methyl methacrylate, 1:2) and Eudragit® L100-55 (methacrylic acid-co-ethyl acrylate, 1:1) were also explored to develop dexamethasone-loaded particles [49].

Poly(itaconic acid). Itaconic acid (IA) is produced industrially by the fermentation of carbohydrates such as glucose or molasses. IA is a weak acid with two carboxylic groups and two pKa constants, pKa_1 = 3.85 and pKa_2 = 5.45, making it an attractive polymer for the development of SDDS. For example, Vuković and co-workers designed biocompatible pH-responsive hydrogels based on 2-hydroxyethylacrylate and itaconic acid (IA) for the treatment of skin/wound infections. The swelling of the hydrogels is significantly dependent on the content of hydrophilic IA [62].

Cellulose derivatives. Cellulose is the most abundant polysaccharide found in nature. Unsurprisingly, it is the main raw material for many semisynthetic cellulose derivatives. To add a pH-responsive character to cellulose, carboxyl groups (-COOH) were incorporated into the structure of the polymer by simple chemistry. For example, phthalate derivatives of cellulose were produced and contain a carboxyl group with a pKa of approximately 4.3. Sahle and co-workers used hydroxypropyl methyl cellulose phthalate (HPMCP) and cellulose acetate phthalate (CAP) to develop pH-responsive dexamethasone-loaded nanoparticles [49]. Another cellulose derivative is carboxymethyl cellulose (CMC), formed when cellulose reacts with mono chloroacetic acid. CMC contains carboxyl groups with a pKa of approximately 4.3. CMC is widely used owing to its high biodegradability, non-toxicity, and biocompatible properties. Park and co-workers prepared a pH-responsive hydrogel based on a CMC and 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) as a grafting agent [48]. This hydrogel was investigated as a transdermal delivery system for naringenin, a drug for treatment of atopic dermatitis (AD). The swelling ratio of the hydrogel increased as the grafting and the crosslinking density decreased, and it also increased at pH 7.5 and 8.5 (compared with pH 5.5). The hydrogel hydrates the skin, which temporarily interferes with the barrier function of the skin and allows the drug to penetrate the skin. Therefore, this novel pH-responsive hydrogel has potential applications in the treatment of various skin lesions caused by pH imbalance, such as AD.

Chitosan derivatives. Chitin is the most abundant polysaccharide in nature after cellulose. The partial or full deacetylation of *N*-acetyl-glucosamine moieties of chitin leads to the formation of chitosan, also considered a natural, nontoxic, biodegradable and bio-compatible polymer [66]. Chitosan has natural pH-responsive properties due to the protonation-deprotonation balance of amino groups. After a carboxymethylation reaction of chitosan, carboxymethyl chitosan (CmCHT) is produced, and the carboxyl groups added have a pKa of around 4.5. The primary interest of this chemical modification was to increase the water solubility of chitosan in alkaline pH. However, in view of the interest that a carboxyl group can represent in the development of a system sensitive to the rise in pH, this cellulose derivative has been used to develop SDDS. For example, Jeong et al. synthesized pH-responsive hydrogels by grafting 2-hydroxyethyl acrylate (HEA) onto CmCHT [44]. This hydrogel CmCHT-g-pHEA was investigated as a transdermal delivery system for nobiletin, which is effective in fighting acne. Since the amine group of the chitosan derivative is involved in the structure of the hydrogel network, only the carboxyl group will be at the origin of the pH-responsive behavior. The swelling ratio

of the hydrogel increased at high pH, and in vitro skin permeation experiments attested that the CmCHT-g-pHEA hydrogel improved the transdermal delivery of nobiletin. In conclusion, the newly synthesized CmCHT-g-pHEA hydrogel has potential as a non-toxic transdermal delivery carrier for treatment of skin lesions such as acne.

Hyaluronic acid. Hyaluronic acid (HA) is a natural and endogenous polysaccharide that plays important physiological and biological roles in the human body. Nowadays, HA is emerging as an appealing starting material for hydrogel design due to its biocompatibility, native biofunctionality, biodegradability, non-immunogenicity, and versatility. Given that HA contains carboxyl groups with a pKa in the range 3–4, it has been used to develop pH-responsive systems. For example, Kwon and co-workers investigated a pH-responsive hydrogel based on hyaluronic acid to deliver isoliquiritigenin (ILTG), an antimicrobial therapeutic agent, for acne growth inhibition [45]. Due to the significantly increased swelling of the hydrogel carrier, the ILTG could be released substantially at around pH = 7, where colony formation of acne is most active. The hydrogel was found to exhibit excellent permeability of ILTG into the skin, which penetrated mostly via the follicular pathway.

Alginate. Alginate is a natural polysaccharide, a copolymer of β-L-guluronic and α-D-mannuronic acid blocks, each with a carboxyl group (pKa of 3.65 and 3.38, respectively). Since alginate is biocompatible, non-toxic and non-immunogenic, it constitutes a good component for the production of a SDDS. For example, Shi and co-workers develop alginate-based microparticles that showed tunable compositions and were pH-sensitive for sustainable release of drugs in wound healing applications [51].

Agarose derivatives. Agarose is a natural polysaccharide extracted from red algae with repeating units of 1,3-linked-D-galactose and 1,4-linked 3,6-anhydro-1-galactose residues. Due to its good biocompatibility, agarose have seen employed widely in cosmetic and biomedical applications. To confer pH-responsive properties to agarose, it can be chemically modified through the precise oxidation of the primary alcohol of the D-galactose into carboxylic acid. This chemical modification provides a novel class of materials named carboxylated agarose (CA). In work done by Ninan et al., novel CA/tannic acid hydrogel scaffolds cross-linked with zinc ions were designed for the pH-controlled release of tannic acid for wound dressings [50].

Keratin. Keratin are proteins derived from human hair, wool, feathers, horns, hooves and nails. Due to their unique characteristics of bioactivity, biocompatibility, biodegradability, and natural abundance, keratin have been widely developed in wound healing applications [67]. Carboxyl groups are present in keratin structure, and the mechanism of swelling in response to the media pH change would be a protein structural reorganization driven by carboxyl protonation/deprotonation [68]. Villanueva et al. developed a smart antibacterial biomaterial based on a keratin hydrogel with pH-dependent behavior and Zinc Oxide (ZnO) nanoplates as a biocide agent. Keratin hydrogels swell at basic pH, such as a bacterial contaminated media, leading to the release of ZnO nanoparticles. The results are encouraging for wound dressing applications [52].

3.1.1.4. pH-Responsive Systems Based on Cationic Polymers

One strategy of designing SDDS based on cationic polymers (containing amine groups) is to prevent the initial burst release of active ingredients into the dosage form at neutral pH, and once in contact with the more acidic skin (<pKa of amine groups), the drug release is triggered [40,43]. Another strategy is based on the pH imbalance between the tumor microenvironment and normal skin. The accumulation of lactic acid in the tumor microenvironment leads to a decrease in cell pH from 7.5 to 4.5–6.5 [69]. This pH imbalance is already utilized to trigger drug release from pH-responsive cationic systems in response to the acidic environment within the cancer cell [69–71]. For example, Sabitha et al. and Sahu et al. designed pH-responsive chitosan-based nanogels for topical therapy of skin cancers [34–39]. However, for topical application, this strategy is complicated to implement given the already acidic pH of healthy skin.

In a pH-responsive system, drug release is often associated with its stimulated swelling. However, in one pH-responsive system study, the release of the drug was associated with a shrinking of a cationic system. For example, Zhu et al. studied pH-sensitive methacrylated chitosan (MAC) hydrogels, and significant decreases in the swelling ratios were observed when the hydrogel was exposed to increasingly alkaline environments (pH 3, 5, 7.4 and 9). Indeed, the amino groups of MAC (pKa = 6.5) will be deprotonated when the environmental pH is higher than the functional group's pKa. Therefore, the number of positive charges in the network of chitosan-based hydrogel decreases as the pH increases, which results in the shrinking of the system (because there are less electrostatic repulsions). Results showed that MAC hydrogels have a potential application in responding to specific wound healing stages by pH dependence and accelerate wound healing by the liberation of antibiotics and anti-inflammatory drugs [42].

3.1.2. Thermoresponsive Delivery Systems

3.1.2.1. Application Strategies of a Thermoresponsive System for Skin Delivery

Temperature-induced drug release is among the most investigated strategies in biomedicine, given the wide range of applications where temperature variations are naturally present. For cutaneous delivery, several strategies are available:

- Using the temperature difference between the formulation (usually at room temperature) and the skin surface (32 °C). For example, when thermoresponsive system is applied to the skin surface and reaches its temperature, it will quickly release the drug [72,73].
- Using the thermal gradient of the skin (32–37 °C) to deliver drugs. This strategy is usually adapted to nanosystems. The surface temperature (32 °C) prevents immediate drug release, and it is only when nanovectors finally reach deeper layers of the SC (37 °C) that the drug is released [58,74–76].
- Using the temperature imbalance between healthy skin and injured skin to trigger the release of active ingredients, specifically on the injured site concerned, by application of the active ingredient [77]. For example, it was shown that chronically infected wounds show a temperature 3 °C to 4 °C higher than normal skin [4].
- Elevating the temperature of the region to be treated artificially using an external thermal trigger, e.g., heating patch or infrared lamp [10].

The temperature stimulus is also used to form gels in situ [78]. Typically, aqueous solutions of hydrogels used in biomedical applications are liquid at ambient temperature and gel at physiological temperature (37°C). Herein, this sol-gel transition is used in particular for wound covering, since solutions can be applied easily using a syringe and then directly form a firm overlay covering the wound upon contact with the skin [79–81]. In this case, the stimulus is not used to trigger the release but to facilitate the use of the medicine.

3.1.2.2. Mechanisms of the Temperature Responsiveness of Smart Polymeric Systems

Thermoresponsive polymers exhibit a volume phase transition at a certain temperature (VPTT), which causes a sudden change in the solvation state, conformational state and, consequently, water-solubility [82]. Polymers that become insoluble upon heating have a so-called low critical solution temperature (LCST). Polymers that become soluble upon heating have an upper critical solution temperature (UCST). For topical applications, LCST polymers have been extensively studied because their volume phase transition can occur between room temperature (25 °C) and body temperature (32–37 °C). This means that contact of the systems with the skin/body temperature exceeding their LCST causes a rapid decrease in the volume of the system, resulting in a fast expulsion of fluids in the matrix that could be accompanied by the release of loaded hydrophilic or hydrophobic active ingredients [83]. Thermoresponsive hydrogel can be made by cross-linking polymers that display LCST behavior (Figure 4). Below the LCST, the polymers are water soluble, whereas above the LCST, they become increasingly hydrophobic and insoluble, leading

to gel formation. This temperature-dependent sol-gel transition can be experimentally verified by a number of techniques such as spectroscopy, differential scanning calorimetry, and rheology [84–86] and will depend on the chemical nature and polymer concentration. It is then possible to chemically tune the LCST of thermoresponsive polymers according to the requirements of the applications under investigation [87].

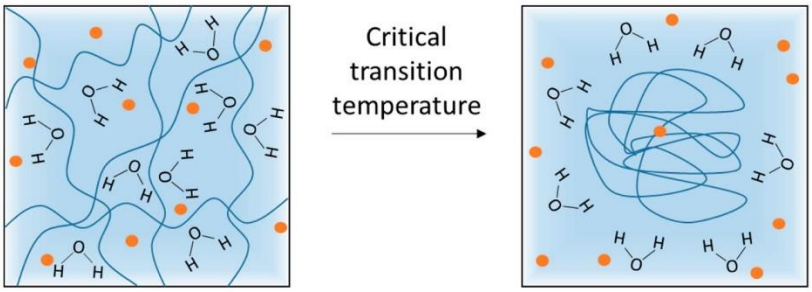


Figure 4. Schematic illustration of LCST hydrogel behavior.

3.1.2.3. Thermoresponsive SDDS for Cutaneous Administration

Various thermoresponsive polymers are used to develop thermoresponsive systems, usually hydrogels or nanogels, for the controlled drug delivery by cutaneous route (Table 2).

Table 2. Structure and characteristics of thermoresponsive polymers used to design smart drug delivery systems for skin application.

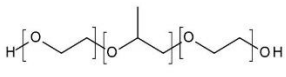
Thermoresponsive Polymers	Monomer Structure	Type of SDDS	T°C Phase Transition	Application	Ref.
Poloxamers (or Pluronics®)		Nanosystems	~25 °C	Treatment of cutaneous Leishmanias.	[79]
			-	Delivery drugs into deep skin layers	[75]
		Hydrogels	-	Skin delivery against hypertension	[88]
			32 °C	Dermal delivery system	[81]
			37 °C	Atopic dermatitis treatment	[89,90]
			~20 °C	Topical formulations	[91]
			37 °C	Skin inflammation and wound healing	[92]
			36.7 °C	Wound healing application	[93]
			~24°C or 30.4 °C	Topical therapeutic formulation	[94]

Table 2. *Cont.*

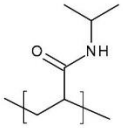
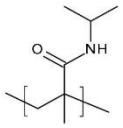
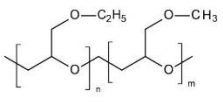
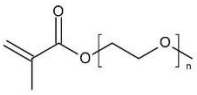
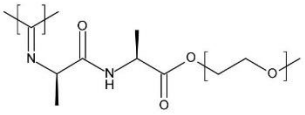
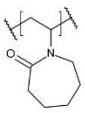
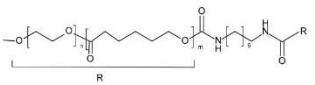
Thermoresponsive Polymers	Monomer Structure	Type of SDDS	T°C Phase Transition	Application	Ref.
			32 °C	Wound healing to treat skin burn lesions	[95]
			30 °C	Textile-based transdermal therapy	[41]
Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)		Nanosystems	31 to 37 °C	Topical drug delivery carrier	[96]
			35 °C	Topical delivery systems for biomacro-molecules	[76]
			~33 °C	Dermal delivery	[97]
			~34 °C	Cutaneous drug delivery	[98]
			41.2 °C	Topical delivery systems	[87]
			~41 °C	Skin penetration enhancer	[95]
		Microsystems	30–34 °C	Develop a novel unique wound dressing	[99]
			34 °C	Transdermal delivery systems	[100]
		Hydrogels	35–36 °C	Wound healing	[53]
			~32 °C	Treatment for psoriasis skin relief	[46]
			36 °C	Topical administration (vaginal drug delivery)	[101]
Poly(*N*-isopropylmethacryl amide) (PNIPMAM)		Nanosystems	34 °C	Skin penetration enhancer	[95]
Poly(ethyl glycidyl ether-co-methyl glycidyl ether)		Nanosystems	34 °C	Treatment of severe skin diseases	[98]
			~34 °C	Treatment of inflammatory skin diseases	[10]

Table 2. *Cont.*

Thermoresponsive Polymers	Monomer Structure	Type of SDDS	T°C Phase Transition	Application	Ref.
			~32 °C	Topical delivery into barrier-deficient skin	[74]
Poly(ethylene glycol) methacrylate		Nanosystems	36 °C	Applications in dermatotherapy and transdermal drug delivery	[77]
			>35 °C	Delivering cosmetic agents to melanocytes	[58]
oligo(-ethylene glycol)-decorated polyisocyanopeptide (PIC)		Hydrogels	RT	Facilitate wound repair	[102]
Poly(*N*-vinyl caprolactam) (PVCL)		Hydrogels	35 °C	Transdermal drug delivery system for pain management	[103]
			~32 °C	Develop skin-sensitive materials for topical drug delivery	[104]
PEG-PCL-PEG PEG: Poly(ethylene glycol) PCL: Poly(e-caprolactone)		Nanosystems	~37 °C	Improve liposomes adhesion for wound healing	[105]
		Hydrogels	34 °C	Applications in skin care and wound treatment	[106]

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM). Over the past few years, PNIPAM has appeared in the literature with increasing frequency. PNIPAM-based hydrogels, when heated above the LCST (≈32 °C), undergo a reversible phase transition from a swollen hydrated state to a shrunken dehydrated state, losing their volume and releasing their content. One of the first examples was the development of a PNIPAM drug-loaded hydrogel wound dressing with thermoresponsive, adhesive, and absorptive functions [99].

PNIPAM may be co-polymerised with other monomers, such as butyl acrylate (BuA) [100], acrylamide [87], or ethylene glycol [101]. Copolymerization of NIPAM with different monomers thus allows tuning of the properties, especially LCST.

PNIPAM may be polymerized from dendritic polyglycerol (dPG). dPG is a hydrophilic macromolecule that acts as a macro-crosslinker and allows the growth of multiple thermoresponsive polymer chains such as PNIPAM. dPG allows easy preparation of a monodisperse and stable nanostructure with good aqueous solubility and high biocompatibility [107,108]. For example, Witting et al. designed 200 nm dPG nanogels grafted with PNIPAM for protein encapsulation [76]. These NGs exhibited a thermal trigger point at 35 °C, which is favorable for cutaneous applications. Indeed, at ≥35 °C, the particle size was instantly reduced by 20%, and 93% of the protein was released. These thermoresponsive nanogels (tNGs) are promising topical delivery systems for biomacromolecules. Osorio et al. synthe-

sized nanocapsules (NCs) using modified silica nanoparticles as sacrificial templates and dPG as a macrocrosslinker, combined with different ratios of PNIPAM and PNIPMAM. The VPTT of these NCs is close to 40 °C and allows for drug delivery at elevated temperatures triggered by an external heat source [95].

Ugazio and coworkers developed mesoporous silica nanoparticles (MSNs) grafted with PNIPAM and loaded with quercetin. This system can be considered as a promising approach to controlling the skin delivery of antioxidants using a thermal trigger [97].

PNIPAM polymers are nontoxic and biocompatible, but NIPAM monomers may have some toxic effects [109].

Poly(ethylene glycol) methacrylate. Thermoresponsive methacrylate and acrylate polymers with short oligo(ethylene glycol) side chains have been found to possess properties that are comparable with PNIPAM. In particular, Lutz et al. have reported an interesting thermoresponsive polymer, poly(di(ethylene glycol) ethyl ether methacrylate) (PDEGMA), with a LCST close to 28 °C [110,111]. Importantly, PDEGMA and its copolymers are low-toxicity, antifouling, and as such have been successfully used to replace PNIPAM in a number of biomedical applications. Asadian-Birjand et al. have developed tNGs for inflamed skin treatment. tNGs were synthesized through the free radical polymerization of acrylated dendritic polyglycerol (dPG-Ac), ethylene glycol methacrylates di(ethylene glycol)methyl ether methacrylate (DEGMA) and oligo ethylene glycolmethacrylate (OEGMA). The volume phase transition temperature (VPTT) is around 36–40 °C, slightly higher than the temperature of healthy skin. It is expected that once the tNGs surpass their VPTT, for instance in inflamed skin areas, their polarity will change from a hydrophilic to a hydrophobic state, improving the interaction with the hydrophobic structures of the stratum corneum that would result in a better penetration in the skin [77].

Polyglycerol derivatives. In the case of linear polyglycerol (PG), a lower critical solution temperature (LCST) can be induced by hydrophobic modification of the hydroxyl groups. The hydroxyl moieties can be converted into various functional groups like ethers, esters, urethanes or carbonates [112]. For example, thermoresponsive and highly biocompatible poly(glycidyl ether)s copolymers composed of ethyl and methyl glycidyl ether were synthesized. In Giulbudagian's studies, click chemistry was used to graft these poly(glycidyl ether)s copolymers on dendritic polyglycerol (dPG) and develop thermoresponsive nanogels (tNGs_tPG) for topical delivery. The cloud point temperature (Tcp) of these tNGs_tPG occurs at 32 °C. While tNGs are swollen with water below their Tcp, the thermoresponsive polymers of the tNGs undergo a reversible transition in water solubility when exposed to greater temperatures, resulting in gel shrinking and the expulsion of water and drugs [74,113]. Specially, it was shown that polyglycerol-based thermoresponsive nanogels cause high local hydration in the stratum corneum (SC), altering the organization of both lipids and proteins, thus increasing the skin penetration of the released cargo [114]. Rancan et al. also investigated a tNG based on dendritic polyglycerol (dPG) and poly(glycidyl ether)s copolymers with a Tcp of 34 °C. They successfully demonstrated the penetration of tNGs in the SC of both intact and disrupted skin models. The studies showed enhanced penetration of tNGs with a release of dye in the epidermis on a thermal trigger by infrared radiation. Additionally, in barrier-disrupted skin, considerable quantities of the tNGs and dye were detected in both epidermis and dermis and thus showed promising applications for the treatment of inflammatory skin diseases [10].

Poly(*N*-vinylcaprolactam) (PVCL). PVCL is a temperature-responsive polymer with an LCST in the physiological range (~32-37 °C). PVCL polymers attract high interest because of PVCL solubility in aqueous and organic solutions, as well as strong hydrophilicity and nontoxicity compared with PNIPAM [115,116]. Zavgorodnya and coworkers prepared temperature-responsive hydrogel films of PVCL for topical drug delivery. PVCL-based hydrogel loaded with sodium diclofenac, an anti-inflammatory drug used for osteoarthritis pain management, provides sustained permeation of this drug through an artificial skin membrane. The cumulative amount of diclofenac transported at 32 °C from the PVCL-

based hydrogel was higher than that from the PVCL-based hydrogel at 22 °C, validating the interest of such a system for cutaneous drug delivery [104].

Oligo(-ethylene glycol)-decorated polyisocyanopeptide (PIC). The gelation temperature of PIC is 20 °C. At temperatures below 20 °C, the polymer solution is a free-flowing liquid, whereas above 20 °C the viscosity dramatically and rapidly increases whereby the polymer solution turns into a hydrogel. The PIC-based gel mimics the fibrous structure and the mechanical properties of natural extracellular matrix materials. These biomimetic PIC hydrogels were used to develop wound dressings. Indeed, PIC solutions gel upon contact with body heat and stay adherent to the wound without additional support [102].

Poloxamers. Triblock copolymers poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide) (PEO-PPO-PEO), also known as Poloxamers or Pluronics®, are an important group of synthetic polymers with a thermoreversible behavior in aqueous solutions. Poloxamers are approved by Food and Drug Administration for use in humans and have been extensively used in several biomedical applications because of their biocompatibility. Pluronic® F127 (PF127), the most commonly used, is composed of PEO units (70%) and PPO units (30%) and transformed from a low-viscosity solution to a semisolid gel upon heating to body temperature at concentrations of >20% *w*/*v* [117]. In the dermatological field, the sol-gel transition of PF127-based hydrogels is commonly used for wound healing [79–81,91,92]. For example, Heilmann et al. developed a thermosensitive morphine-loaded PF127 hydrogel that provides a moist environment to the wound, which is known to facilitate the healing process. Indeed, at temperatures of about 4–8 °C, the formulation can be easily handled due to its liquid aspect. However, once in contact with the skin surface (32 °C), the formulation undergoes a sol-to-gel transition [80]. Poloxamers can be modified by chemical grafting to modulate the gelation temperature [93,94]. Pluronic® F127 can be combined with carboxymethyl cellulose (CMC) to increase the porosity of the matrix to facilitate the diffusion of drugs out of it [89,90].

3.1.3. Other Stimuli-Responsive Delivery Systems

3.1.3.1. Redox-Responsive Systems

Lately, a lot of efforts have been focused on the development of redox-responsive systems [118–120]. It is well established that the pathological consequences of inflammation result in the formation of reactive oxygen species (ROS) and other oxidants, causing an oxidative imbalance (stress). ROS often induce redox adaptation in response to the continued oxidative stress, leading to an up regulation of glutathione (GSH) and other antioxidant molecules. Since disulfide bonds are sensitive to GSH, they were incorporated into nanocarriers for smart drug delivery within the cancer cell, where high concentrations of GSH were reported [121–123].

The strategy of disulfide bonds incorporation was used by our group [124] in order to develop redox-responsive nanoparticles for topical applications. Briefly, a mixture of poly(lactide) (PLA) and redox-responsive poly(ethylene glycol)-block-poly(lactide) (PEG-block-PLA) containing a disulfide bond was synthesized in three steps. Retinol, an anti-aging agent very common in cosmetics, was loaded into these smart nanocarriers. Results showed that increased GSH activity could favor the nanocarrier's cleavage and thus enhance the release of hydrophobic drugs.

3.1.3.2. Enzyme-Cleavable Systems

The skin is an organ with high enzyme activity (e.g., Cytochrome P450), which is important to consider when designing dermally administered drugs. Indeed, SDDS could control the delivery of active ingredients based on the biological environment, including the enzymatic environment. For example, during the wound-healing cascade, matrix metalloproteinases (MMPs) are secreted by the cellular components. Kim et al. described polymer fiber patches, from which recombinant EGF was engineered, as releasing only in the presence of wound-healing cues, e.g., MMP-9. Results showed that the EGF-loaded

responsive fiber significantly promoted proliferation and migration of human keratinocytes in the presence of the biological trigger MMP-9 [125].

3.1.3.3. Electro-Sensitive Systems

An electrical field in the form of an external stimulus allows for precise control over the magnitude of the current, the duration of electrical pulses and the interval between pulses. Delivery systems exploiting this external stimulus are prepared from polyelectrolytes, which are polymers that contain a relatively high concentration of ionizable groups along the backbone chain. Under the influence of an electric field, electro-responsive hydrogels generally shrink or swell, and this property has allowed for their application in drug delivery systems [126]. Im et al. were some of the first to develop an electro-sensitive transdermal drug delivery system. They developed an electro-sensitive system by the electrospinning of polyethylene oxide/pentaerythritol triacrylate/multi-walled carbon nanotubes, and they observed a correlation between drug release and applied voltage [127].

Oktay et al. designed an electro-sensitive hydrogel based on poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). They demonstrated that the model drug was released from the polymeric matrix as a result of the hydrogel shrinking upon exposure to an electric field. This formulation could be used as a drug carrier for electric-stimuli controlled delivery in the treatment of skin cancer [128].

3.1.4. Dual Stimuli-Responsive Systems

In addition to the single response polymer, it is also possible to design and engineer materials that respond simultaneously to a combination of stimuli (e.g., temperature, pH, redox potential). By combining two properties, this creates a polymer that is more specific and controllable.

The development of systems responding simultaneously to temperature and pH changes is a wide and interesting area of research for the development of specific drug carriers. For example, thermo-sensitive PNIPAM may be combined with pH-responsive monomers, such as methacrylic acid (MAA), acrylic acid (AAc) or hyaluronic acid (HA) [46,53,59,96]. For example, Banerjee and co-workers developed a poly(NIPAM-co-acrylic acid) hydrogel that can be used for the sustained release of growth factors for a better healing response [53]. Kim et al. developed PNIPAM/HA hydrogel that efficiently delivers luteolin to the epidermis and dermis, for skin relief in psoriasis [46].

Indulekha et al. designed a thermoresponsive gel as an on-demand transdermal drug delivery system for pain management. They grafted pH-responsive chitosan onto thermoresponsive poly(N-vinyl caprolactam) (PVCL). Drug release from the gel and drug permeation through the skin were better at 39 °C and for a pH of 5.5. Patients can administer themselves with a pulse of drugs through the application of a heat pad over the transdermal drug delivery system, whenever pain is experienced [103]. This could be an alternative to implantable pumps for pain management.

Yamazaki et al. studied the effect of dual-responsive liposomes on melanocytes via the transdermal route. Methoxy diethyleneglycol methacrylate (MD) and methacrylic acid (MAA) were used, respectively, for temperature-sensitivity and pH-sensitivity. The content release from copolymer-modified liposomes was enhanced under acidic pH and body-temperature conditions (35–37 °C), corresponding to a skin environment. Owing to the deep penetration, the modified liposomes delivered antioxidants or UV-protective agents to melanocytes residing in deep skin tissues [58].

Jung et al. used the pH and temperature imbalance between the formulation and the lesions of atopic dermatitis to trigger active ingredient release from cationic nanocarriers [40]. In this study, ceramide-imbedded PLGA nanoparticles were developed with chitosan coating (Chi-PLGA/Cer). The chitosan coating was formed by electrostatic interactions with PLGA and prevented the initial burst release of ceramide. At low pH, the positive-rich condition of chitosan weakened the electrostatic interactions, leading to its removal from PLGA/Cer nanoparticles and resulting in a controlled release of ceramide

with additional driving force from the coiled structure of PLGA at around 36.5 °C. They successfully treated a sodium dodecyl sulfate (SDS)-induced model of atopic dermatitis in rats.

Recently, Soriano-Ruiz and co-workers designed a Pluronic/Chitosan/Hyaluronic-based vehicle, including three biological antioxidant molecules, aimed at improving the treatment of skin burns [47].

The development of redox/pH-responsive systems is widely studied because they are triggered by GSH increase and low pH, which are typically significant in inflamed/tumor tissues. However, these studies are rare when they deal with transdermal therapy. Mavuso et al. synthesized a dual pH/redox responsive copper-glyglycine-prednisolone succinate loaded nanoliposomal sludge for transdermal drug delivery [57]. In vitro, ex vivo and in vivo results confirmed the unique pH/redox responsive properties of the system. Nanoliposomal sludge has significant potential for application in chronic inflammatory conditions such as tumor necrosis factor-receptor associated periodic syndrome.

4. Proof of Concept: Demonstration of the Stimuli-Responsiveness of the SDDS

Vehicles developed for topical application must respect the following rules: be non-toxic, not irritating to the skin, and have good biocompatibility. Regarding SDDS strategy, several additional investigations are required to prove the stimulus-responsiveness of the system and to check that this sensitivity plays a role in the release of the active ingredient and its penetration in the skin. Indeed, the fact that a system is made of or contains a stimuli-responsive polymer does not mean that it will itself become responsive to the same stimulus or to the same intensity of the stimulus.

4.1. Physico-Chemical Characterization of the Stimuli-Responsiveness

4.1.1. Characterization Methods Specific to Thermoresponsive SDDS

Thermoresponsive gels are polymer solutions that transition to a gel state upon an increase in temperature above a critical point. In the articles reviewed here, such sharp changes in properties were followed by related techniques, i.e., viscometry [94], turbidimetry [53], light scattering [77], and calorimetry [100], to identify the phase transition temperature. Some of these techniques are adapted to the characterization of polymer solutions or hydrogels.

Tcp determination by turbidimetry. This technique is most widely used to determine the cloud point temperature (Tcp) of thermoresponsive polymer solutions. Tcp refers to the temperature at which the phase transition of a polymer solution at a specific concentration occurs from the soluble state to the collapsed aggregated state, accompanied by clouding of the solution. Briefly, a solution of the polymer is prepared in water, filled into a suitable cuvette and placed in the spectrometer. A temperature program is applied to heat the solution, and the transmittance of light through the solution is constantly measured. Banerjee and co-workers used this method to determine the Tcp value of poly(NIPAM-co-AAc) solution, calculated from the normalized transmittance vs. temperature curve at 50% transmittance. A rapid decrease in the transmittance was observed between 33–37 °C [53].

Particle size distribution analysis by Dynamic Light Scattering (DLS). DLS is a non-invasive, well-established technique for measuring the size and size distribution of molecules and particles from below 5 nm to several microns. DLS measurements of the polymer solutions can be performed at different temperatures to follow the volume phase transition temperature (VPTT). Below the VPTT, polymer chains exist as individually dissolved polymer chains with a small hydrodynamic radius, and above the VPTT, polymer chains are partially dehydrated, leading to collapse and agglomeration to form particles of a larger size. Compared with other techniques, DLS provides direct information on the particle size of the polymers, allowing for accurate determination of the onset of the phase separation by the appearance of polymer agglomerates, even when they do not yet cause clouding of the solution. For example, DLS was used to determine the VPTT of thermoresponsive nanogels. At 30 °C, the size is close to 50 nm, but at 36 °C, the

size increased to 350 nm, which attests to the thermosensitivity of the system up to a temperature of 36 °C, slightly higher than the temperature of healthy skin [77].

Phase transition temperature measurement by Differential Scanning Calorimetry (DSC). DSC is a technique used to investigate the response of polymers to heating. The sudden change from hydrophilic to hydrophobic behavior of the same polymer is based on the loss of the specific hydrogen bonds between the polymer and the surrounding water molecules. This change in hydrophilic-hydrophobic balance of a thermoresponsive polymer is an endothermic process that could be examined by calorimetric methods. Lopez and co-workers used the DSC method to determine the phase transition temperature of PNIPAM-based microgels and observed an endothermic transition at 34 °C [59].

4.1.2. Swelling/Shrinking Studies

Regarding the majority of the smart systems described previously, their sensitivity to stimulus leads to a swelling/shrinking of the system, leading to the release of the AI. Swelling/shrinking analysis could be performed using the DLS method. Indeed, it is possible to follow the hydrodynamic diameter/particle volume as the function of stimulus application (temperature or pH range) [49,56,59,73,77,99,100]. Since DLS analysis must be performed on transparent liquids, it is not available for concentrated or turbid systems such as opaque hydrogels.

For hydrogels, the swelling behavior could also be studied by comparing the weight of the dry vs. wet pellet/hydrogel [35,42,44,45,54]. Briefly, dried hydrogels are completely immersed in swelling medium, then weighed after the excessive solution on the surface is blotted. Thanks to this method, Kwon and co-workers showed that the swelling ratios of anionic polymer-based hydrogels vary from more than 1000% in acidic conditions to more than 3000% in alkali conditions [45].

4.2. In Vitro Triggered Drug Release Studies

The aim of smart drug delivery systems (SDDS) is notably to release or accelerate the release of the active ingredient in the right place, at the right time. It is essential in the development of such systems to study the release of the encapsulated active ingredient in the presence or the absence of appropriate stimulus. When it is possible, results obtained from smart sensitive systems are compared to those obtained with non-sensitive equivalent systems [53,77,129].

To study the stimulus-triggered drug release, in vitro experiments are performed. SDDS are incubated in conditions mimicking the stimulus (specific pH, temperature, redox potential). The release of the AI is then analyzed by qualitative methods to demonstrate the responsiveness to the stimulus or quantitative methods to establish the release kinetics of the AI.

4.2.1. Proof of Concept Using Qualitative Methods

The Electron Paramagnetic Resonance (EPR) technique makes it possible to study paramagnetic molecules or materials (e.g., unpaired electrons) and to obtain valuable information on their structure and chemical environment. It is a powerful, non-invasive spectroscopic tool that can be used to monitor spin-labelled drug release processes in vitro and in vivo [130]. The EPR line shape displays the dynamic motions of the spin-labelled drugs, and a specific signal will be obtained for immobilized (i.e., encapsulated) or mobile drugs. Dong and co-workers used this method to investigate pH-triggered drug release. To use the EPR method, they loaded spin-labelled dexamethasone (DxPCA) into pH-sensitive Eudragit® L100 nanoparticles (NPs). First, the NPs dispersion was diluted with pH 7.2 phosphate-buffered saline or pH 4 HCl solution. Then, EPR measurements were performed, and results showed that, with increase of the pH, the signal associated with mobile drugs increased, while the signal associated with immobilized (encapsulated) drugs declined in intensity [63].

4.2.2. Release Kinetics Studies

Most of the time, the release of the drug is evaluated by putting the SDDS in contact with a liquid medium mimicking the stimulus. The released AI is then determined in the release medium with the appropriate analytical method, and a release kinetics curve can be drawn. In some rare cases, the SDDS, specifically hydrogels, do not hinder the analysis of the release medium. The hydrogel can be plunged in release media of different pH. The release medium is taken at a constant time for AI determination [44–46,48,61]. For example, Park and co-workers used this method to investigate the release efficiency of their pH-sensitive anionic gel. They examined the drug release behavior from this gel at pH 5.5 (the normal skin pH), 7.5 (the acne skin pH), and 8.5 (the atopic skin pH). The cumulative release of drug at pH 5.5, 7.5, and 8.5 after 24 h was 42%, 70%, and 73%, respectively [48], showing the pH responsiveness of the SDDS.

Most of the time, the release medium has to be separated from the SDDS to be analyzed. Three major methods of separation are described: the dialysis method, the use of Franz cells and centrifugation (Figure 5).

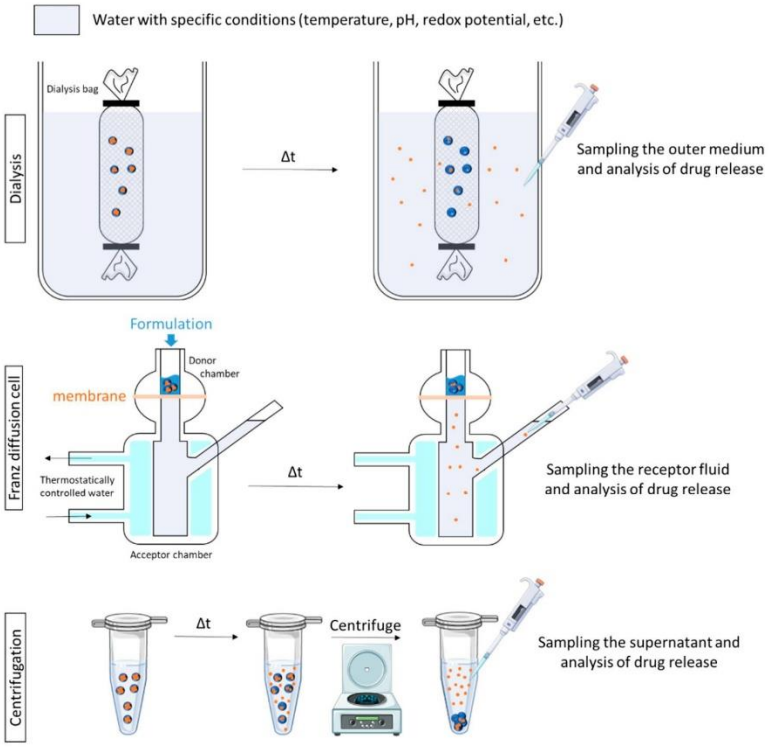


Figure 5. In vitro triggered drug release studies: methods used to separate the released drug from its smart system.

Dialysis method. Of all the methods used to assess drug release, the dialysis method is the most versatile and popular. In this method, physical separation of SDDS and the released drug is achieved using a dialysis membrane. Of the variety of dialysis method set-ups used, the most commonly cited is the dialysis bag [36–39]. Briefly, the SDDS is introduced into a dialysis bag of appropriate pore size, containing release media (inner media). It is subsequently sealed and placed in a larger vessel containing release media (outer media). At a scheduled time, an appropriate volume of the outer medium is withdrawn, and release kinetics can be established. This method is appropriate for pH

triggering as the outer medium can be constituted of buffers showing different pH. Sahu and co-workers used the dialysis method to investigate the in-vitro drug release pattern of prepared pH-responsive cationic nanogels. They compared in vitro drug release results after using different saline phosphate buffer with different pH (4–7), and a significant drug release was observed at pH 4 [36].

Franz-type diffusion cells. Franz-type diffusion cells are used to study drug release with a synthetic membrane [49,56,65,73,101]. Franz cells consist of two primary chambers (donor and acceptor) separated by a membrane. The test product is applied to the membrane via the top chamber-donor compartment. The bottom chamber-acceptor compartment contains fluid from which samples are taken at regular intervals for analysis. For pH-triggered drug release studies, the acceptor compartment is filled with the buffer media of interest (specific pH). For temperature-triggered drug release, the system is kept in a temperature-controlled water bath to maintain the temperature of interest in the donor compartment. For example, Rozman and co-workers used this technique and maintained the temperature in the donor compartment at 32 °C or 20 °C in order to investigate vitamin release from temperature-sensitive microemulsion gel. Results showed that at 32 °C, 75% of vitamin C was released in 6h compared with 30% at 20 °C [73].

Centrifugation. More rarely, centrifugation is used to study drug release from nanogels. SDDS are placed in a medium with specific conditions (pH, temperature) and, at predetermined intervals, aliquots are withdrawn and centrifuged, and the supernatant is analyzed [34,35]. In other studies, SDDS are placed in a centrifugal filtering device and incubated at specific conditions. At certain time intervals, the samples are centrifuged, and the filtrate is analyzed [74,113].

4.3. Triggered Skin Penetration Studies

In in vitro stimulus-triggered drug release studies, there are two main types of techniques for skin penetration studies. Quantitative techniques include the use of diffusion cells. Qualitative or quantitative techniques are different microscopic and spectroscopic methods and the combinations thereof.

4.3.1. Types of Skin Models

Penetration studies can be performed on artificial (Strat-M® membrane [104]), human (reconstructed or excised skin [95]) or animal skin (usually rodents [75]). Even if most of the studies are performed on normal skin models, some authors develop specific skin models to get closer to the real use of the SDDS. For example, to mimic an impaired skin barrier, the skin can be tape-stripped 30 or 50 times [10,63,76,131]. To mimic atopic dermatitis (AD), filaggrin-deficient (FLG-) skin equivalent can be generated. The characteristics of those pathological skin models were highlighted by histology techniques, changes in the expression of epidermal barrier proteins and defects in the cutaneous innate immune response [74,76]. To mimic a chronic wound, a wound could be induced in normal human skin constructs by cutting the epidermal layer with a scalpel. To simulate the pH conditions of chronic wounds, wounded human skin constructs can be supplied with alkaline cell culture medium (pH 8) [54].

4.3.2. Mapping the Active Ingredient 2D/3D Distribution in Skin

Microscopic techniques give important information about the spatial distribution of the active ingredient inside different skin layers or explain the mechanism of penetration.

Fluorescence microscopy is a frequently used method. Briefly, fluorescently labelled SDDS are applied to skin before incubation under specific triggering conditions. After incubation, skin (cryo)sections are observed under a fluorescence microscope, and pictures are taken and analyzed using the appropriate software. The mean fluorescence intensity of areas in different skin layers is then measured [10,77]. To visualize the effects of temperature on skin penetration and drug release, the temperature during incubation time can be modified. For example, in Asadian-Birjand's study, labelled-nanogels were applied to

human skin, and the skin sample was incubated at 4 °C or 37 °C for 4 h. Results showed higher fluorescence intensities in viable skin for samples incubated at 37 °C in comparison with the same nanogels incubated at 4 °C [77]. The release of the AI can also be triggered by an external stimulus. In Rancan's study, skin samples with topically applied tagged tNG were irradiated for 30 s with an infrared (IR)-lamp. During this short time of irradiation, the skin surface temperature reached a maximum of 40 °C, as measured by means of an IR thermometer. The tNG then stayed in contact with the skin for two hours before analysis by fluorescence microscopy. The results showed enhanced penetration of tNGs with a release of dye in the epidermis upon thermal trigger [10].

Fluorescence measurements could be performed by means of a confocal laser microscope. This method gives the possibility to image deep into a three-dimensional biological sample like skin, at high resolution, high speed, in in vitro and in vivo conditions. Osorio-Blanco and co-workers used this technique in order to investigate the interactions and effects of thermoresponsive nanocarriers (NCs) on the stratum corneum of excised human skin. Briefly, rhodamine B was coupled to NCs before their application on excised human skin. Sample irradiation was performed for 30 s (using a standard IR lamp) to increase the skin surface temperature at 40 ± 2 °C. The samples were then incubated for 1000 min at a temperature below the phase transition point of the NCs. After incubation, skin sections were cut and analyzed by employing fluorescence microscopy imaging. The NCs-treated samples (with or without an IR trigger) were found to have a similar average fluorescence intensity in both upper and lower regions of the SC. However, thanks to stimulated Raman scattering (SRS) microscopy, which notably enabled them to trace deuterated water within the different layers of the skin, they showed that the thermoresponsive features of the NCs further enhanced skin hydration [95].

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) imaging can be performed to determine the distribution of the drug throughout the depth of the skin. Kang and co-workers used this technique in order to attest the interest of their thermosensitive solid lipid nanoparticles (SLNs) for improved dermal distribution. Briefly, the ex vivo skin penetration test of thermosensitive SLNs (or reference products) was conducted by using excised rat dorsal skin samples, mounted in the Franz-diffusion cell (37 °C). After 24 h, the skin was cut vertically into slices to determine the difference in drugs by depth. The skin slice was placed on a glass slide and examined by FT-IR imaging. The wavelength of 3450 cm^{-1}, corresponding to a strong infrared absorption of the drug, was used for analysis. Results showed that smart SLNs delivered more drugs to deeper skin layers than the reference product [75].

4.3.3. Quantitative Techniques

Franz-type diffusion (FD) cells and analogues are commonly used to study the skin penetration of AI. The principle is the same as that described above for release kinetics studies (part 4.2.2.), but instead of using synthetic membranes, reconstructed, human or animal skin are used. Different scenarios are then possible, which can be compatible with each other:

1. Samples of receptor fluid are taken at regular intervals and replaced with an equal volume of fresh medium. The samples are then analyzed by appropriate techniques (e.g., HPLC) for AI determination. The cumulative amounts of the drug are then plotted against the time, showing the permeation behavior [34,73,81,96].
2. At a specific time, at the end of the permeation study or before, the skin is removed from the FD cells, and the stratum corneum is wiped clean. The amount of AI retained in the entire skin or in each layer is determined after appropriate extraction [79]. The skin can be sectioned using different methods (e.g., cryo-sections [34,37,76], heating [73], forceps [80], or go through tape-stripping [46,48,75]) before AI determination in each layer.

To mimic the stimulus, which is the temperature gradient within the skin, the temperature of the setup was increased from 32 to 37 °C during skin penetration studies [74,76]. To

mimic a release triggered by a heating source such as heat pad, Indulekha and co-workers used FD cells at two different temperatures. The first temperature, 32 °C, corresponds to normal skin temperature and the second one, 39 °C, corresponds to higher skin temperature, simulating the application of a heat pad. The temperature of 39 °C was maintained by shining the IR lamp on the skin with optimized time and exposure. Results showed that the cumulative AI permeated in the receiver compartment was significantly higher at 39 °C [103]. To mimic the temperature difference between the formulation (usually room temperature) and the skin surface (32 °C), Zavgorodnya and co-workers maintained the diffusion cell at 32 or 25 °C [104]. To mimic the pH difference between healthy skin (pH ~5) and diseased skin (pH ~7), Rizi and co-workers used FD cells with two different receptor media: one adjusted to pH 5 and one to pH 7. Results showed that all the formulations developed delivered significantly greater amounts of AI through porcine skin at pH 7 than at pH 5. Their approach demonstrates that it is feasible to deliver the active ingredient in diseased skin sites, where the pH is more alkaline than that of healthy skin [65].

4.4. In Vivo Efficacy

Some pathologies cannot be simulated in vitro. It is then necessary to evaluate the efficacy of the SDDS in vivo. For example, rodent models of inflammation, burns or wounds are used to assess the efficacy of SDDS [47,53,57]. Briefly, rodents are anesthetized, and their back is shaved and cleaned before being exposed to hot circular cylindrical devices [47,105] or excision [51,53]. After receiving the topical treatment of interest, representative photographs of wounds on animals and healing evolution are performed. After treatment period, rodents are sacrificed, and the skin of the back is surgically excised to be analyzed. For example, Mavuso et al. designed a topical delivery system with pH/redox responsive properties, which was supposed to have the ability to respond directly to the imbalance caused by skin inflammation. To prove the pH/redox responsiveness, two groups of rats were compared: a control group and a group with induced skin inflammation. Each group underwent administration of the relevant formulation, followed by blood sampling to evaluate the plasmatic AI concentration. Results displayed a higher degree of AI resorption in rats suffering from inflammation compared with the control group [57]. In another study, the in vivo efficacy of pH-responsive hydrogels was evaluated in a full thickness murine excisional wound model. Photographs of the wounds were taken weekly. At predetermined time, wound biopsies were collected for further histological and immunohistochemical study. Results revealed that a growth-factor-loaded wound-pH-responsive hydrogel induces a better healing response in comparison with a wound-healing-insensitive growth factor delivery system [53].

Jung and co-workers generated a psoriasis rat model. The hair was removed from the rat's backs, after which 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) in distilled water was applied for 2 days to generate a psoriasis model. Stratum corneum is known to be dried by SDS, which results in the layer becoming dehydrated and the composition of lipids in the layer changing. On day 3, the rats' backs were divided into four parts and treated with different products including the SDDS of interest. Next, the back skin of the rats was excised on day 5 and 7 after treatment, and recovery of psoriatic skin was confirmed by hematoxylin and eosin staining [40].

5. Discussion

The literature on smart drug delivery systems (SDDS) increases exponentially and the variety of stimuli-responsive materials already described is significant. Analysis of the recent literature shows that interest in polymer-based SDDS is now present in the fields of dermatology and cosmetology, with the SDDS showing promising results in transdermal delivery.

Two major forms are developed: polymer-based hydrogels and nanosystems, particularly nanogels. Concerning hydrogels, their responsiveness to stimulus can be used for two main purposes: in situ gel formation or AI controlled release. In situ gel formation

can be very interesting in the case of wound healing: the solution is applied to the wound, where it turns to a gel thanks to a specific pH or temperature of the skin. The liquid presentation allows users to tightly fit the contours of the wound, which ensures adhesion to the whole surface, while gelation ensures protection and constant moisturization of the wound. Swelling gels can also absorb wound exudates. Contrary to hydrogels, nanosystems can penetrate deeply into the tissue, according to their composition and surface properties [132–134], for example through hair follicles, and treat pathologies at deeper layers of the skin. Concerning the polymers used to prepare SDDS intended for skin application, their properties are selected to correspond to healthy or diseased skin. For temperature responsive systems, the release of the AI is triggered by the difference in temperature between the formula and the skin (immediate release) or by the gradient of temperature in the skin. Another possibility is to use an external device, like an infrared lamp, to trigger the release. It is not yet widely used as there is a risk of burning the lighted area. Nevertheless, this concept needs to be pursued as it could be a way for more specific delivery, and it could open the field to other polymers with higher VPPT and limit interindividual variability.

The majority of the SDDS intended for skin application are responsive to pH or temperature. They are linked to the specific physiology of the skin, leading to pH or temperature gradients in the normal or diseased skin. Nevertheless, the applications are limited to those stimuli, and researchers have to consider a wider diversity of stimuli that could be interesting in the dermatology or cosmetology fields, like the redox potential of skin cells, which varies in many skin conditions or pathologies, or take advantage of the enzymatic machinery present in the skin. In the same vein, only a few studies explore the use of external devices to trigger the SDDS.

Although interest in using SDDS for skin application has already been demonstrated in the literature, for the moment, only a few of those systems have been marketed [72]. This slow incorporation of smart nanocarriers in the market could be explained by several factors:

- Most materials are synthesized under poorly reproducible conditions, and the methods to prepare smart SDDS are not standardized.
- The developed polymer-based SDDS are considered to be "new excipients", and thus toxicity, biocompatibility and biodegradability are major issues that take time to be elucidated. That is why, in particular, alternatives to thermoresponsive NIPAM, which is not biodegradable, are studied, like ethylene glycol methacrylate or N-vinylcaprolactam. The use of natural polymers is also an interesting way to tackle the issue. Some authors started to slightly modify natural polymers to make them responsive to pH or temperature. This shift towards naturalness is all the more marked in the field of cosmetics.
- Another important point is the cost of production and evaluation of smart products, compared with already established dermocosmetics products. This is not discussed in the literature yet but has an important impact on the industrial feasibility of the systems. Our recent results indicated that the SDDS made of only 33% of the redox responsive mPEG-SS-PLA polymers were active in vitro [124]. Thus, the use of a mixture of stimuli-responsive and neutral polymers could be a way to control the SDDS cost.
- Different from traditional dosage forms, the impact of the stimulus-responsiveness on the release kinetics or efficacy of the SDDS has to be attested; therefore, there is a need for developing suitable analytical techniques.

This last point remains the most essential issue. Indeed, the fact that a smart polymer is used does not directly confer stimuli-responsiveness to a delivery system. One could expect a harmonization of the methods used to prove the implication of the stimulus in the efficacy of the systems. More than a simple demonstration of the sensitivity of the polymer, various available protocols and methods have to be applied in a complementary manner in order to have a complete vision of SDDS performance/limitations. In vitro release studies

are very important to provide proof of concept. However, the release media often used are hydrophilic buffers that do not simulate the highly lipophilic skin surface. Moreover, it has been reported that the pH of the buffer influences the volume phase transition temperature (VPTT) of thermoresponsive polymers [53,135]. As the pH of the skin is acidic, it would be relevant to determine the VPTT value of a thermoresponsive system under conditions similar to those found on the skin. However, in studies of thermoresponsive systems for topical applications, very few take into account the acidic pH of the skin to evaluate the VPTT [53].

Due to the limits of in vitro attesting of the response to the stimulus, proof-of-concept studies of new SDDS should be completed with ex vivo experiments. Permeation tests are notably essential to measure the performance of smart transdermal delivery systems. Generally, human skin biopsies are the gold standard. However, the limited availability of fresh human skin leads to the use of defrosted skin. However, the latter is known for showing a low barrier function compared with human skin in vivo [136]. In the case of SDDS, it would be important to demonstrate that both the pH, redox potential and enzymatic activity are comparable to the skin in vivo. Animal skin is less and less used for permeation studies as reglementary and ethical issues render these models less attractive. In the last three decades, enormous efforts have been put into developing artificial membranes and cultured 3D models of human skin [137]. In the years to come, reconstructed skin could become a very interesting for testing SDDS as it shows more and more functionalities, including enzymatic activity [138]. Moreover, some reconstructed models of skin disease like atopic dermatitis have been developed recently [139].

Some skin diseases or conditions cannot be reproduced in vitro or ex vivo. It is then necessary to test SDDS on animal models. For certain applications, the stimulus is generated by the skin (inflammation, wounds). In this case, the lesion must be well characterized to demonstrate that the local pH or temperature is comparable in both reconstructed and natural human skin. For other applications, like psoriasis or atopic dermatitis, the stimulus has to be artificially generated by chemicals. This field could benefit from the harmonization of practices to allow for comparison of the efficacy of the systems.

6. Conclusions

The skin is a key site for local and systemic drug delivery. It has the unique qualities of being easily accessible yet relatively impermeable. Overcoming the remarkable skin barrier properties in an efficient, temporary and safe manner remains a challenge. To enhance their efficacy and reduce the related side effects, active ingredients should selectively accumulate in the disease area with high controllability. Smart drug delivery systems (SDDS) sensitive to a specific environment can be part of the pharmaceutical arsenal to treat dermatological pathologies. In this field, smart polymers are mostly used to develop SDDS, such as polymer-based nanogels or hydrogels.

Scientists have innovated the field of the dermo-cosmetic formulations, as well as the analytical methods (in vitro, ex vivo or in vivo) used to attest to their interest in increasing the efficiency of products. Many SDDS show a better efficacy than classic dosage form. Even if the most commonly used stimuli remain the pH of the skin (healthy and/or diseases) and the temperature (surface or gradient), other stimuli, such as the redox potential, light, enzymes, electric fields, etc., are increasingly studied to trigger the release of active ingredients in the dermatological and cosmetic fields, which will undoubtedly make it possible to improve the management of skin pathologies. Likewise, significant progress is expected in the developments of smart transdermal drug delivery systems.

Author Contributions: Conceptualization, E.M. and L.V.G.; writing—original draft preparation, L.V.G., C.G.; writing—review and editing, E.M.; L.V.G.; I.C.; supervision, E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the project MISTIC 2017-00118114 (Cosmétosciences program). This research received financial support from Conseil Régional Centre Val-de-Loire and European Regional Development Fund (FEDER, N°EX003257).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

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

References

1. Liu, D.; Yang, F.; Xiong, F.; Gu, N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. *Theranostics* **2016**, *6*, 1306–1323. [CrossRef]
2. Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. Smart Drug Delivery Systems: From Fundamentals to the Clinic. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 7743–7765. [CrossRef]
3. Sanchez-Moreno, P.; Ortega-Vinuesa, J.L.; Peula-Garcia, J.M.; Marchal, J.A.; Boulaiz, H. Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. *CDT* **2018**, *19*, 339–359. [CrossRef]
4. Fierheller, M.; Sibbald, R.G. A Clinical Investigation into the Relationship between Increased Periwound Skin Temperature and Local Wound Infection in Patients with Chronic Leg Ulcers. *Adv. Skin Wound Care* **2010**, *23*, 369–379. [CrossRef]
5. Pastore, S.; Korkina, L. Redox Imbalance in T Cell-Mediated Skin Diseases. *Mediat. Inflamm.* **2010**, *2010*, 1–9. [CrossRef]
6. Rippke, F.; Schreiner, V.; Doering, T.; Maibach, H.I. Stratum Corneum PH in Atopic Dermatitis: Impact on Skin Barrier Function and Colonization with Staphylococcus Aureus. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2004**, *5*, 217–223. [CrossRef]
7. Wagener, F.; Carels, C.; Lundvig, D. Targeting the Redox Balance in Inflammatory Skin Conditions. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9126–9167. [CrossRef]
8. Dai, Y.-Q.; Qin, G.; Geng, S.-Y.; Yang, B.; Xu, Q.; Wang, J.-Y. Photo-Responsive Release of Ascorbic Acid and Catalase in CDBA-Liposome for Commercial Application as a Sunscreen Cosmetic. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 3340. [CrossRef]
9. Huang, X.; Wang, X.; Wang, S.; Yang, J.; Zhong, L.; Pan, J. UV and Dark-Triggered Repetitive Release and Encapsulation of Benzophenone-3 from Biocompatible ZnO Nanoparticles Potential for Skin Protection. *Nanoscale* **2013**, *5*, 5596. [CrossRef] [PubMed]
10. Rancan, F.; Giulbudagian, M.; Jurisch, J.; Blume-Peytavi, U.; Calderón, M.; Vogt, A. Drug Delivery across Intact and Disrupted Skin Barrier: Identification of Cell Populations Interacting with Penetrated Thermoresponsive Nanogels. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *116*, 4–11. [CrossRef]
11. Javadzadeh, Y.; Azharshekoufeh Bahari, L. Therapeutic Nanostructures for Dermal and Transdermal Drug Delivery. In *Nano- and Microscale Drug Delivery Systems*; Elsevier: Oxford, UK, 2017; pp. 131–146. ISBN 978-0-323-52727-9.
12. Bos, J.D.; Meinardi, M.M.H.M. The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs: The 500 Dalton Rule for Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs. *Exp. Dermatol.* **2000**, *9*, 165–169. [CrossRef]
13. Hadgraft, J. Skin Deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 291–299. [CrossRef] [PubMed]
14. Ahmad, U.; Ahmad, Z.; Khan, A.; Akhtar, J.; Singh, S.; Ahmad, F. Strategies in Development and Delivery of Nanotechnology Based Cosmetic Products. *Drug Res.* **2018**, *68*, 545–552. [CrossRef]
15. Alkilani, A.; McCrudden, M.T.; Donnelly, R. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* **2015**, *7*, 438–470. [CrossRef]
16. Ramadon, D.; McCrudden, M.T.C.; Courtenay, A.J.; Donnelly, R.F. Enhancement Strategies for Transdermal Drug Delivery Systems: Current Trends and Applications. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2021**. [CrossRef]
17. Dhamecha, D.; Rajendra, V.; Rathi, A.; Ghadlinge, S.; Saifee, M.; Dehghan, M. Physical Approaches to Penetration Enhancement. *Int. J. Health Res.* **2011**, *3*, 57–70. [CrossRef]
18. Draelos, Z.K. *Cosmetic Dermatology: Products and Procedures*; Wiley Blackwell: Oxford, UK, 2016; ISBN 978-1-118-65546-7.
19. Bharkatiya, M.; Nema, R. Skin Penetration Enhancement Techniques. *J Young Pharm.* **2009**, *1*, 110. [CrossRef]
20. Kováčik, A.; Kopečná, M.; Vávrová, K. Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery: Benefits and Limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 145–155. [CrossRef]
21. Sood, N.; Bhardwaj, A.; Mehta, S.; Mehta, A. Stimuli-Responsive Hydrogels in Drug Delivery and Tissue Engineering. *Drug Deliv.* **2016**, *23*, 748–770. [CrossRef]
22. Mota, A.H.; Rijo, P.; Molpeceres, J.; Reis, C.P. Broad Overview of Engineering of Functional Nanosystems for Skin Delivery. *Int. J. Pharm.* **2017**, *532*, 710–728. [CrossRef]
23. Peer, D.; Karp, J.M.; Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 751–760. [CrossRef] [PubMed]
24. Abasian, P.; Ghanavati, S.; Rahebi, S.; Nouri Khorasani, S.; Khalili, S. Polymeric Nanocarriers in Targeted Drug Delivery Systems: A Review. *Polym. Adv. Technol.* **2020**, *31*, 2939–2954. [CrossRef]
25. Soni, K.S.; Desale, S.S.; Bronich, T.K. Nanogels: An Overview of Properties, Biomedical Applications and Obstacles to Clinical Translation. *J. Control Release* **2016**, *240*, 109–126. [CrossRef]

26. Lambers, H.; Piessens, S.; Bloem, A.; Pronk, H.; Finkel, P. Natural Skin Surface PH Is on Average below 5, Which Is Beneficial for Its Resident Flora. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2006**, *28*, 359–370. [CrossRef] [PubMed]
27. Danby, S.G.; Cork, M.J. pH in Atopic Dermatitis. In *Current Problems in Dermatology*; Surber, C., Abels, C., Maibach, H., Eds.; S. Karger AG: Basel, Switzerland, 2018; Volume 54, pp. 95–107. ISBN 978-3-318-06384-4.
28. Eberlein-König, T.; Schäfer, J.; Huss, B. Skin Surface PH, Stratum Corneum Hydration, Trans-Epidermal Water Loss and Skin Roughness Related to Atopic Eczema and Skin Dryness in a Population of Primary School Children: Clinical Report. *Acta Derm. Venereol.* **2000**, *80*, 188–191. [CrossRef]
29. Sparavigna, A.; Setaro, M.; Gualandri, V. Cutaneous PH in Children Affected by Atopic Dermatitis and in Healthy Children: A Multicenter Study. *Skin Res. Technol.* **1999**, *5*, 221–227. [CrossRef]
30. Seidenari, S.; Francomano, M.; Mantovani, L. Baseline Biophysical Parameters in Subjects with Sensitive Skin. *Contact Dermat.* **1998**, *38*, 311–315. [CrossRef]
31. Runeman, J.; Faergemann, O.; Larkö, B. Experimental Candida Albicans Lesions in Healthy Humans: Dependence on Skin PH. *Acta Derm. Venereol.* **2000**, *80*, 421–424. [CrossRef]
32. Schürer, N. pH and Acne. In *Current Problems in Dermatology*; Surber, C., Abels, C., Maibach, H., Eds.; S. Karger AG: Basel, Switzerland, 2018; Volume 54, pp. 115–122. ISBN 978-3-318-06384-4.
33. Schneider, L.A.; Korber, A.; Grabbe, S.; Dissemond, J. Influence of PH on Wound-Healing: A New Perspective for Wound-Therapy? *Arch. Dermatol. Res.* **2007**, *298*, 413–420. [CrossRef]
34. Sabitha, M.; Rejinold, N.S.; Nair, A.; Lakshmanan, V.-K.; Nair, S.V.; Jayakumar, R. Curcumin Loaded Chitin Nanogels for Skin Cancer Treatment via the Transdermal Route. *Nanoscale* **2012**, *4*, 239–250. [CrossRef]
35. Sabitha, M.; Rejinold, N.S.; Nair, A.; Lakshmanan, V.-K.; Nair, S.V.; Jayakumar, R. Development and Evaluation of 5-Fluorouracil Loaded Chitin Nanogels for Treatment of Skin Cancer. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *91*, 48–57. [CrossRef] [PubMed]
36. Sahu, P.; Kashaw, S.K.; Sau, S.; Kushwah, V.; Jain, S.; Agrawal, R.K.; Iyer, A.K. PH Responsive 5-Fluorouracil Loaded Biocompatible Nanogels For Topical Chemotherapy of Aggressive Melanoma. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *174*, 232–245. [CrossRef]
37. Sahu, P.; Kashaw, S.K.; Sau, S.; Kushwah, V.; Jain, S.; Agrawal, R.K.; Iyer, A.K. PH Triggered and Charge Attracted Nanogel for Simultaneous Evaluation of Penetration and Toxicity against Skin Cancer: In-Vitro and Ex-Vivo Study. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *128*, 740–751. [CrossRef]
38. Sahu, P.; Kashaw, S.K.; Jain, S.; Sau, S.; Iyer, A.K. Assessment of Penetration Potential of PH Responsive Double Walled Biodegradable Nanogels Coated with Eucalyptus Oil for the Controlled Delivery of 5-Fluorouracil: In Vitro and Ex Vivo Studies. *J. Control Release* **2017**, *253*, 122–136. [CrossRef]
39. Sahu, P.; Kashaw, S.K.; Kushwah, V.; Sau, S.; Jain, S.; Iyer, A.K. PH Responsive Biodegradable Nanogels for Sustained Release of Bleomycin. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4595–4613. [CrossRef]
40. Jung, S.-M.; Yoon, G.H.; Lee, H.C.; Jung, M.H.; Yu, S.I.; Yeon, S.J.; Min, S.K.; Kwon, Y.S.; Hwang, J.H.; Shin, H.S. Thermodynamic Insights and Conceptual Design of Skin-Sensitive Chitosan Coated Ceramide/PLGA Nanodrug for Regeneration of Stratum Corneum on Atopic Dermatitis. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 18089. [CrossRef] [PubMed]
41. Chatterjee, S.; Hui, P.C.; Wat, E.; Kan, C.; Leung, P.-C.; Wang, W. Drug Delivery System of Dual-Responsive PF127 Hydrogel with Polysaccharide-Based Nano-Conjugate for Textile-Based Transdermal Therapy. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *236*, 116074. [CrossRef]
42. Zhu, L.; Bratlie, K.M. PH Sensitive Methacrylated Chitosan Hydrogels with Tunable Physical and Chemical Properties. *Biochem. Eng. J.* **2018**, *132*, 38–46. [CrossRef]
43. Klee, S.K.; Farwick, M.; Lersch, P. Triggered Release of Sensitive Active Ingredients upon Response to the Skin's Natural PH. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2009**, *338*, 162–166. [CrossRef]
44. Jeong, H.J.; Nam, S.J.; Song, J.Y.; Park, S.N. Synthesis and Physicochemical Properties of PH-Sensitive Hydrogel Based on Carboxymethyl Chitosan/2-Hydroxyethyl Acrylate for Transdermal Delivery of Nobiletin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *51*, 194–203. [CrossRef]
45. Kwon, S.S.; Kong, B.J.; Park, S.N. Physicochemical Properties of PH-Sensitive Hydrogels Based on Hydroxyethyl Cellulose–Hyaluronic Acid and for Applications as Transdermal Delivery Systems for Skin Lesions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *92*, 146–154. [CrossRef]
46. Kim, A.R.; Lee, S.L.; Park, S.N. Properties and in Vitro Drug Release of PH- and Temperature-Sensitive Double Cross-Linked Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Based on Hyaluronic Acid/Poly (N-Isopropylacrylamide) for Transdermal Delivery of Luteolin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *118*, 731–740. [CrossRef]
47. Soriano-Ruiz, J.L.; Calpena-Campmany, A.C.; Silva-Abreu, M.; Halbout-Bellowa, L.; Bozal-de Febrer, N.; Rodríguez-Lagunas, M.J.; Clares-Naveros, B. Design and Evaluation of a Multifunctional Thermosensitive Poloxamer-Chitosan-Hyaluronic Acid Gel for the Treatment of Skin Burns. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *142*, 412–422. [CrossRef]
48. Park, S.H.; Shin, H.S.; Park, S.N. A Novel PH-Responsive Hydrogel Based on Carboxymethyl Cellulose/2-Hydroxyethyl Acrylate for Transdermal Delivery of Naringenin. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *200*, 341–352. [CrossRef]
49. Sahle, F.F.; Gerecke, C.; Kleuser, B.; Bodmeier, R. Formulation and Comparative in Vitro Evaluation of Various Dexamethasone-Loaded PH-Sensitive Polymeric Nanoparticles Intended for Dermal Applications. *Int. J. Pharm.* **2017**, *516*, 21–31. [CrossRef]
50. Ninan, N.; Forget, A.; Shastri, V.P.; Voelcker, N.H.; Blencowe, A. Antibacterial and Anti-Inflammatory PH-Responsive Tannic Acid-Carboxylated Agarose Composite Hydrogels for Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 28511–28521. [CrossRef] [PubMed]

51. Shi, M.; Zhang, H.; Song, T.; Liu, X.; Gao, Y.; Zhou, J.; Li, Y. Sustainable Dual Release of Antibiotic and Growth Factor from PH-Responsive Uniform Alginate Composite Microparticles to Enhance Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2019**, *11*, 22730–22744. [CrossRef] [PubMed]
52. Villanueva, M.E.; Cuestas, M.L.; Pérez, C.J.; Campo Dall' Orto, V.; Copello, G.J. Smart Release of Antimicrobial ZnO Nanoplates from a PH-Responsive Keratin Hydrogel. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *536*, 372–380. [CrossRef]
53. Banerjee, I.; Mishra, D.; Das, T.; Maiti, T.K. Wound PH-Responsive Sustained Release of Therapeutics from a Poly(NIPAAm-Co-AAc) Hydrogel. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2012**, *23*, 111–132. [CrossRef] [PubMed]
54. Koehler, J.; Wallmeyer, L.; Hedtrich, S.; Goepferich, A.M.; Brandl, F.P. PH-Modulating Poly(Ethylene Glycol)/Alginate Hydrogel Dressings for the Treatment of Chronic Wounds. *Macromol. Biosci.* **2017**, *17*, 1600369. [CrossRef]
55. Zhu, J.; Han, H.; Ye, T.-T.; Li, F.-X.; Wang, X.-L.; Yu, J.-Y.; Wu, D.-Q. Biodegradable and PH Sensitive Peptide Based Hydrogel as Controlled Release System for Antibacterial Wound Dressing Application. *Molecules* **2018**, *23*, 3383. [CrossRef] [PubMed]
56. Sahle, F.F.; Balzus, B.; Gerecke, C.; Kleuser, B.; Bodmeier, R. Formulation and in Vitro Evaluation of Polymeric Enteric Nanoparticles as Dermal Carriers with PH-Dependent Targeting Potential. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, *92*, 98–109. [CrossRef]
57. Mavuso, S.; Marimuthu, T.; Kumar, P.; Kondiah, P.P.D.; du Toit, L.C.; Choonara, Y.E.; Pillay, V. In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluation of a Dual PH/Redox Responsive Nanoliposomal Sludge for Transdermal Drug Delivery. *J. Pharm. Sci.* **2018**, *107*, 1028–1036. [CrossRef]
58. Yamazaki, N.; Sugimoto, T.; Fukushima, M.; Teranishi, R.; Kotaka, A.; Shinde, C.; Kumei, T.; Sumida, Y.; Munekata, Y.; Maruyama, K.; et al. Dual-Stimuli Responsive Liposomes Using PH- and Temperature-Sensitive Polymers for Controlled Transdermal Delivery. *Polym. Chem.* **2017**, *8*, 1507–1518. [CrossRef]
59. Lopez, V.C.; Hadgraft, J.; Snowden, M.J. The Use of Colloidal Microgels as a (Trans)Dermal Drug Delivery System. *Int. J. Pharm.* **2005**, *292*, 137–147. [CrossRef]
60. Lee, E.; Kim, B. Smart Delivery System for Cosmetic Ingredients Using PH-Sensitive Polymer Hydrogel Particles. *Korean J. Chem. Eng.* **2011**, *28*, 1347–1350. [CrossRef]
61. Şen, M.; Uzun, C.; Güven, O. Controlled Release of Terbinafine Hydrochloride from PH Sensitive Poly(Acrylamide/Maleic Acid) Hydrogels. *Int. J. Pharm.* **2000**, *203*, 149–157. [CrossRef]
62. Vuković, J.S.; Perić-Grujić, A.A.; Mitić-Ćulafić, D.S.; Božić Nedeljković, B.D.; Tomić, S.L. Antibacterial Activity of PH-Sensitive Silver(I)/Poly(2-Hydroxyethyl Acrylate/Itaconic Acid) Hydrogels. *Macromol. Res.* **2020**, *28*, 382–389. [CrossRef]
63. Dong, P.; Sahle, F.F.; Lohan, S.B.; Saeidpour, S.; Albrecht, S.; Teutloff, C.; Bodmeier, R.; Unbehauen, M.; Wolff, C.; Haag, R.; et al. PH-Sensitive Eudragit® L 100 Nanoparticles Promote Cutaneous Penetration and Drug Release on the Skin. *J. Control Release* **2019**, *295*, 214–222. [CrossRef]
64. Ibarra-Montaño, E.L.; Rodríguez-Laguna, N.; Aníbal Sánchez-Hernández, A.; Rojas-Hernández, A. Determination of PKa Values for Acrylic, Methacrylic and Itaconic Acids by 1H and 13C NMR in Deuterated Water. *J. Appl. Sol. Chem. Model.* **2015**, *4*, 7–18. [CrossRef]
65. Rizi, K.; Green, R.J.; Donaldson, M.X.; Williams, A.C. Using PH Abnormalities in Diseased Skin to Trigger and Target Topical Therapy. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2589–2598. [CrossRef]
66. Luo, Y.; Wang, Q. Recent Development of Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes with Natural Polysaccharides for Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *64*, 353–367. [CrossRef]
67. Kelly, R. Keratins in wound healing. In *Wound Healing Biomaterials*; Elsevier: Oxford, UK, 2016; pp. 353–365. ISBN 978-1-78242-456-7.
68. Peralta Ramos, M.L.; González, J.A.; Fabian, L.; Pérez, C.J.; Villanueva, M.E.; Copello, G.J. Sustainable and Smart Keratin Hydrogel with PH-Sensitive Swelling and Enhanced Mechanical Properties. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *78*, 619–626. [CrossRef]
69. Gulfam, M.; Sahle, F.F.; Lowe, T.L. Design Strategies for Chemical-Stimuli-Responsive Programmable Nanotherapeutics. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 129–147. [CrossRef]
70. Chen, W.; Meng, F.; Cheng, R.; Zhong, Z. PH-Sensitive Degradable Polymersomes for Triggered Release of Anticancer Drugs: A Comparative Study with Micelles. *J. Control Release* **2010**, *142*, 40–46. [CrossRef] [PubMed]
71. Pan, C.; Liu, Y.; Zhou, M.; Wang, W.; Shi, M.; Xing, M.; Liao, W. Theranostic PH-Sensitive Nanoparticles for Highly Efficient Targeted Delivery of Doxorubicin for Breast Tumor Treatment. *IJN* **2018**, *13*, 1119–1137. [CrossRef]
72. Quattrone, A.; Czajka, A.; Sibilla, S. Thermosensitive Hydrogel Mask Significantly Improves Skin Moisture and Skin Tone; Bilateral Clinical Trial. *Cosmetics* **2017**, *4*, 17. [CrossRef]
73. Rozman, B.; Zvonar, A.; Falson, F.; Gasperlin, M. Temperature-Sensitive Microemulsion Gel: An Effective Topical Delivery System for Simultaneous Delivery of Vitamins C and E. *AAPS Pharmscitech* **2009**, *10*, 54–61. [CrossRef]
74. Giulbudagian, M.; Hönzke, S.; Bergueiro, J.; Işık, D.; Schumacher, F.; Saeidpour, S.; Lohan, S.B.; Meinke, M.C.; Teutloff, C.; Schäfer-Korting, M.; et al. Enhanced Topical Delivery of Dexamethasone by β-Cyclodextrin Decorated Thermoresponsive Nanogels. *Nanoscale* **2018**, *10*, 469–479. [CrossRef] [PubMed]
75. Kang, J.-H.; Chon, J.; Kim, Y.-I.; Lee, H.-J.; Oh, D.-W.; Lee, H.-G.; Han, C.-S.; Kim, D.-W.; Park, C.-W. Preparation and Evaluation of Tacrolimus-Loaded Thermosensitive Solid Lipid Nanoparticles for Improved Dermal Distribution. *IJN* **2019**, *14*, 5381–5396. [CrossRef] [PubMed]
76. Witting, M.; Molina, M.; Obst, K.; Plank, R.; Eckl, K.M.; Hennies, H.C.; Calderón, M.; Frieß, W.; Hedtrich, S. Thermosensitive Dendritic Polyglycerol-Based Nanogels for Cutaneous Delivery of Biomacromolecules. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2015**, *11*, 1179–1187. [CrossRef]

77. Asadian-Birjand, M.; Bergueiro, J.; Rancan, F.; Cuggino, J.C.; Mutihac, R.-C.; Achazi, K.; Derneddle, J.; Blume-Peytayi, U.; Vogt, A.; Calderón, M. Engineering Thermoresponsive Polyether-Based Nanogels for Temperature Dependent Skin Penetration. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 5827–5831. [CrossRef]
78. Klouda, L.; Mikos, A.G. Thermoresponsive Hydrogels in Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 34–45. [CrossRef]
79. Brugués, A.P.; Naveros, B.C.; Calpena Campmany, A.C.; Pastor, P.H.; Saladrigas, R.F.; Lizandra, C.R. Developing Cutaneous Applications of Paromomycin Entrapped in Stimuli-Sensitive Block Copolymer Nanogel Dispersions. *Nanomedicine* **2015**, *10*, 227–240. [CrossRef] [PubMed]
80. Heilmann, S.; Küchler, S.; Wischke, C.; Lendlein, A.; Stein, C.; Schäfer-Korting, M. A Thermosensitive Morphine-Containing Hydrogel for the Treatment of Large-Scale Skin Wounds. *Int. J. Pharm.* **2013**, *444*, 96–102. [CrossRef] [PubMed]
81. Chen, P.; Zhang, H.; Cheng, S.; Zhai, G.; Shen, C. Development of Curcumin Loaded Nanostructured Lipid Carrier Based Thermosensitive in Situ Gel for Dermal Delivery. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2016**, *506*, 356–362. [CrossRef]
82. Ferreira, N.N.; Ferreira, L.M.B.; Cardoso, V.M.O.; Boni, F.I.; Souza, A.L.R.; Gremião, M.P.D. Recent Advances in Smart Hydrogels for Biomedical Applications: From Self-Assembly to Functional Approaches. *Eur. Polym. J.* **2018**, *99*, 117–133. [CrossRef]
83. Gandhi, A.; Paul, A.; Sen, S.O.; Sen, K.K. Studies on Thermoresponsive Polymers: Phase Behaviour, Drug Delivery and Biomedical Applications. *Asian J. Pharm. Sci.* **2015**, *10*, 99–107. [CrossRef]
84. Ghosh Dastidar, D.; Chakrabarti, G. Thermoresponsive Drug Delivery Systems, Characterization and Application. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems*; Elsevier: Oxford, UK, 2019; pp. 133–155. ISBN 978-0-12-814029-1.
85. Spěváček, J. NMR Investigations of Phase Transition in Aqueous Polymer Solutions and Gels. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2009**, *14*, 184–191. [CrossRef]
86. Spěváček, J.; Konefał, R.; Dybal, J.; Čadová, E.; Kovářová, J. Thermoresponsive Behavior of Block Copolymers of PEO and PNIPAm with Different Architecture in Aqueous Solutions: A Study by NMR, FTIR, DSC and Quantum-Chemical Calculations. *Eur. Polym. J.* **2017**, *94*, 471–483. [CrossRef]
87. Jadhav, S.A.; Scalarone, D.; Brunella, V.; Ugazio, E.; Sapino, S.; Berlier, G. Thermoresponsive Copolymer-Grafted SBA-15 Porous Silica Particles for Temperature-Triggered Topical Delivery Systems. *Express Polym. Lett.* **2017**, *11*, 96–105. [CrossRef]
88. Parhi, R. Development and Optimization of Pluronic® F127 and HPMC Based Thermosensitive Gel for the Skin Delivery of Metoprolol Succinate. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2016**, *36*, 23–33. [CrossRef]
89. Wang, W.; Wat, E.; Hui, P.C.L.; Chan, B.; Ng, F.S.F.; Kan, C.-W.; Wang, X.; Hu, H.; Wong, E.C.W.; Lau, C.B.S.; et al. Dual-Functional Transdermal Drug Delivery System with Controllable Drug Loading Based on Thermosensitive Poloxamer Hydrogel for Atopic Dermatitis Treatment. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24112. [CrossRef] [PubMed]
90. Wang, W.-Y.; Hui, P.; Wat, E.; Ng, F.; Kan, C.-W.; Lau, C.; Leung, P.-C. Enhanced Transdermal Permeability via Constructing the Porous Structure of Poloxamer-Based Hydrogel. *Polymers* **2016**, *8*, 406. [CrossRef]
91. Pelegrino, M.T.; de Araújo, D.R.; Seabra, A.B. S-Nitrosoglutathione-Containing Chitosan Nanoparticles Dispersed in Pluronic F-127 Hydrogel: Potential Uses in Topical Applications. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2018**, *43*, 211–220. [CrossRef]
92. Arafa, M.G.; El-Kased, R.F.; Elmazar, M.M. Thermoresponsive Gels Containing Gold Nanoparticles as Smart Antibacterial and Wound Healing Agents. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 13674. [CrossRef] [PubMed]
93. Pham, L.; Dang, L.H.; Truong, M.D.; Nguyen, T.H.; Le, L.; Le, V.T.; Nam, N.D.; Bach, L.G.; Nguyen, V.T.; Tran, N.Q. A Dual Synergistic of Curcumin and Gelatin on Thermal-Responsive Hydrogel Based on Chitosan-P123 in Wound Healing Application. *Biomed. Pharmacother.* **2019**, *117*, 109183. [CrossRef] [PubMed]
94. Chen, C.-C.; Fang, C.-L.; Al-Suwayeh, S.A.; Leu, Y.-L.; Fang, J.-Y. Transdermal Delivery of Selegiline from Alginate–Pluronic Composite Thermogels. *Int. J. Pharm.* **2011**, *415*, 119–128. [CrossRef]
95. Osorio-Blanco, E.R.; Rancan, F.; Klossek, A.; Nissen, J.H.; Hoffmann, L.; Bergueiro, J.; Riedel, S.; Vogt, A.; Rühl, E.; Calderón, M. Polyglycerol-Based Thermoresponsive Nanocapsules Induce Skin Hydration and Serve as a Skin Penetration Enhancer. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 30136–30144. [CrossRef]
96. Samah, N.H.A.; Heard, C.M. Enhanced in Vitro Transdermal Delivery of Caffeine Using a Temperature- and PH-Sensitive Nanogel, Poly(NIPAM-Co-AAc). *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 630–640. [CrossRef]
97. Ugazio, E.; Gastaldi, L.; Brunella, V.; Scalarone, D.; Jadhav, S.A.; Oliaro-Bosso, S.; Zonari, D.; Berlier, G.; Miletto, I.; Sapino, S. Thermoresponsive Mesoporous Silica Nanoparticles as a Carrier for Skin Delivery of Quercetin. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511*, 446–454. [CrossRef]
98. Gerecke, C.; Edlich, A.; Giulbudagian, M.; Schumacher, F.; Zhang, N.; Said, A.; Yealland, G.; Lohan, S.B.; Neumann, F.; Meinke, M.C.; et al. Biocompatibility and Characterization of Polyglycerol-Based Thermoresponsive Nanogels Designed as Novel Drug-Delivery Systems and Their Intracellular Localization in Keratinocytes. *Nanotoxicology* **2017**, *11*, 267–277. [CrossRef] [PubMed]
99. Lin, S.-Y.; Chen, K.-S.; Run-Chu, L. Design and Evaluation of Drug-Loaded Wound Dressing Having Thermoresponsive, Adhesive, Absorptive and Easy Peeling Properties. *Biomaterials* **2001**, *22*, 2999–3004. [CrossRef]
100. Lopez, V.C.; Raghavan, S.L.; Snowden, M.J. Colloidal Microgels as Transdermal Delivery Systems. *React. Funct. Polym.* **2004**, *58*, 175–185. [CrossRef]
101. Haddow, P.; McAuley, W.J.; Kirton, S.B.; Cook, M.T. Poly(N-Isopropyl Acrylamide)–Poly(Ethylene Glycol)–Poly(N-Isopropyl Acrylamide) as a Thermoreversible Gelator for Topical Administration. *Mater. Adv.* **2020**, *1*, 371–386. [CrossRef]

102. op 't Veld, R.C.; van den Boomen, O.I.; Lundvig, D.M.S.; Bronkhorst, E.M.; Kouwer, P.H.J.; Jansen, J.A.; Middelkoop, E.; Von den Hoff, J.W.; Rowan, A.E.; Wagener, F.A.D.T.G. Thermosensitive Biomimetic Polyisocyanopeptide Hydrogels May Facilitate Wound Repair. *Biomaterials* **2018**, *181*, 392–401. [CrossRef]
103. Indulekha, S.; Arunkumar, P.; Bahadur, D.; Srivastava, R. Thermoresponsive Polymeric Gel as an On-Demand Transdermal Drug Delivery System for Pain Management. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *62*, 113–122. [CrossRef]
104. Zavgorodnya, O.; Carmona-Moran, C.A.; Kozlovskaya, V.; Liu, F.; Wick, T.M.; Kharlampieva, E. Temperature-Responsive Nanogel Multilayers of Poly(N-Vinylcaprolactam) for Topical Drug Delivery. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *506*, 589–602. [CrossRef]
105. Liu, M.; Chen, W.; Zhang, X.; Su, P.; Yue, F.; Zeng, S.; Du, S. Improved Surface Adhesion and Wound Healing Effect of Madecassoside Liposomes Modified by Temperature-Responsive PEG-PCL-PEG Copolymers. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *151*, 105373. [CrossRef] [PubMed]
106. Wang, X.; Hu, H.; Yang, Z.; He, L.; Kong, Y.; Fei, B.; Xin, J.H. Smart Hydrogel-Functionalized Textile System with Moisture Management Property for Skin Application. *Smart Mater. Struct.* **2014**, *23*, 125027. [CrossRef]
107. Asadian-Birjand, M.; Sousa-Herves, A.; Steinhilber, D.; Cuggino, J.C.; Calderon, M. Functional Nanogels for Biomedical Applications. *CMC* **2012**, *19*, 5029–5043. [CrossRef]
108. Calderon, M.; Quadir, M.A.; Sharma, S.K.; Haag, R. Dendritic Polyglycerols for Biomedical Applications. *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 190–218. [CrossRef]
109. Wadajkar, A.S.; Koppolu, B.; Rahimi, M.; Nguyen, K.T. Cytotoxic Evaluation of N-Isopropylacrylamide Monomers and Temperature-Sensitive Poly(N-Isopropylacrylamide) Nanoparticles. *J. Nanopart Res.* **2009**, *11*, 1375–1382. [CrossRef]
110. Lutz, J.-F.; Akdemir, Ö.; Hoth, A. Point by Point Comparison of Two Thermosensitive Polymers Exhibiting a Similar LCST: Is the Age of Poly(NIPAM) Over? *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13046–13047. [CrossRef]
111. Lutz, J.-F.; Hoth, A. Preparation of Ideal PEG Analogues with a Tunable Thermosensitivity by Controlled Radical Copolymerization of 2-(2-Methoxyethoxy)Ethyl Methacrylate and Oligo(Ethylene Glycol) Methacrylate. *Macromolecules* **2006**, *39*, 893–896. [CrossRef]
112. Thomas, A.; Müller, S.S.; Frey, H. Beyond Poly(Ethylene Glycol): Linear Polyglycerol as a Multifunctional Polyether for Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 1935–1954. [CrossRef] [PubMed]
113. Giulbudagian, M.; Yealland, G.; Hönzke, S.; Edlich, A.; Geisendörfer, B.; Kleuser, B.; Hedtrich, S.; Calderón, M. Breaking the Barrier—Potent Anti-Inflammatory Activity Following Efficient Topical Delivery of Etanercept Using Thermoresponsive Nanogels. *Theranostics* **2018**, *8*, 450–463. [CrossRef] [PubMed]
114. Giulbudagian, M.; Rancan, F.; Klossek, A.; Yamamoto, K.; Jurisch, J.; Neto, V.C.; Schrade, P.; Bachmann, S.; Rühl, E.; Blume-Peytavi, U.; et al. Correlation between the Chemical Composition of Thermoresponsive Nanogels and Their Interaction with the Skin Barrier. *J. Control Release* **2016**, *243*, 323–332. [CrossRef] [PubMed]
115. Kozlovskaya, V.; Kharlampieva, E. Self-Assemblies of Thermoresponsive Poly(*N*-Vinylcaprolactam) Polymers for Applications in Biomedical Field. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2020**, *2*, 26–39. [CrossRef]
116. Vihola, H.; Laukkanen, A.; Valtola, L.; Tenhu, H.; Hirvonen, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers Poly(N-Isopropylacrylamide), Poly(N-Vinylcaprolactam) and Amphiphilically Modified Poly(N-Vinylcaprolactam). *Biomaterials* **2005**, *26*, 3055–3064. [CrossRef] [PubMed]
117. Alexandridis, P.; Alan Hatton, T. Poly(Ethylene Oxide)-Poly(Propylene Oxide)-Poly(Ethylene Oxide) Block Copolymer Surfactants in Aqueous Solutions and at Interfaces: Thermodynamics, Structure, Dynamics, and Modeling. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **1995**, *96*, 1–46. [CrossRef]
118. Bej, R.; Achazi, K.; Haag, R.; Ghosh, S. Polymersome Formation by Amphiphilic Polyglycerol-b-Polydisulfide-b-Polyglycerol and Glutathione-Triggered Intracellular Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2020**, *21*, 3353–3363. [CrossRef]
119. Jiang, Z.; Liu, H.; He, H.; Ribbe, A.E.; Thayumanavan, S. Blended Assemblies of Amphiphilic Random and Block Copolymers for Tunable Encapsulation and Release of Hydrophobic Guest Molecules. *Macromolecules* **2020**, *53*, 2713–2723. [CrossRef]
120. Jiang, Z.; Thayumanavan, S. Disulfide–Containing Macromolecules for Therapeutic Delivery. *Isr. J. Chem.* **2020**, *60*, 132–139. [CrossRef]
121. Kuppusamy, P.; Li, H.; Ilangovan, G.; Cardounel, A.J.; Zweier, J.L.; Yamada, K.; Krishna, M.C.; Mitchell, J.B. Noninvasive Imaging of Tumor Redox Status and Its Modification by Tissue Glutathione Levels. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 307–312.
122. Rao, N.V.; Ko, H.; Lee, J.; Park, J.H. Recent Progress and Advances in Stimuli-Responsive Polymers for Cancer Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 110. [CrossRef] [PubMed]
123. Wen, H. Redox Sensitive Nanoparticles with Disulfide Bond Linked Sheddable Shell for Intracellular Drug Delivery. *Med. Chem.* **2014**, *4*. [CrossRef]
124. Van Gheluwe, L.; Buchy, E.; Chourpa, I.; Munnier, E. Three-Step Synthesis of a Redox-Responsive Blend of PEG–Block–PLA and PLA and Application to the Nanoencapsulation of Retinol. *Polymers* **2020**, *12*, 2350. [CrossRef]
125. Kim, S.-E.; Lee, P.W.; Pokorski, J.K. Biologically Triggered Delivery of EGF from Polymer Fiber Patches. *ACS Macro Lett.* **2017**, *6*, 593–597. [CrossRef]
126. Bawa, P.; Pillay, V.; Choonara, Y.E.; du Toit, L.C. Stimuli-Responsive Polymers and Their Applications in Drug Delivery. *Biomed. Mater.* **2009**, *4*, 022001. [CrossRef] [PubMed]
127. Im, J.S.; Bai, B.C.; Lee, Y.-S. The Effect of Carbon Nanotubes on Drug Delivery in an Electro-Sensitive Transdermal Drug Delivery System. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1414–1419. [CrossRef]

128. Oktay, S.; Alemdar, N. Electrically Controlled Release of 5-Fluorouracil from Conductive Gelatin Methacryloyl-Based Hydrogels: Electrically Controlled Release of 5-Fluorouracil from Conductive Gelatin Methacryloyl-Based Hydrogels. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 46914. [CrossRef]
129. Hu, W.; Qiu, L.; Cheng, L.; Hu, Q.; Liu, Y.; Hu, Z.; Chen, D.; Cheng, L. Redox and PH Dual Responsive Poly(Amidoamine) Dendrimer-Poly(Ethylene Glycol) Conjugates for Intracellular Delivery of Doxorubicin. *Acta Biomater.* **2016**, *36*, 241–253. [CrossRef] [PubMed]
130. Lurie, D.; Mader, K. Monitoring Drug Delivery Processes by EPR and Related Techniques—Principles and Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1171–1190. [CrossRef] [PubMed]
131. Gao, Y.; Wang, X.; Chen, S.; Li, S.; Liu, X. Acute Skin Barrier Disruption with Repeated Tape Stripping: An in Vivo Model for Damage Skin Barrier. *Skin Res. Technol.* **2013**, *19*, 162–168. [CrossRef] [PubMed]
132. Larese Filon, F.; Mauro, M.; Adami, G.; Bovenzi, M.; Crosera, M. Nanoparticles Skin Absorption: New Aspects for a Safety Profile Evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *72*, 310–322. [CrossRef] [PubMed]
133. Roberts, M.; Mohammed, Y.; Pastore, M.; Namjoshi, S.; Yousef, S.; Alinaghi, A.; Haridass, I.; Abd, E.; Leite-Silva, V.; Benson, H.; et al. Topical and Cutaneous Delivery Using Nanosystems. *J. Control Release* **2017**, *247*, 86–105. [CrossRef] [PubMed]
134. Ramanunny, A.K.; Wadhwa, S.; Gulati, M.; Singh, S.K.; Kapoor, B.; Dureja, H.; Chellappan, D.K.; Anand, K.; Dua, K.; Khursheed, R.; et al. Nanocarriers for Treatment of Dermatological Diseases: Principle, Perspective and Practices. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *890*, 173691. [CrossRef] [PubMed]
135. Pei, Y.; Chen, J.; Yang, L.; Shi, L.; Tao, Q.; Hui, B.; Li, J. The Effect of PH on the LCST of Poly(N-Isopropylacrylamide) and Poly(N-Isopropylacrylamide-Co-Acrylic Acid). *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2004**, *15*, 585–594. [CrossRef]
136. Dancik, Y.; Kichou, H.; Eklouh-Molinier, C.; Soucé, M.; Munnier, E.; Chourpa, I.; Bonnier, F. Freezing Weakens the Barrier Function of Reconstructed Human Epidermis as Evidenced by Raman Spectroscopy and Percutaneous Permeation. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 1041. [CrossRef]
137. Neupane, R.; Boddu, S.H.S.; Renukuntla, J.; Babu, R.J.; Tiwari, A.K. Alternatives to Biological Skin in Permeation Studies: Current Trends and Possibilities. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 152. [CrossRef] [PubMed]
138. Kazem, S.; Linssen, E.C.; Gibbs, S. Skin Metabolism Phase I and Phase II Enzymes in Native and Reconstructed Human Skin: A Short Review. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 1899–1910. [CrossRef] [PubMed]
139. Huet, F.; Severino-Freire, M.; Chéret, J.; Gouin, O.; Praneuf, J.; Pierre, O.; Misery, L.; Le Gall-Ianotto, C. Reconstructed Human Epidermis for in Vitro Studies on Atopic Dermatitis: A Review. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *89*, 213–218. [CrossRef] [PubMed]

PARTIE 2 : Développement d'un nanosystème stimuli-sensible pour une application topique

Introduction

1. Intérêt du stimulus redox en pharmaceutique et cosmétique

Un grand nombre de fonctions cellulaires sont régies par la situation oxydo-réductrice du milieu où elles se déroulent. Il est établi que le potentiel redox des compartiments intracellulaires est significativement supérieur à celui de la matrice extracellulaire (10-100 fois plus réductrice) (Jones et al., 2000). De plus, il est bien connu que les cellules cancéreuses possèdent des microenvironnements intracellulaires différents, notamment un milieu réducteur dans le cytoplasme, en raison notamment de l'élévation du niveau de glutathion (GSH) (Yang and Zhao, 2019). Il est également bien établi que lors d'une aggression ou d'une inflammation, on a la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'autres oxydants, provoquant un déséquilibre oxydatif (stress). L'apparition de ROS induit souvent une adaptation redox des cellules pour se défendre, conduisant à une régulation à la hausse du GSH et d'autres molécules antioxydantes.

Des SDDS nanométriques sensibles à cette élévation du GSH ont d'ores et déjà été développés pour déclencher la libération d'anticancéreux spécifiquement sur le site tumoral, limitant ainsi les effets indésirables associés aux traitements conventionnels (Kuppusamy et al., 2002; Rao et al., 2018). Plusieurs stratégies peuvent être envisagées concernant le développement de SDDS sensibles à l'élévation du niveau de GSH pour une application topique :

i) Libération contrôlée dans les cellules cancereuses (cancer de la peau) ;
ii) Libération contrôlée suite à un passage cutanée transcellulaire du SDDS ;
iii) Libération contrôlée suite à une agression cutanée / inflammation.

2. Les liaisons sensibles au potentiel redox des cellules

Pour développer des nanomatériaux sensibles au potentiel redox, il faut y insérer des liaisons sensibles à l'oxydation ou la réduction. En présence d'un agent oxydant, les groupements thioéther (-S-) s'oxydent en un sulfoxyde ou sulfone hydrophile (Luo et al., 2016a). En présence d'un agent réducteur, les liaisons disulfures (-SS-) sont réduites en groupe thiols -SH (Chen et al., 2012; Luo et al., 2016b; B. Sun et al., 2018; H. Sun et al., 2018; Sun et al., 2011).

La liaison disulfure (-SS-) est le lien sensible à la réduction le plus utilisé pour préparer des nanosystèmes sensibles à l'élévation du GSH dans les cellules cancéreuses (Rao et al., 2018). En effet, cette liaison peut être scindée spécifiquement dans un environnement réducteur de la cellule alors qu'elle est stable dans un environnement oxydant en dehors de la cellule (Li et al., 2010). Cette réduction du pont disulfure aboutit alors à la destabilisation du système et au relargage de l'actif.

La liaison disulfure peut être localisée à différents endroits: elle peut faire le lien entre deux copolymères pour former un copolymère sensible aux stimuli (Jia et al., 2013; Tong et al., 2013), elle peut faire le lien entre

le polymère et le médicament pour synthétiser un conjugué redox sensible (Li et al., 2011), ou elle peut être située dans chaque motif répétitif d'un polymère (Han et al., 2015; Xu et al., 2015). Les nanomédicaments polymères sont généralement divisés en deux catégories ; 1. un conjugué polymère-médicament pour une demi-vie et une biodisponibilité accrues, et 2. une application à libération contrôlée avec une architecture polymère dégradable (Bobo et al. 2016).

3. Les systèmes sensibles au potentiel redox et leurs applications

3.1. Les systèmes lipidiques

Du fait de la composition lipidique de la peau, les liposomes sont largement utilisés dans le domaine des cosmétiques. Mais très peu d'études sont axées sur le développement de systèmes lipidiques intelligents pour une application cutanée. Une des premières études fut celle de Zalipsky *et al*. où il a été développé des lipopolymères possédant un pont disulfure entre le poly(ethylene glycol) et le lipide (distéaroylphosphatidyléthanolamine (DSPE)). Ce système est alors clivable par la cystéine et, à la suite de cette réaction, le lipide est régénéré sous sa forme naturelle non modifiée et récupère sa bioactivité (Zalipsky et al., 1999). Mavuso *et al*. ont synthétisé un système nanoliposomale sensible à la fois à une diminution du pH et à une élévation du niveau de GSH, en vue d'une administration transdermique de médicaments (Mavuso et al., 2018).

3.2. Les systèmes polymères

Les systèmes stimuli-sensibles à base de polymères sont les systèmes les plus décrits dans la littérature. Les systèmes polymères sensibles à une élévation du niveau réducteur (par exemple le GSH) peuvent être à base d'ingrédients naturels ou synthétiques. Le Tableau 2 compile des études récemment publiées concernant le développement de nanosystèmes sensibles à une variation du potentiel réducteur des cellules.

Tableau 2 : Liste non exhaustive d'études récemment publiées concernant le développement de nanosystèmes sensibles à une élévation du niveau réducteur

Polymères	Type de nanosystèmes	Localisation du pont disulfure	Objectifs	Références
Dibloc AH-PCL	Nanoparticules	Dans la coque de l'AH, réticulée avec de la 2-(pyridyldithio)-éthylamine (PDA)	Améliorer les performances thérapeutique de la doxorubicine	(Han et al., 2015)
Tribloc PEG-*b*-polycarbonate-*b*-PEG	Nanomicelles	Dans le bloc hydrophobe polycarbonate	Vecteur de médicaments anticancéreux pour des applications cliniques	(Xu et al., 2015)
Heparosan (polysaccharides)	Micelles	Situé dans chaque motif répétitif du polymère	Traitement du cancer du laryngopharynx	(C. Sun et al., 2018)
Tribloc PEG-PLA-PCL	Polymersomes	Entre le PEG et le PLA	Traitement de l'amnésie	(Goyal et al., 2018)
Multibloc PEG-PLA-PEI-PLA-PEG	Nanomicelles	Entre chaque blocs	Traitement du cancer	(Liu et al., 2019)

AH : Acide hyaluronique ; PCL : polycaprolactone ; PEG : polyéthylène glycol ; PLA : acide polylactique ; PEI : Polyethylenimine

PARTIE 2 : Développement d'un nanosystème stimuli-sensible pour une application topique

Dans la suite de cette partie, nous nous sommes focalisés sur le polymère PEG-*b*-PLA, pour plusieurs raisons. L'acide polylactique (PLA) est un bio-polyester synthétique, linéaire et aliphatique, non toxique et biodégradable. Le PLA, approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, a prouvé son intérêt dans l'encapsulation de médicaments hydrophobes. Le polyéthylène glycol (PEG), quant à lui, présente de nombreux avantages tels qu'une bonne hydrophilie, une flexibilité, une antiphagocytose contre les macrophages et la biocompatibilité. Le PLA et le PEG étant approuvés par les autorités réglementaires pharmaceutiques et cosmétiques, la synthèse de nanosystèmes de PEG-*b*-PLA et leurs applications dans la délivrance de médicaments ont été largement décrites dans la littérature. En effet, la copolymérisation du PLA et du PEG (PEG-*b*-PLA) peut augmenter la charge médicamenteuse, réduire l'effet d'éclatement et prolonger le temps de séjour *in vivo* des médicaments (Xiao et al., 2010). Le PEG confère aux nanosystèmes à base de PEG-*b*-PLA une bonne stabilité en suspension aqueuse grâce à son hydrophilie et son encombrement stérique, et la plupart du temps aucun ajout de tensioactif n'est nécessaire. Bien que non intrinsèquement dégradable, le PEG est totalement éliminé de l'organisme par filtration rénale, après dégradation des unités PLA. Différents types d'association du PEG avec le PLA ont été décrits dans la littérature : copolymères diblocs AB, triblocs de type ABA ou BAB, ou encore sous forme d'étoile.

Le développement de polymères mPEG-*b*-PLA sensibles à la réduction a déjà été décrit dans la littérature pour le domaine pharmaceutique, en particulier pour la voie injectable. Cependant, **les synthèses décrites sont parfois longues, complexes, ou font intervenir des liaisons dites faibles** (ester notamment) (Fuoco et al., 2017; Goyal et al., 2018; Song et al., 2011). Le copolymère mPEG-*b*-PLA ayant déjà fait ses preuves dans le domaine dermo-cosmétique (Gabriel et al., 2016; Lalloz et al., 2019; Laredj-Bourezg et al., 2015), il a été question de développer une nouvelle synthèse permettant l'incorporation d'un pont disulfure (-SS-) entre le mPEG et le PLA (mPEG-SS-PLA). Une fois la synthèse mise au point et le polymère synthétisé, on pourra développer des nanosystèmes mPEG-SS-PLA intelligents pour une éventuelle application topique. Plusieurs stratégies de synthèses du mPEG-SS-PLA ont été explorées et exposées dans le Chapitre 1 qui va suivre.

Chapitre 1 : Voies explorées pour la synthèse du polymère mPEG-SS-PLA

1. Stratégie 1 – utilisation de polymères commerciaux et insertion d'un bras espaceur -SS-

Dans cette première stratégie, il était question d'utiliser des polymères PEG et PLA commerciaux afin d'éviter leur synthèse et les difficultés qui pourraient être associées telles que la maîtrise des masses molaires d'un lot à l'autre ou encore les étapes de purifications qui peuvent être longues et coûteuses lorsqu'il s'agit de polymères. Le PEG à terminaison méthoxy (H_3C-O-), appelé mPEG, est souvent utilisé dans la synthèse de copolymères car le groupe méthoxy est inerte dans la plupart des conditions de réactions.

Le développement de stratégies de synthèse se fait en général par une analyse rétrosynthétique de la molécule-cible qui est ici du mPEG-SS-PLA. Concernant la première stratégie de synthèse, elle a été inspirée par les travaux de Xue *et al.* publiés en 2016 (Xue et al., 2016). Elle est schématisée dans la Figure 4 et la synthèse associée a été initiée par une stagiaire du laboratoire.

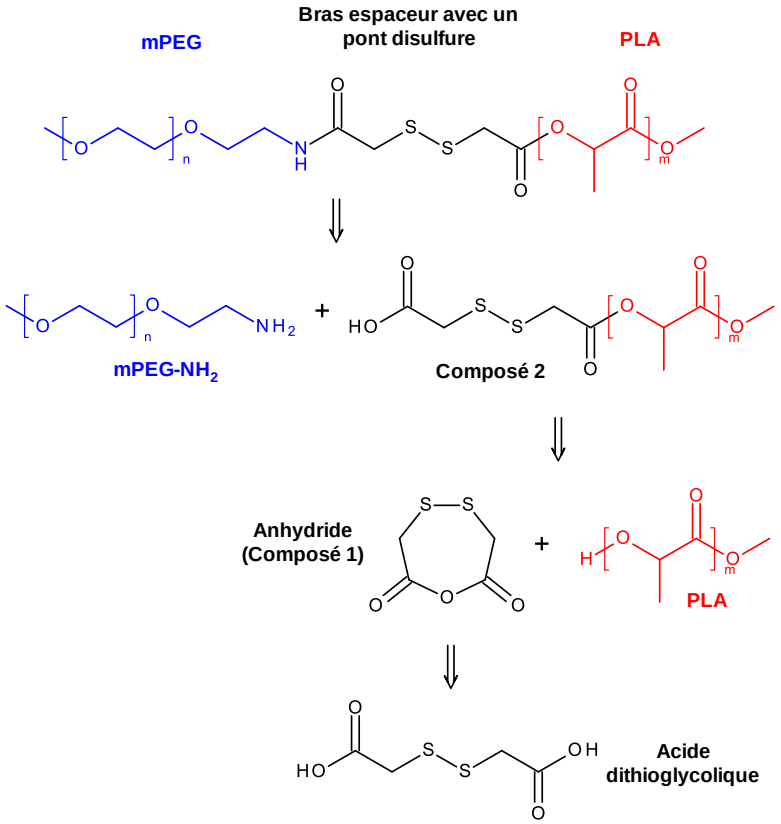


Figure 4: Analyse rétrosynthétique de la Stratégie 1 pour synthétiser le copolymère mPEG-SS-PLA

Brièvement, pour obtenir du mPEG-SS-PLA, la stratégie était tout d'abord de convertir l'acide dithioglycolique en l'anhydride correspondant (composé 1) en présence d'anhydride acétique comme agent de déshydratation. Ensuite, le composé 1 réagi avec du PLA commercial (poids moléculaire de 20 kDa) pour obtenir le composé 2 avec de la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) comme catalyseur. Enfin, le composé mPEG-SS-PLA peut s'obtenir par réaction de couplage entre le PEG-NH_2 commercial (poids moléculaire de

5 kDa) et le PLA avec le bras espaceur de type dithioglycolique (composé 2). Malheureusement, cette synthèse s'est révélée non concluante du fait de la difficulté à produire l'anhydride (composé 1). En effet, celui-ci se dégrade rapidement lors de la phase d'évaporation pour donner une huile noirâtre dont nous n'avons pas réussi à analyser la composition. Cette dégradation semble être due à la chaleur.

2. Stratégie 2

Dans cette stratégie, ainsi que la troisième qui suivra, le PLA sera produit par nos soins.

2.1. Polymérisation du lactide - généralités

Le copolymère mPEG-*b*-PLA peut être synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle (ROP pour *Ring-Opening Polymerization*) entre l'extrémité hydroxyle du mPEG et le lactide (Figure 5). Lors de la ROP, la longueur de la chaîne polymère PLA pourra être contrôlée en changeant la proportion de monomère (lactide) et d'initiateur (ici, mPEG).

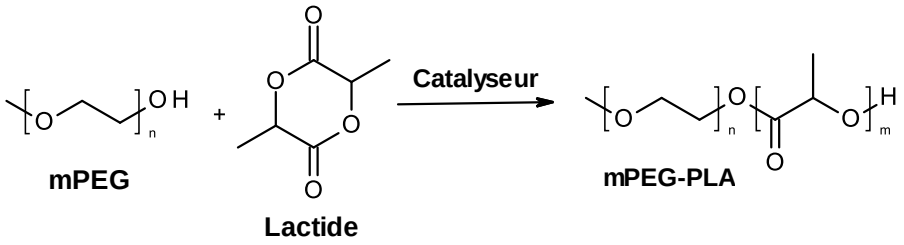


Figure 5: Schéma de la synthèse du mPEG-b-PLA

L'architecture du polymère est déterminée selon la composition stéréochimique. En effet, l'unité répétitive du PLA contient un centre de symétrie dont la configuration spatiale peut être L(S) ou D(R) ; avec une abondance naturelle en L(S). Trois configurations différentes peuvent être observées : LL (L-lactide), DD (D-lactide) ou DL (méso). Il faut distinguer la forme méso du mélange racémique (3,6-diméthyl-1,4-dioxane-2,5-dione, ou rac-lactide), qui est un mélange équimolaire (50:50) de D et L-Lactide.

Deux grandes familles de catalyseurs ont été développées pour la ROP du lactide : les organocatalyseurs et les complexes (organo)métalliques. Les systèmes organiques permettent la croissance de plusieurs chaines de polymères de façon simultanée et peuvent même être recyclés en fin de polymérisation. En revanche, les systèmes (organo)métalliques agissent plutôt comme des amorceurs de polymérisation, ils restent dans la grande majorité des cas liés à la chaîne de polymère en croissance.

2.1.1. Systèmes (organo)métalliques

Les systèmes (organo)métalliques sont connus pour catalyser la ROP du lactide via un mécanisme de coordination-insertion, qui comporte quatre étapes illustrées dans la Figure 6. Dans ce type de polymérisation, l'espèce active est, en général, un complexe métal-alcoolate (M-OR). Le catalyseur le plus

largement utilisé est le bis(2-éthylhéxanoate d'étain), généralement désigné sous le nom d'octanoate d'étain (II) ou encore $Sn(Oct)_2$. Le complexe métal-alcoolate (M-OR) est alors généré par addition du complexe métallique $Sn(Oct)_2$ et d'un alcool (Dijkstra et al., 2011).

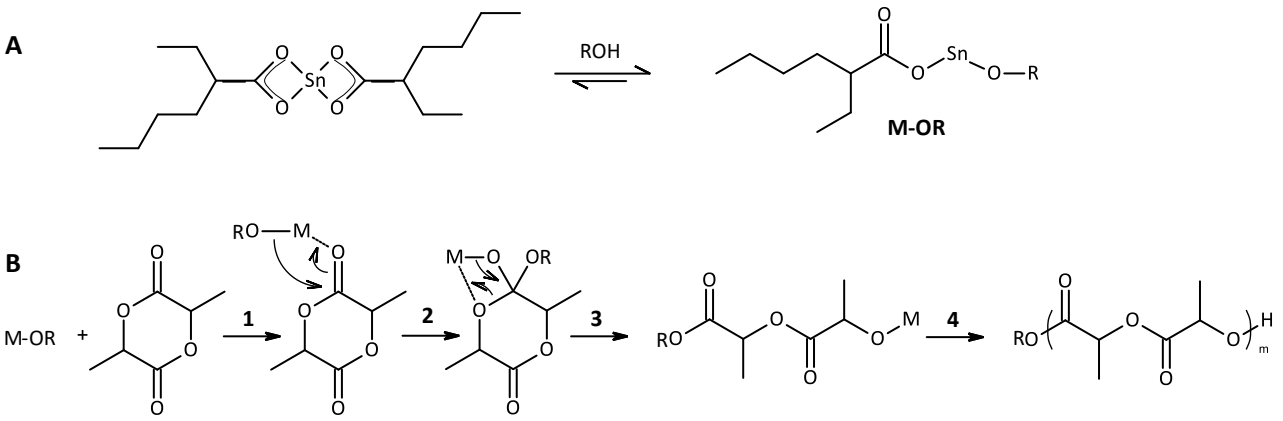


Figure 6: A. Structure de l'initiateur de $Sn(Oct)_2$ formé en présence d'un alcool. B. Mécanisme de coordination-insertion dans le cadre de la polymérisation par ouverture de cycle (ROP) : (1) coordination du monomère (lactide) avec le centre métallique, (2) liaison métal-alcoolate via une addition nucléophile, (3) ouverture du cycle du monomère via le clivage acyl-oxygène et (4) insertion continue de monomères.

2.1.2. Organocatalyseurs

L'utilisation de catalyseurs organiques en ROP du lactide est relativement récente par rapport aux systèmes métalliques (début les années 2000). Quatre modes d'action ont ainsi été mis en lumière pour la ROP du lactide catalysée par des composés organiques : activation acide, nucléophile, basique et bifonctionnelle. Ces deux derniers modes d'action seront envisagées dans ce chapitre :

- **Activation basique de l'alcool amorceur.** La ROP du lactide peut être catalysée par une base forte (type amidine, comme le 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène ou DBU), en présence d'un alcool (Lohmeijer et al., 2006). Dans ce cas ce n'est pas le monomère qui est activé mais l'alcool amorceur. Avec cette activation, la nucléophilie de l'amorceur est augmentée, et l'ouverture de cycle est donc favorisée.
- **Activation bifonctionnelle à la fois sur le monomère et sur l'amorceur.** Si une base faible est utilisée, il n'y a que des interactions faibles avec l'alcool amorceur, ce qui ne rend pas suffisante l'activation et par conséquent, il est nécessaire d'activer de façon simultanée le monomère et l'alcool. Cette double activation de type liaison hydrogène, à la fois sur le monomère et sur l'amorceur, est réalisée par de nombreux organocatalyseurs comme le 1,5,7-triazabicyclo-[4.4.0]déc-5-ène (TBD) (Simón and Goodman, 2007), ou une combinaison thiourée-amine tertiaire (Dove et al., 2005).

La Figure 7 représente un catalyseur portant un motif thiourée (catalyseur de Takemoto) ou encore des organocatalyseurs à base de guanidine et d'amidine (TBD et DBU). Contrairement au catalyseur $Sn(Oct)_2$, ces catalyseurs nécessitent des conditions douces (température ambiante, solvants organiques courants, temps de réaction réduit).

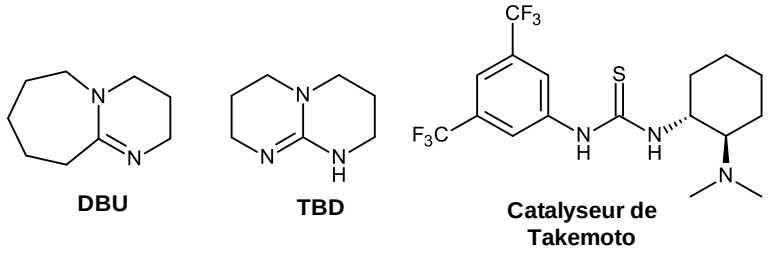


Figure 7: Catalyseurs à base d'amidine (DBU), de guanidine (TBD) et d'un motif thiourée (Takemoto)

2.2. Stratégie de synthèse 2

Ici, on rappelle que la molécule cible est le mPEG-SS-PLA ; par conséquent, la polymérisation du lactide ne se fera pas à partir de l'extrémité hydrophile du PEG mais du bras espaceur composé du pont disulfure. L'analyse rétrosynthétique de la stratégie 2 a été schématisée dans la Figure 8.

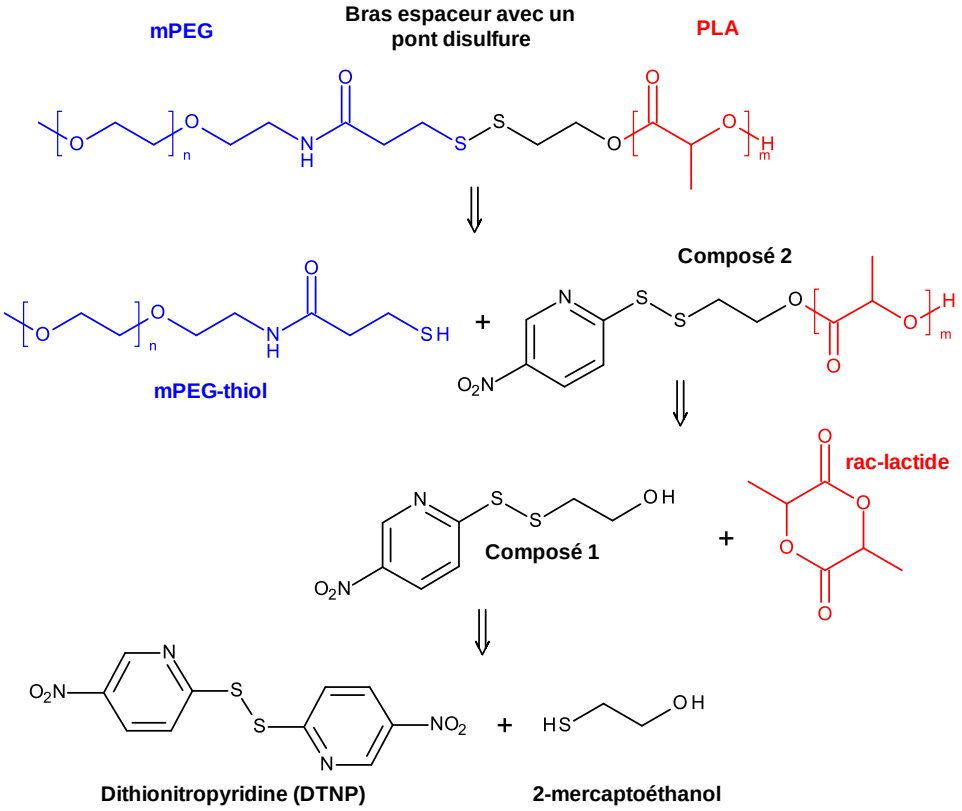


Figure 8 : Analyse rétrosynthétique de la Stratégie 2 pour synthétiser le copolymère mPEG-SS-PLA

PARTIE 2 : Développement d'un nanosystème stimuli-sensible pour une application topique

La synthèse du composé 1 est détaillée dans l'article du Chapitre 2. Concernant la synthèse du composé 2, il s'agit de polymériser le rac-lactide à partir du composé 1 par la méthode ROP. Plusieurs catalyseurs ont été testés afin de choisir le plus efficace pour la ROP du lactide à partir du composé 1 : le catalyseur métallique bien connu $Sn(Oct)_2$ ainsi que les catalyseurs organiques DBU, TBD et Takemoto.

Pour tous les catalyseurs testés, la ROP du lactide est réalisée sous azote et les conditions réactionnelles sont compilées dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Conditions réactionnelles pour produire le composé 2 de la stratégie 2

<table>
<tr><th>Type de catalyseur</th><th>Composé 1</th><th>Rac-lactide</th><th>Solvant</th><th>Catalyseur</th><th>Température</th></tr>
<tr><td>$Sn(Oct)_2$</td><td rowspan="3">28 mg (0,1 mmol)</td><td>7 g (49 mmol)</td><td>Toluène anhydre</td><td>18,7 mg (46 µmol)</td><td>120 °C</td></tr>
<tr><td>DBU</td><td rowspan="2">2,5 g (17 mmol)</td><td>THF anhydre</td><td>26 µL (0,17 mmol)</td><td>TA</td></tr>
<tr><td>TBD</td><td rowspan="2">DCM anhydre</td><td>2,3 mg (17 µmol)</td><td>TA</td></tr>
<tr><td>Takemoto</td><td>15,6 mg (0,07 mmol)</td><td>1,45 g (10 mmol)</td><td>20 mg (0,05 mmol)</td><td>TA</td></tr>
</table>

$Sn(Oct)_2$: octanoate d'étain (II) ; DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène ; TBD : 1,5,7-triazabicyclo-[4.4.0]déc-5-ène

Après 24h de réaction, chaque milieu réactionnel est analysé en RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$). La Figure 9 compile les spectres RMN ^1H (entre 1,2 et 5,6 ppm) obtenus pour chaque catalyseur. Le quadruplet aux alentours de 5,05 ppm et le doublet aux alentours de 1,67 ppm sont attribués, respectivement, aux groupements -CH (méthynes) et $-CH_3$ (méthyles) du lactide. Les gros massifs aux alentours de 5,15 ppm et 1,54 ppm correspondent eux aussi respectivement aux groupements -CH et $-CH_3$ mais cette fois du PLA. Pour les tentatives de polymérisation du lactide avec les catalyseurs DBU, TBD et Takemoto, seulement le signal du lactide est observée : δ (ppm) = 5,05 (q, $1H_2$) et 1,67 (d, $3H_1$). Concernant le catalyseur $Sn(Oct)_2$, un faible signal du PLA est observé : δ (ppm) = 5,15 (m, $1H_4$) ; 5,05 (q, $1H_2$) ; 1,67 (d, $3H_1$) ; 1,54 (m, $3H_3$). D'après ces résultats RMN ^1H, aucun de ces catalyseurs ne permet de synthétiser du PLA (ou que très peu) à partir du composé 1. De plus, quel que soit le catalyseur testé, on a observé une coloration jaune/orange du milieu réactionnel dès l'ajout de celui-ci. Après analyse par spectroscopie UV-visible, il a été établi qu'il s'agissait de la thionitropyridine (composé orange) et donc qu'il y avait rupture du pont disulfure.

N'ayant pas réussi la polymérisation du lactide à partir du composé 1, il nous est alors impossible de poursuivre cette deuxième stratégie de synthèse.

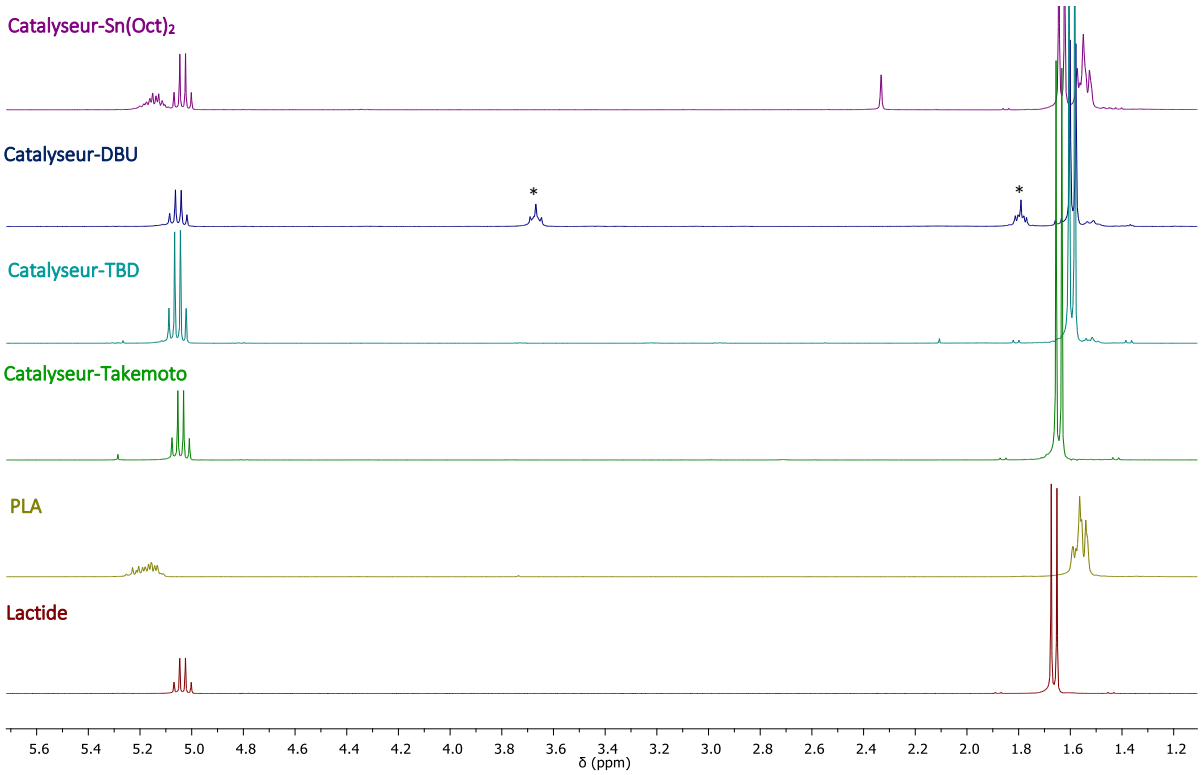


Figure 9: Résultats RMN ^{1}H de la polymérisation du lactide à partir du composé 1 et de différents types de catalyseurs. Les étoiles correspondent à du solvant résiduel (ici THF).

3. Stratégie 3 – polymérisation du lactide à partir du polymère mPEG-SS-$(CH_2)_2$-OH

L'analyse rétrosynthétique de la stratégie 3 a été schématisée dans la Figure 10.

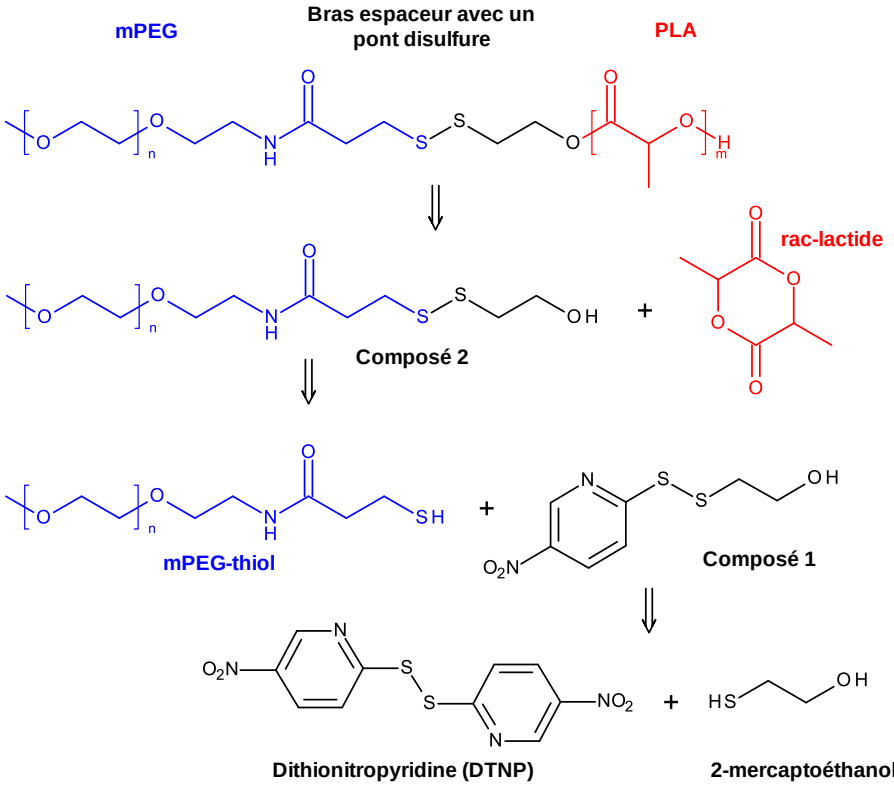


Figure 10: Analyse rétrosynthétique de la Stratégie 3 pour synthétiser le copolymère mPEG-SS-PLA

PARTIE 2 : Développement d'un nanosystème stimuli-sensible pour une application topique

Comme pour la deuxième stratégie, la première étape consiste en la synthèse du composé 1. La deuxième étape consiste en un échange thiol-disulfure entre le composé 1 et le mPEG-thiol à 5 000 g/mol (O-[2-(3-Mercaptopropionylamino)ethyl]-O'-methylpolyethylene glycol). Cette étape est intéressante car elle permettra notamment, de par le relargage de la thionitropyridine (λmax = 387 nm), d'évaluer le rendement de la réaction en spectroscopie UV-VIS. Une fois le composé 2 synthétisé et purifié par dialyse contre de l'eau distillée, il est utilisé en tant qu'amorceur de la ROP du lactide pour obtenir *in fine* le copolymère mPEG-SS-PLA. Les conditions de réaction de cette dernière étape ont été inspirées de la publication de Mackiewicz (Mackiewicz et al., 2014). Au vu des conditions opératoires et notamment de la purification par dialyse du composé 2, des traces d'eau sont attendues lors du lancement de la dernière étape ; la polymérisation du lactide. Par conséquent, en parallèle de l'amorceur qu'est le groupement hydroxyle du composé 2, l'eau participera également à la ROP du lactide. Ceci entraînera donc la synthèse d'un mélange de polymères : mPEG-SS-PLA (qualifié de stimuli-sensible) et du PLA (qualifié de neutre), avec des tailles en PLA quasi similaires. Le chapitre 2 qui va suivre se concentre sur cette dernière stratégie, qui a abouti à la rédaction de deux articles scientifiques.

Chapitre 2 : Synthèse en trois étapes de mélanges stimuli-sensibles polymères (mPEG-SS-PLA/PLA)

Lorsque la stratégie de synthèse 3, en 3 étapes, rapportée dans les articles qui suivent a été envisagée, il a été choisi de ne pas travailler dans des conditions plus strictes que ce qui pourrait être reproduit dans l'industrie cosmétique notamment à cause de contraintes économiques. Lorsqu'il a fallu mettre en place des étapes de purification, la méthode par dialyse, économique et facile à mettre en œuvre, a été préférée à d'autres méthodes de purification faisant intervenir des solvants organiques ou des appareillages spécifiques (chromatographie d'exclusion stérique, CLHP avec collecteur de fractions, purification par précipitation, etc.). Le principal risque lié à ce choix était de ne pas être en milieu anhydre lors du lancement de la polymérisation du lactide et de générer, en plus du mPEG-SS-PLA, du PLA à partir des traces d'eau présentes. Cependant, les nanosystèmes mPEG-*b*-PLA sont généralement de type nanomicelles présentant une faible stabilité en suspension et une faible résistance à la dilution, ce qui peut limiter leur introduction dans des produits dédiés à la peau comme les crèmes ou les gels. La stabilité peut être augmentée par le mélange avec un autre polymère qui renforcera le cœur hydrophobe des nanosystèmes, par exemple du PLA. Dans ce cas, les deux polymères sont généralement synthétisés indépendamment (Dong and Feng, 2006; Sasatsu et al., 2006). L'hypothèse développée dans ce travail est que la synthèse concomitante des deux polymères en cas de présence de traces d'eau pourrait constituer un avantage pour la stabilité et l'efficacité d'encapsulation des nanosystèmes développés. Cependant, l'impact de la composition du mélange de polymères sur les propriétés physico-chimiques des nanosystèmes et la réponse au stimulus reste à évaluer.

Pour formuler les nanosystèmes, la technique de nanoprécipitation a été choisie car elle est couramment appliquée aux systèmes polymères amphiphiles et sa transposition à l'échelle industrielle ne nécessite pas d'équipements lourds spécifiques (Figure 11).

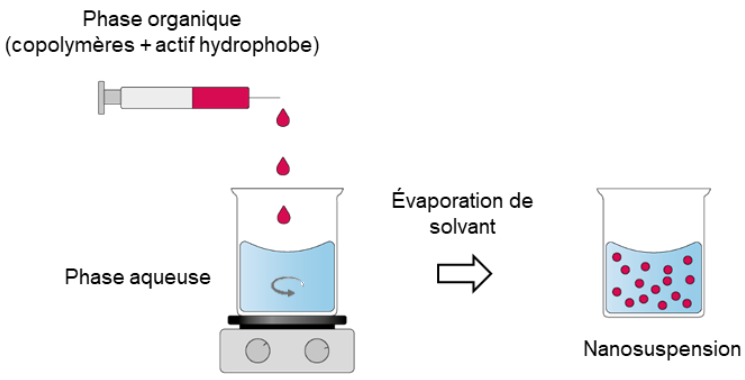


Figure 11: Technique de nanoprécipitation

Composé d'un bloc hydrophile (PEG) et d'un second hydrophobe (PLA), leur organisation micellaire en solution aqueuse induit une structure cœur/couronne. Tandis que le cœur hydrophobe permet de

solubiliser des principes actifs, la couronne hydrophile peut stabiliser le nanosystème et améliorer sa biocompatibilité tout en assurant la protection de la molécule encapsulée. Avec cette méthode, il est indispensable que l'actif et le mélange polymères soient solubles dans le solvant organique (ici l'acétone), qui doit lui-même être miscible à l'eau. Le principe de la nanoprécipitation est alors le suivant : la phase organique est injectée goutte à goutte dans la phase aqueuse, sous agitation modérée. Les ingrédients insolubles (blocs PLA et actif hydrophobe) précipitent sous forme de nanosystèmes lors de la diffusion du solvant organique vers la phase aqueuse externe. Le solvant organique est ensuite éliminé sous agitation modérée pour obtenir *in fine* une nanosuspension aqueuse.

Deux études ont été menées successivement et ont abouti à la rédaction de deux articles scientifiques. Le premier article s'intéresse à la question suivante : « Est-il possible de développer un SDDS sensible à la réduction à partir d'un mélange de polymères mPEG-SS-PLA (stimuli-sensibles) et de PLA (neutre, stabilisant) ? ». Pour cela, un premier mélange mPEG-SS-PLA/PLA, ratio molaire 1:2, a été produit et utilisé pour encapsuler du rétinol, un antioxydant hydrophobe. Son encapsulation a permis d'augmenter significativement sa concentration en milieu aqueux et de le protéger contre sa dégradation. Les résultats de fluorescence ont montré qu'une élévation de glutathion (10 mM) pourrait favoriser la déstabilisation des SDDS à base de mPEG-SS-PLA/PLA et ainsi améliorer la libération d'actifs hydrophobes. Comme tout système développé en vue d'une commercialisation sur le marché des dermo-cosmétiques, il est important de s'assurer de sa biocompatibilité. Ces nanosystèmes ont montré une faible toxicité *in vitro* sur les kératinocytes.

Après avoir prouvé qu'il était possible de produire des SDDS avec ce type de mélange, il a été question d'étudier l'impact des caractéristiques du mélange (concentrations, ratios des polymères et taille du bloc hydrophobe PLA) sur les performances du SDDS. En effet, il est établi dans la littérature que le poids moléculaire des blocs polymères ainsi que leur concentration auront un impact, *in fine*, sur les caractéristiques du nanosystème développé (Martínez Rivas et al., 2017). On peut alors se questionner sur l'impact qu'aura la taille du PLA ainsi que les concentrations de mélanges (notamment les concentrations de ponts disulfures) utilisées sur l'expression du caractère stimuli-sensible du SDDS développé. Concernant la stratégie de synthèse utilisée, il est possible de faire varier la longueur du PLA en modifiant les conditions de polymérisation du lactide. Cependant, il est difficile de reproduire de manière fiable la quantité d'eau introduite et donc de reproduire strictement le même ratio de mélange mPEG-SS-PLA/PLA. Une nouvelle question se soulève alors : « Quel est l'impact du ratio de polymères sur le développement de nanosystèmes stimuli-sensibles ? ». C'est dans ce contexte que deux autres mélanges de polymères ont été produits et utilisés pour produire des nanosystèmes. Les résultats ont été compilés dans l'article 2 et ont permis de mettre en évidence que, peu importe les mélanges testés ici, il est possible de développer des nanosystèmes stimuli-sensibles en variant les concentrations ou les longueurs de chaînes PLA. Cependant, ces nanosystèmes ne présentent pas tous la même sensibilité au stimulus.

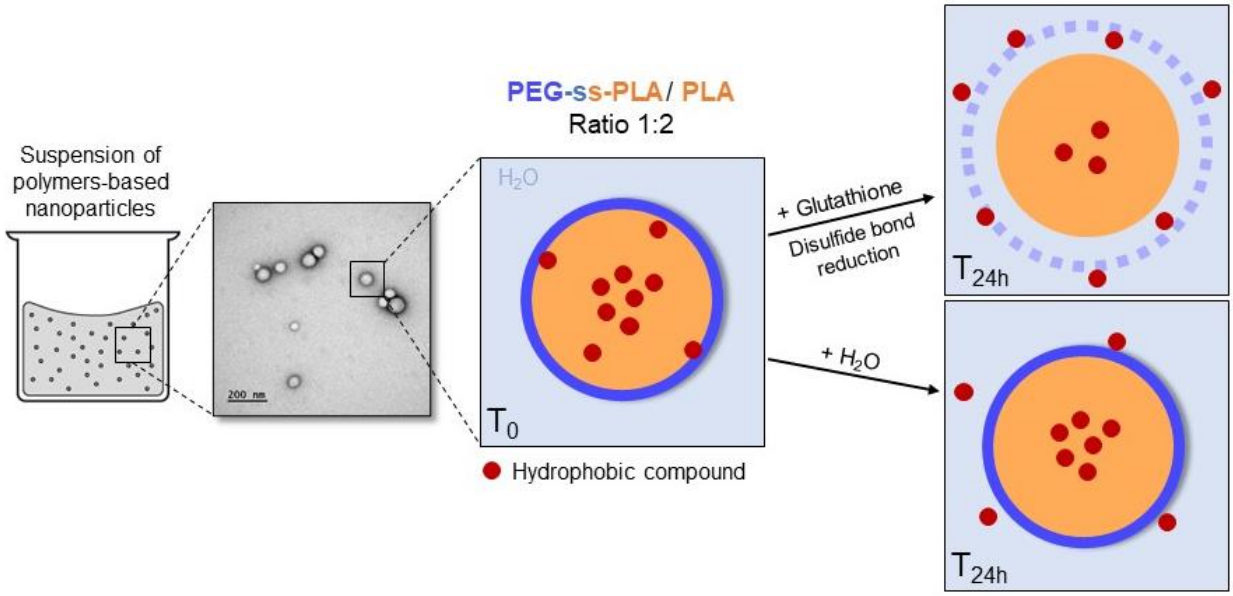
Article 1 : "Three-Step Synthesis of a Redox-Responsive Blend of PEG–block–PLA and PLA and Application to the Nanoencapsulation of Retinol"

Louise Van Gheluwe [1], Eric Buchy [2], Igor Chourpa [1] and Emilie Munnier [1]

[1] EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 Avenue Monge, 37 200 Tours, France; louise.vangheluwe@univ-tours.fr (L.V.G.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.)

[2] Laboratoires Eriger, 39 Rue des Granges Galand, 37550 Saint-Avertin, France; eric.buchy@laboratoires-eriger.com

Polymers 2020, 12, 2350. https://doi.org/10.3390/polym12102350



polymers

MDPI

Article

Three-Step Synthesis of a Redox-Responsive Blend of PEG–*block*–PLA and PLA and Application to the Nanoencapsulation of Retinol

Louise Van Gheluwe [1], Eric Buchy [2], Igor Chourpa [1] and Emilie Munnier [1,*]

[1] EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 Avenue Monge, 37 200 Tours, France; louise.vangheluwe@univ-tours.fr (L.V.G.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.)
[2] Laboratoires Eriger, 39 Rue des Granges Galand, 37550 Saint-Avertin, France; eric.buchy@laboratoires-eriger.com
* Correspondence: emilie.munnier@univ-tours.fr

Received: 14 September 2020; Accepted: 12 October 2020; Published: 14 October 2020

check for updates

Abstract: Smart polymeric nanocarriers have been developed to deliver therapeutic agents directly to the intended site of action, with superior efficacy. Herein, a mixture of poly(lactide) (PLA) and redox-responsive poly(ethylene glycol)–*block*–poly(lactide) (PEG–*block*–PLA) containing a disulfide bond was synthesized in three steps. The nanoprecipitation method was used to prepare an aqueous suspension of polymeric nanocarriers with a hydrodynamic diameter close to 100 nm. Retinol, an anti-aging agent very common in cosmetics, was loaded into these smart nanocarriers as a model to measure their capacity to encapsulate and to protect a lipophilic active molecule. Retinol was encapsulated with a high efficiency with final loading close to 10% *w/w*. The stimuli-responsive behavior of these nanocarriers was demonstrated in vitro, in the presence of L-Glutathione, susceptible to break of disulfide bond. The toxicity was low on human keratinocytes in vitro and was mainly related to the active molecule. Those results show that it is not necessary to use 100% of smart copolymer in a nanosystem to obtain a triggered release of their content.

Keywords: redox responsive PEG-*block*-PLA; nanocarriers; disulfide bond; controlled release; retinol

1. Introduction

Stimuli-responsive nanocarriers (NCs) have been designed to control the release of active molecules into the intended site of action. The contents of the nanoparticle is released only if a biological or a physical stimulus occurs. The stimulus has to be adapted to the application. For example, light-responsive, ultrasound-responsive, temperature-responsive, pH-responsive or redox-responsive nanosystems can be found in the literature [1].

Lately, a lot of efforts have been focused on the development of redox-responsive nanosystems. They could be of major interest in the treatment of cancer, as the reduction potential of cancer cells is higher than the reduction potential of healthy cells [2]. The release is then triggered in the tumor, minimizing the side effects. It is the observed case in certain skin cancers, such as melanoma [3,4]. Moreover, when skin is exposed to UV light, cells react first by activating antioxidant mechanisms: the level of glutathione (GSH) and its accompanying enzymes is dramatically increased to counteract the appearance of reactive oxygen species [5]. The increased GSH activity could favor the nanocarriers' material cleavage and thus enhance the release of hydrophobic drugs [6,7].

Different NCs engineered with redox sensitive mechanisms for drug or gene delivery have been developed already like liposomes, polymer nanoparticles, micelles, or prodrug-based delivery systems [8,9]. The disulfide bond is the most used reduction-sensitive linker to prepare redox-responsive

nanocarriers [10]. The disulfide bond can be localized in different places: it can make the link between two copolymers to form a stimulus-sensitive copolymer [11,12], it can make the link between the polymer and the drug to synthesize a redox-responsive conjugate [13], or it can be located in each repeating unit of a polymer [14,15]. In recent decades, significant efforts have been made in the development of stimuli-responsive polymers [16,17] to prepare efficient triggered release. Indeed, compared to conjugation, the synthesis of redox-responsive diblock or triblock copolymers is interesting as numerous active molecules can be encapsulated without developing a specific synthesis path for each one. Under the action of a stimulus, the copolymer disassembles into two or three parts, destabilizing the nanocarriers and leading to the release of the contents. Among the redox-responsive copolymers, the poly(ethylene glycol)–*block*–poly(lactide) (PEG–*block*–PLA) copolymer associated with a disulfide bond seems to still be the preferred iteration [6,7,18]. Indeed, both polymers PLA and PEG are approved by the pharmaceutical and cosmetic regulatory authorities. PLA is a synthetic linear aliphatic polyester that has proven its interest in the encapsulation of hydrophobic drugs [19,20]. Being biodegradable and biocompatible, it is used in various biomedical applications. PEG is a biocompatible polymer known for its hydrophilicity, flexibility, and non-toxicity. PEG confers to PEG–*block*–PLA-based nanocarriers a good stability in aqueous suspensions thanks to its hydrophilicity and sterical hindrance, and most of the time no adjunction of surfactant is necessary [21]. Moreover, PEG seems to play a positive role in the penetration of PLA-based nanosystems into the skin [22].

PEG–*block*–PLA-based nanocarriers have already proven their efficacy in the encapsulation of siRNA, active pharmaceutical or cosmetic ingredients [23–25], among which is retinol. Retinol is a low molecular weight anti-ageing agent very common in cosmetics [26]. It is highly sensitive to water, heat, oxygen and light [27–30]. Many authors work on its encapsulation to protect its integrity and increase its penetration into the skin [31–34]. NCs made of PEG–*block*–PLA copolymer showed very interesting performances for retinol delivery to the skin [34,35]. Retinol loaded PEG–*block*–PLA-based NCs displayed a significantly higher absorption into skin compared to PEG–*block*–PCL NCs, surfactant micelles, or oil solution [34]. As a powerful antioxidant molecule, it could benefit from an encapsulation in a redox-sensitive PEG–*block*–PLA to confer a triggered release in case of skin photooxidation.

Unfortunately, the syntheses of redox-responsive PEG–*block*–PLA described in the literature are multi-stage, with drastic anhydrous conditions, and time-consuming purification steps requiring specific equipment [7,18,36,37]. These constraints limit the potential interest of such delivery systems. Moreover, PEG–*block*–PLA nanocarriers are usually nanomicelles showing low physical stability in suspension and showing a low resistance to dilution, which is not compatible with the introduction into skin dedicated products like creams or gels. The stability can be increased by mixing it with another polymer that will reinforce the hydrophobic core of the nanocarriers, for example PEG–*block*–PLA mixed with PLA. In this case, both polymers are usually synthesized independently [22,38].

The objective of the present study was to prepare redox-responsive nanocarriers made of a blend of PLA and a PEG–*block*–PLA copolymer linked with a disulfide bond. Such nanocarriers should be stable in aqueous suspension but release their contents rapidly in skin undergoing oxidative stress. In order to attain this goal, the steps were (1) to prepare in as few steps as possible a redox-responsive blend of PEG–*block*–PLA and PLA; (2) to formulate retinol nanocarriers via a simple and efficient protocol. For the synthesis of the redox-responsive PEG–*block*–PLA copolymers blended with PLA, a new strategy in only three steps was developed. At the end, a redox-responsive blend of PEG–*block*–PLA and PLA was obtained and used directly, without further purification. It was chosen to work with short PLA chains in order to facilitate the release of retinol, which could be long in long-chain PLA nanocarriers despite the redox-responsive link, because of an increased affinity of retinol for the polymer [39]. To formulate the nanocarriers encapsulating retinol, the nanoprecipitation method was chosen because it is well known, fast and easy to scale up. This method is the simplest preparation method of nanocarriers as it takes place in only one step, with no need of surfactants or chlorinated solvents [40]. It leads to a narrowly dispersed particle size. The impact of GSH levels on redox-responsive release was

investigated in vitro. Finally, cytotoxicity of the nanocarriers on human keratinocytes was evaluated to ensure that they could be safely used in dermatological or cosmetic applications.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

2-mercaptoethanol, 2,2′-dithiobis(5-nitropyridine), anhydrous acetic acid, methanol, O-[2-(3-mercaptopropionylamino) ethyl]-O′-methylpolyethylene glycol (PEG-thiol, 5 kDa), 3,6-dimethyl-1, 4-dioxane-2, 5-dione (D,L-lactide), stannous 2-ethylhexanoate, dichloromethane, anhydrous toluene, tetrahydrofuran (THF), Nile red, retinol and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Dialysis membrane (molecular weight cut-off (MWCO) 2 kDa, regenerated cellulose) was purchased from BioValley (Marne La Vallée, France). L-Glutathione reduced (GSH), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), foetal bovine serum (SVF), dimethyl sulfoxide (DMSO) and penicillin/streptomycin solution were provided by Fisher Scientific (Illkirch, France). Ultrapure water was produced using a Milli-Q system, Millipore (Paris, France).

2.2. Synthesis and Characterization of Redox-Responsive (PEG–block–PLA)-Blend-(PLA)

2.2.1. Step 1: Synthesis of Ethanol, 2-[(5-Nitro-2-pyridinyl)dithio]-(Abbreviated as Compound **1**)

In a three-necked flask equipped with a stir bar, under a nitrogen atmosphere and at room temperature, 1.2 g of 2,2′-dithiobis(5-nitropyridine) (310.31 g/mol, 3.87 mmol) were solubilized in 18 mL of dichloromethane. A solution of 2-mercaptoethanol was prepared in 1.5 mL of methanol (275 µL, 78.13 g/mol, 3.87 mmol) and added to the mixture. Finally, 25 µL of anhydrous acetic acid was added. The solution turned yellow and was stirred for 24 h. The solvent was then removed under vacuum and flash chromatography (silica: 60, 0.04–0.063 mm) was carried out using 30% ethyl acetate and 70% cyclohexane to give the compound 1 (232.28 g/mol, 468.5 mg, 2.02 mmol, 52.2% yield) as a yellow solid. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 9.34 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 8.38 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 3.80 (t, 2H), 3.25 (s, 1H), 3.02 (t, 2H).

2.2.2. Step 2: Synthesis of Disulfide PEG (Abbreviated as **P1**)

In a three-necked flask equipped with a stirring bar, under a nitrogen atmosphere and at room temperature, 500 mg of PEG-thiol (5 kDa, 0.1 mmol), 71.3 mg of compound 1 (232.28 g/mol, 0.3 mmol) and 15 µL of anhydrous acetic acid were solubilized in 23 mL of methanol. The solution turned yellow and was stirred for at least 30 h. The progress of the reaction was followed with a UV-Visible spectrophotometer (Genesys 10S, Thermo Scientific, France) with the release of thionitropyridine in the reaction medium (385 nm). The solvent was then removed under vacuum and the residue was dissolved in distilled water and dialysis was performed against distilled water (regenerated cellulose, MWCO = 2 kDa). Finally, the product was freeze-dried for two days to obtain a white powder stocked at −20 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 3.87 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.64 (m, 4H), 3.46 (t, 2H), 3.40 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.37 (s, 3H), 3.00 (t, 2H, J = 7.0 Hz), 2.87 (t, 2H, J = 5.7 Hz), 2.64 (t, 2H, J = 7.0 Hz).

2.2.3. Step 3: Synthesis of Redox-Responsive Copolymer (Abbreviated as **P2**)

Appropriate amounts of pure D,L-lactide and **P1** were placed in a two-neck flask with anhydrous toluene (4.5 mL) and the mixture was degassed by bubbling nitrogen for 20 min. Under a nitrogen atmosphere, the stannous 2-ethyl-hexanoate (10 mg) was added and the reaction mixture was refluxed in an oil bath (120 °C) for 1 h. During the reaction period, the condenser was cold enough to prevent the volatilization of toluene. The toluene was then removed under reduced pressure and the residue was solubilized in a minimum of tetrahydrofuran (THF) to perform purification by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, THF). The purification of the polymers **P2** produced from the

residual lactide monomer was followed by infrared spectroscopy (Bruker Vector 22, ATR mode). After the collection and concentration of polymers under vacuum, it is solubilized in a minimum of THF and precipitated in cold water. After THF removal, freeze-drying was performed for 3 days to obtain a white powder stocked at −20 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 5.18 (m, 1H), 4.38 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 4.35 (q, 1H, J = 7.0 Hz), 3.87 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.64 (m, 4H), 3.40 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.37 (s, 3H), 2.97 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.89 (t, 2H, J = 6.7 Hz), 2.58 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 1.57 (m, 3H).

2.2.4. Characterizations

For each step, ^{1}H NMR spectra were recorded with a Bruker 300 MHz NMR spectrometer at 25 °C with $CDCl_3$ as solvent. MALDI-TOF mass spectra were acquired on a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems). Dithranol (DT; 1,8-dihydroxy-9,10-dihydroanthracen-9-one) was used as the matrix for the ionization. Laser (YAG, 355 nm) power was adapted to obtain a significant signal-to-noise ratio and a good resolution of the mass peaks.

2.3. Preparation of Polymer Nanocarriers

Polymer nanocarriers were prepared by the nanoprecipitation method, in triplicate. Briefly, 0.6 mL of a solution of the redox-responsive blends of polymers in acetone (10 mg/mL) was added dropwise to 2 mL deionized water using a syringe pump (KR Analytical, UK) with a flow rate of 0.3 mL/min and under moderate stirring. The nanocarriers were formed instantly, and the organic solvent was evaporated overnight under stirring at room temperature. Blank nanoparticles labelled with Nile red as well as retinol-loaded nanocarriers were prepared by the same method after dissolving Nile red (13 µg/mL) or retinol (1.2 mg/mL), respectively, in the polymer acetone solution. The resulting suspensions were filtered through a 0.45 µm polyether sulfone membrane filter to remove unloaded Nile red or retinol. All the procedures were performed under dark conditions to preserve the integrity of the molecules.

2.4. Characterization of Copolymer-Based Nanocarriers

The morphological examination of nanocarriers was conducted by transmission electron microscopy (TEM). The nanocarriers' aqueous suspension was deposited onto a carbon coated grid and was negatively stained using uranyl acetate (3% *w/v*). Excess water was removed by filter paper and the sample was scanned in a JEOL 1011 TEM (Peabody, MA, USA).

The mean hydrodynamic diameter (D_H) and the polydispersity index (PdI) of the nanocarriers in aqueous suspensions were measured by the dynamic light scattering (DLS) technique, using a Nanosizer apparatus (Zetasizer®, Malvern Panalytical, UK) equipped with a He-Ne laser (633 nm, scatter angle 173°). Herein, the DLS method measures nanoparticle diameter by intensity. The same instrument was also used for zeta potential measurements, but the samples were put in dedicated micro-electrophoresis cells. Each sample was diluted 1:10 with deionized water and the measurement was performed three times at a temperature of 25 °C.

2.5. Redox-Responsivity of Copolymer-Based Nanocarriers

The redox-mediated response to reduced glutathione (GSH) was evaluated by in vitro tests, using blank nanocarriers labelled with environment-sensitive fluorescent dye Nile red (NR-NCs) or retinol-loaded nanocarriers (R-NCs). Typically, the nanocarriers' suspension was diluted 1:10 with deionized water. Then, 0.5 mL of diluted suspension was mixed with 0.5 mL of GSH solution (0.04 or 20 mM) or 0.5 mL of diluted nitric acid solution to ensure the same pH. Each tube was shaken at 37 °C and Nile red (NR) or retinol (R) fluorescence was measured at predetermined time intervals (0 h, 2 h, 4 h, 8 h, and 24 h) using a spectrofluorometer (A Hitachi F-4500). The fluorescence excitation wavelength was fixed to 535 nm (NR) or 327 nm (R), and the emission fluorescence to 555–700 nm (NR) or 350–650 (R); the range was monitored. Emission and excitation slits were adjusted as function of

fluorescence intensity of the solution at t_0. To study the NR/R release as a function of time after GSH treatment, the following formula was used:

$$\%\text{ of content released at } t = \frac{\text{Fluorescence intensity } t_0 - \text{Fluorescence intensity } t}{\text{Fluorescence intensity } t_0} \times 100 \quad (1)$$

The encapsulation efficiency of retinol was measured using its absorbance (A) at 327 nm, after dissolution of the NCs in THF. Appropriate dilution of retinol-loaded nanocarriers' suspension was performed in THF and the solution was vortexed for 1 min to break down the particles and dissolve retinol. The absorbance of the resulting solution was measured in a 1 cm quartz cell placed in a Genesys 10 S (Thermo Scientific, France) UV-Vis spectrophotometer. From the absorbance values, retinol concentration was determined according to a standard calibration curve within the linear range. The encapsulation efficiency of retinol was calculated according to the following equation:

$$\text{Encapsulation Efficiency } (\%) = \frac{\text{Amount of retinol in the nanocarriers}}{\text{Feeding amount of retinol}} \times 100 \quad (2)$$

The theoretical loading was calculated by Equation (3):

$$\text{Molecule load } (\%) = \frac{\text{Determined weight of retinol}}{\text{Initial weight of copolymer}} \times 100 \quad (3)$$

Aqueous suspensions are divided into two samples and transferred into glass vials immediately after preparation and stored at 4 °C or room temperature. The chemical stability was monitored up to 1 month by drug content determination. Periodically, samples were taken and diluted with THF and analyzed with the UV-Vis spectrophotometer for residual retinol.

2.6. In Vitro Cytotoxicity Studies of Retinol-Loaded Nanocarriers

In vitro cytotoxicity of blank and retinol-loaded nanocarriers was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay on the HaCaT cell line (human keratinocytes, a kind gift from Pr. G. Weber, U1069 N2C, Tours) [41]. Cells were cultured in DMEM completed with 10% of SVF and 1% of a penicillin–streptomycin mixture. For the cytotoxicity study, cells were seeded in 96-well plates (10,000 cells/well) and incubated 24 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. Cells were then treated with increasing concentrations of blank or retinol-loaded nanocarriers (1.64×10^{-7} to 1.64×10^{-2} mg/mL in retinol) during 24 h at 37 °C. MTT solution was added to each well (0.5 mg/mL) and the cells were incubated for further 4 h at 37 °C. Then, the supernatant was discarded and DMSO was added in each well to dissolve the formazan crystals. The absorbance A at 540 nm was measured with a microplate reader (Bio-tek EL800 plate reader). Results were expressed as viability percentages as function of the retinol concentration, and compared with Student's *t*-test.

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis and Characterization of Redox-Responsive PEG–block–PLA

The redox-responsive PEG–*block*–PLA was synthesized in three steps, as described in Figure 1.

Unable to avoid the presence of traces of water after purification of **P1**, two compounds are expected at the end of step 3: redox-responsive PEG–*block*–PLA (**P2a**) and PLA (**P2b**).

The first step consists of producing an intermediate product, called compound 1, with a disulfide linkage. Its composition and structure were confirmed by ^{1}H NMR as shown in Figure 2.

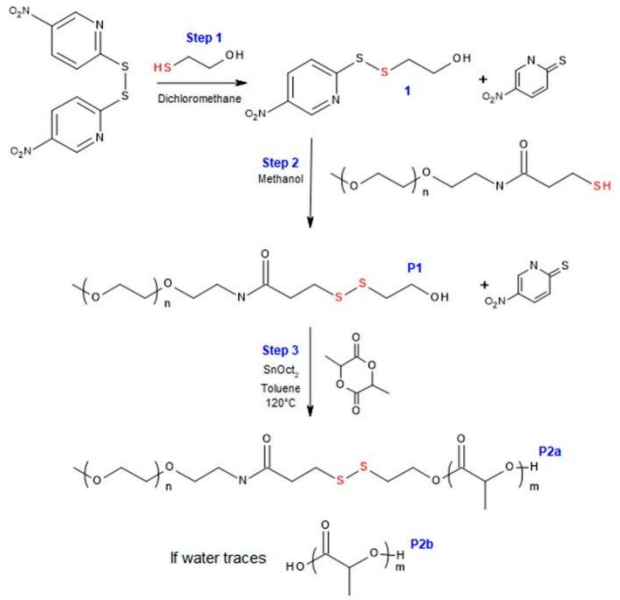


Figure 1. Synthesis of the amphiphilic redox-responsive poly(ethylene glycol)–*block*–poly(lactide) (PEG–*block*–PLA) in three steps.

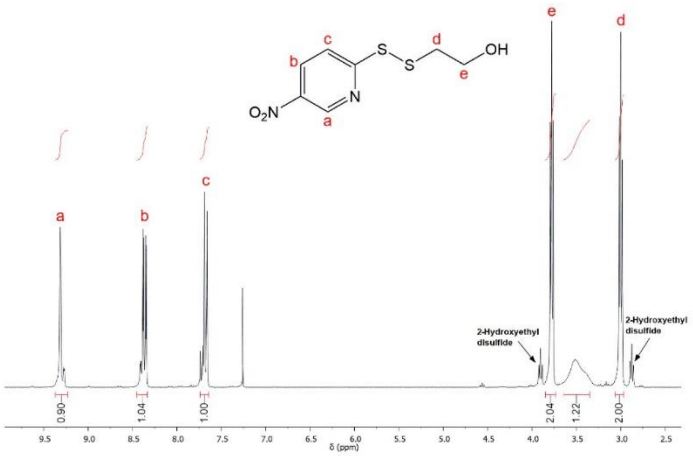


Figure 2. ^{1}H NMR spectrum of compound 1 (step 1, $CDCl_3$, 25 °C).

The solvent peak of $CDCl_3$ was found at 7.26 ppm. Peaks at 2.87 and 3.90 ppm result from the oxidation of 2-mercaptoethanol to 2-Hydroethyldisulfide. Peaks at 3.8 and 3.02 ppm were assignable to the methylene (–CH_2–) protons of –CH_2–OH (e) and –S–CH_2– (d), respectively.

The second step consists of thiol–disulfide exchange between compound 1 and PEG-thiol in order to obtain the polymer **P1**. The reaction yield was established by following the release of thionitropyridine from compound 1 in the reaction medium with a UV-Vis spectrophotometer (λ_{max} = 385 nm). After approximately 30 h of reaction, the yield was close to 100%. At this stage, the elimination of the remaining quantity of compound 1 is crucial because the next step is the polymerization of PLA, possible from a hydroxyl group. To purify the hydrophilic polymer **P1**,

a common laboratory technique was used, the dialysis method. This method is vulnerable to the emergence of traces of water in the reaction medium that would initiate the synthesis of PLA. The composition and the structure of the purified **P1** product were investigated with NMR and MALDI-TOF mass spectrometry. Figure 3 shows ^{1}H NMR spectrum of the modified PEG produced.

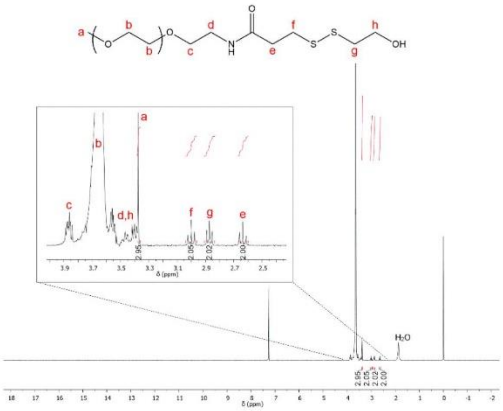


Figure 3. ^{1}H NMR spectrum of the modified polymer **P1** (step 2, $CDCl_3$, 25 °C).

In NMR investigation, the signal at 3.68 ppm was assigned to the methylene protons of PEG units (–O–CH_2–, b). The signal at 3.37 ppm can be assigned to the three chemically equivalent hydrogen atoms of the terminal methoxy group (–OCH_3, a) of the mPEG *block*. The triplet peaks at 3.87, 3.40, 3.00 and 2.64 ppm were attributed to the methylene protons (–CH_2–) of the PEG_{5K}-SH (c, d, f and e, respectively). Finally, peaks at 3.46 and 2.87 ppm were assignable to the insertion of the methylene (–CH_2–) protons of compound 1: –CH_2–OH (h) and –S–CH_2– (g), respectively. As expected, water traces are observed.

Mass spectrometry was used as a complementary method to conclude if the disulfide linkage was intact. Figure 4 shows the MALDI-TOF mass spectrum of the purified product of step 2.

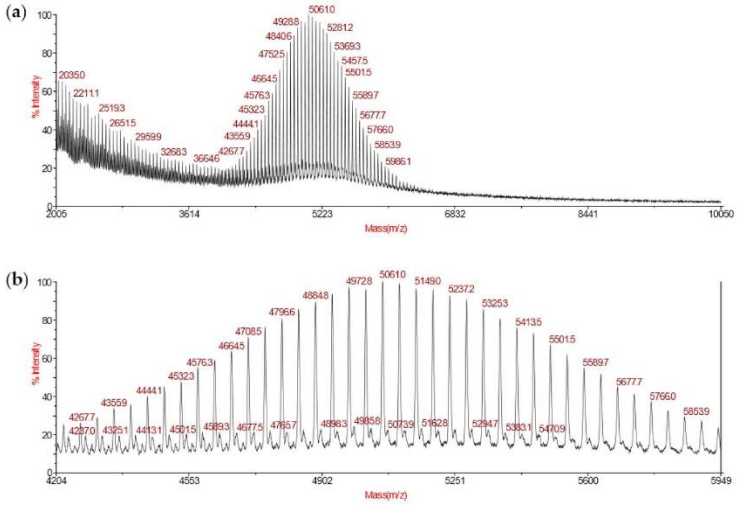


Figure 4. (**a**) Full MALDI-TOF mass spectrum from mass/charge (m/z) 2000 to 10,050 of **P1**. (**b**) Magnification of the mass range region from m/z 4204 to 5949.

The MALDI-TOF mass spectrum was well-resolved and the peaks were separated by 44 mass units, which corresponds to the molecular weight of the ethylene oxide (EO) unit of PEG. Two populations were observed in the mass range region from m/z 4204 to 5949 (Figure 4b). The major population corresponds to the modified PEG **P1** and the minor population corresponds to the unmodified mPEG-thiol, which has not reacted with compound 1. Thanks to mass spectrometry analysis, the integrity of the disulfide linkage of **P1** was confirmed.

The last step consists in producing the copolymer PEG–*block*–PLA (**P2a**) by ring-opening polymerization (ROP). The hydroxyl functional group at the end of the modified PEG **P1** allows the ROP of D,L-lactide using stannous octoate ($SnOct_2$) as the catalyst [6,7,42]. Even after freeze-drying of the modified PEG, traces of water persist and are susceptible to participate in the polymerization of PLA (**P2b**). The copolymer composition was confirmed by ^{1}H NMR as shown in Figure 5. The peaks at 1.57 and 5.18 ppm belong to methyl (–CH_3, j) and methine (–CH, i) protons of the lactate unit of PLA, respectively. The signal at 3.68 ppm (b) was assigned to the methylene protons of PEG units. The methylene protons signal (–CH_2–, h) of **P1**, linked to the hydroxyl group, shifts from 3.46 to 4.4 ppm after polymerization. This signal is superimposed with that corresponding to the PLA end-group methide proton (–CH, k). If the final product corresponded to only **P2a** copolymer, the integration at 4.4 ppm was then supposed to be three (=3H). Herein, the integration was 4.86 corresponding to 2H of methylene protons (–CH_2–, h) and 2.86H associated to PLA end-group methide protons. The assumption is as follows: among the 2.86 protons, 1H corresponds to the PLA end-group methide proton of **P2a** and 1.86H corresponds to the PLA end-group methide protons of PLA polymerized with water traces (**P2b**). The NMR investigation could be interpreted as follows: we have a blend of copolymer **P2a** and polymer **P2b** with an approximate ratio of 1:2. According to the initial amount of polymer **P1** involved in the reaction (~200 mg), the amount of water traces was evaluated as ~8.3×10^{-5} moles.

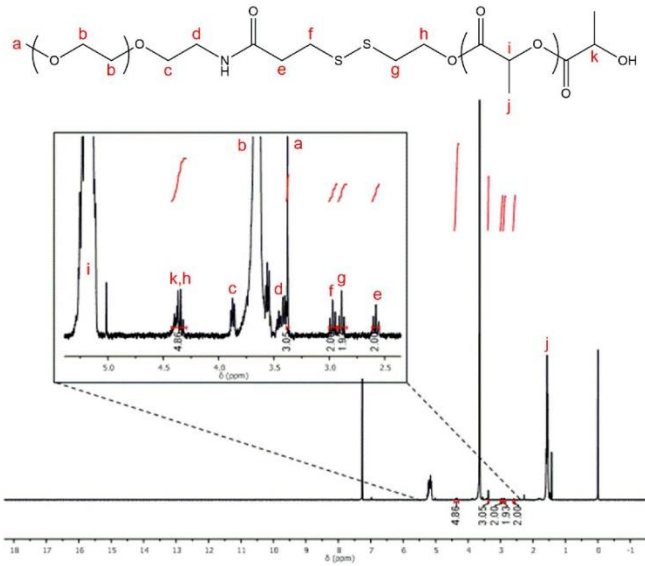


Figure 5. ^{1}H NMR spectrum of **P2** copolymer (step 3, $CDCl_3$, 25 °C).

Usually, integrations of PEG and PLA protons are used to determine the molecular weight of the copolymer. Being in the presence of a blend, a MALDI-TOF mass spectrum was recorded as a complementary method to properly study the composition of the final product (Figure 6). The population below 5.5 kDa corresponds to the PLA polymer with an increment of 144 m/z

corresponding to the lactate unit of PLA. This population is associated to the PLA polymerized from water traces with a molecular weight Mn_{PLA} = 3637 Da (PLA_{4K}). The population observed above 5.5 kDa corresponds to the copolymer PEG–*block*–PLA **P2a** with a molecular weight close to 8 kDa corresponding to a PEG of approximately 5 kDa and a PLA of approximately 3 kDa.

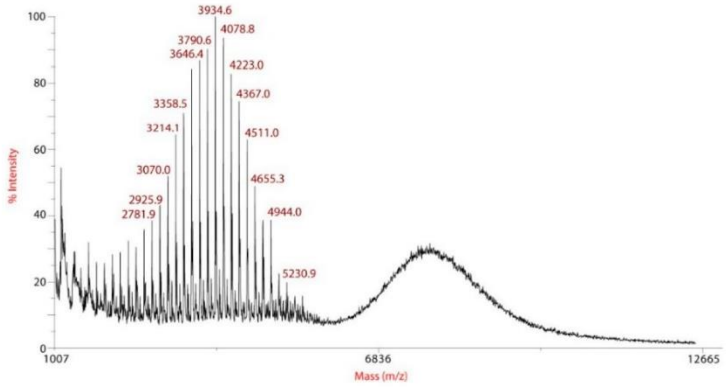


Figure 6. MALDI-TOF mass spectrum of purified product of step 3 (m/z 1007 to 12,665).

To conclude, thanks to NMR and mass investigations, the blend of polymers was characterized, and it is composed of the copolymer PEG–*block*–PLA (**P2a**) and the polymer PLA (**P2b**) with an approximate ratio 1:2. No further purification was performed to explore directly the interest of the mixture for nanocarrier development, minimizing steps for industrial manufacturing. This polymer will be referred to (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) in the rest of the document.

3.2. *Nanocarriers Characteristics*

The nanoprecipitation method was used to produce (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) nanocarriers [43]. This method allows a spontaneous particle formation with no surfactant and with low energy consumption [40,44]. The miscibility of PLA and PEG, added to the fact that both polymers possess a PLA chain, should ensure the coprecipitation of the polymer in mixed nanospheres [45]. The nanocarriers prepared from (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) were stable in aqueous suspension without the addition of surfactant. This stability is in favor of a core-shell structure where the PLA blocks make up the inner core while the majority of the hydrophilic PEG blocks make up the outer hydrophilic shell [22,40]. Nevertheless, the nanoprecipitation method, compared to the emulsion/solvent evaporation or emulsion/solvent diffusion used to prepare nanosystems, may lead to less organized systems. Blank nanoparticles were labeled with Nile red (~0.1% *w/w*) in order to be able to follow their behavior in a reducing medium.

As can be seen in TEM images (Figure 7), Nile red labelled and retinol-loaded nanocarriers (NR-NCs and R-NCs, respectively) have similar spherical morphologies and sizes. The particle size distribution shows only one population of nanocarriers with narrow distribution, suggesting a monodispersed population of particles. This monodispersity is in line with the hypothesis that both polymers coprecipitate to form composite nanospheres and not two separate populations: one made of redox sensitive PEG-*block*-PLA and one made of PLA.

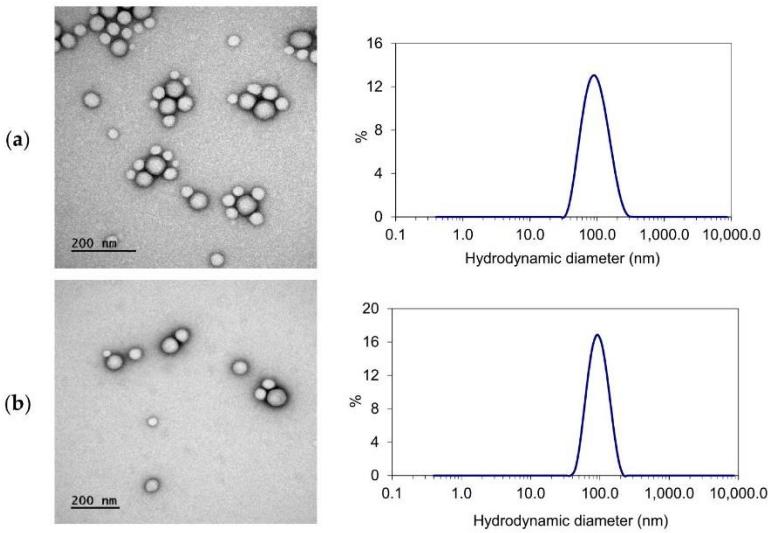


Figure 7. Typical TEM images and representative particle size distribution plots of (**a**) Nile red-labelled and (**b**) retinol-loaded (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) nanocarriers.

The physicochemical characteristics of the labelled and retinol-loaded nanocarriers are compiled in Table 1. Depending on the copolymer composition, method and experimental conditions of formulation, the size of the PEG–*block*–PLA nanocarriers described in the literature may vary from 50 to 300 nm [46]. In this study, the hydrodynamic diameter of blank nanocarriers labelled with Nile red or loaded with retinol was close to 100 nm, which can be considered suitable for skin administration [47]. As expected, D_H values obtained from DLS measurements were higher than NP diameters observed in TEM images: the former includes hydrated layers of PEG shell, while the latter may not reveal PEG, because of its low electronic contrast.

Table 1. Characteristics of nanocarriers (mean values ± SD, n = 3).

	Characteristics	Nile Red-Labelled Nanocarriers	Retinol-Loaded Nanocarriers
Day 1	Hydrodynamic diameter (nm)	100.5 ± 2.7	98.7 ± 2.2
	Polydispersity Index	0.126 ± 0.013	0.101 ± 0.011
	Zeta potential (mV)	−25.7 ± 2.3	−21.6 ± 1.6
	Retinol (mg/mL)	-	0.28 ± 0.04
1 month 4 °C	Hydrodynamic diameter (nm)	98.0 ± 2.4	94.1 ± 1.6
	Polydispersity Index	0.115 ± 0.017	0.093 ± 0.010
	Zeta potential (mV)	−27.8 ± 3.1	−20.7 ± 3.6
	Retinol (mg/mL)	-	0.12 ± 0.01

NCs' aqueous suspensions exhibit low PdI values (<0.2) indicative of populations of rather narrow size distribution. They show high negative zeta potentials (−22 to −28 mV), similar to those of PEG–*block*–PLA-based nanosystems already described [48,49]. These surface charges suggest that electrostatic repulsion of NCs should significantly favor their colloidal stability and reinforce PEG steric hindrance.

As the particle size is linked to the size of the droplets generated during the nanoprecipitation, it is not surprising that blank and retinol-loaded NCs show similar sizes. Nevertheless, their internal structure is in all likelihood different. Indeed, R-NCs show a high loading of ~9.2% *w/w* of retinol. The introduction of nearly 10% of hydrophobic chains could lead to a different stability

or release kinetics of blank and loaded NCs. The chosen length of the PLA chains, deliberately short, led to an effective retinol encapsulation. The encapsulation efficiency (EE) of retinol was of 76.9 ± 11.6% *w/w*, which is satisfactory compared to the literature data on retinol nanocarriers such as (PEG–*block*–PLA)-based NCs (PLA of ≈15 kDa, EE = 100% [34]), chitosan nanocarriers (EE = 76%, [32]), silicone and silica particles (EE = 85% [31] and 31% [33], respectively), and solid lipid nanocarriers (EE = 74% or up to 97% depending on formulation conditions [50,51]). The nanoprecipitation method and experimental conditions described in this study allow a high encapsulation efficiency of retinol into (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) nanocarriers, with a final retinol concentration in water of 28% *w/v* (Table 1).

The size, PdI and zeta potential of the nanocarriers do not vary significantly over one month, showing the physical stability of such a suspension of nanocarriers. Since retinol is known to be chemically unstable, the stability of retinol is one of the most important factors during storage [27–29]. Retinol-loaded nanocarrier suspensions were stored in darkness at room temperature (RT) or 4 °C for 1 month. The chemical stability of retinol is reported in Figure 8.

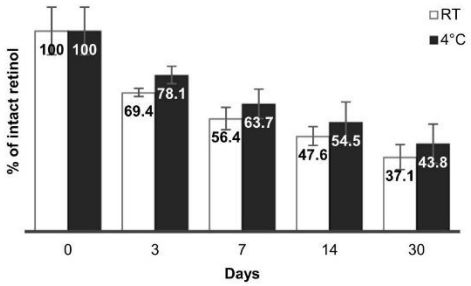


Figure 8. Chemical stability at room temperature (white) and 4 °C (black) of retinol incorporated into nanocarriers.

Stabilizers are usually required to improve the long-term stability of retinol, such as butyl hydroxy toluene (BHT), an antioxidant which protects retinol from chemical degradation [52]. Herein, no stabilizer was added and, after one month in darkness at room temperature or 4 °C, there remained ~40% of non-degraded retinol. These results are encouraging compared to the literature. Indeed, several formulations of retinol have been developed with variable chemical stabilities specific to nanocarriers and development conditions. For example, retinol was encapsulated with BHT in silicone particles for topical delivery and after 14 days in darkness at 45 °C, there remained ~25% of non-degraded retinol [31]. Retinol was also encapsulated in silica particles where the amount of preserved retinol depended on the concentration of surfactants and PEG polymer. With 13 and 1.3% *w/w* of Span®80 and Tween®80, respectively, there remained ~85% of intact retinol after 6 days [33]. Solid lipid nanocarriers (SLNs) showed almost 100% of residual retinol after 4 weeks, at room temperature (shade) or 4 °C [50]. In another study, 43% of retinol remained intact in SLNs after 12 h at room temperature (shade). However, the instability of retinol could be overcome by co-loading of antioxidants such as BHT in SLNs [51]. Furthermore, the protection of retinol in R-NCs could be enhanced by the inclusion of stabilizers like BHT or retinol-palmitate in the organic phase before nanoprecipitation.

3.3. *Nanocarriers Behaviour in a Reductive Medium*

Glutathione (GSH) is a physiological detoxification molecule showing a highly reactive thiol function. It has been reported that, in the cytosol and nuclei, the concentration of GSH can reach 10 mM, while outside the cell the concentration is about 2–20 μM [53–55]. The insertion of the disulfide linkage into the copolymer-based nanocarriers is supposed to accelerate the release of the cargo in a GSH-rich environment [6]. Nile red-labelled blank NCs and retinol loaded NCs were used to

investigate their redox response in vitro. Fluorescence spectra (λ_{ex} = 535 nm for NR and 327 nm for retinol) were recorded from diluted aqueous suspensions, exposed or not to GSH treatment, at different incubation times, at 37 °C. NR fluorescence is strongly influenced by its molecular environment. If NR is released from the hydrophobic environment of nanocarriers in the surrounding hydrophilic environment, its fluorescence yield dramatically decreases [56]. In addition, when retinol is released from the hydrophobic environment of nanocarriers, it is very quickly degraded and loses its fluorescence properties in the measurement conditions described in the Materials and Methods section. Indeed, the UV-visible spectrum of free retinol displays a band shift from 327 nm to 282 nm after a few minutes in water, revealing the disappearance of highly conjugated structures (See Figure S1 in Supplementary Materials). This phenomenon is not disrupted by the presence of GSH. It allowed us to track, by fluorescence, the relative amount of retinol still encapsulated. The NR or R fraction released from (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) was estimated as described in the Experimental section and release kinetics curves were established (Figure 9). These curves show a spontaneous release of encapsulated molecules from the particles with a basal concentration of GSH, but this release is accelerated by the presence of high a concentration of GSH. During the first 2 h of incubation, the NR or R release was similar to the GSH basal level or with GSH activation level. The release seems thus independent of the response to a stimulus over the first 2 h. It is supposed that fluorescent molecules present near the surface of the nanocarriers might be released at early stages. Nevertheless, this release is progressive and cannot be qualified as burst release. From 4 h of incubation, the cumulative release of NR or retinol was higher in GSH-enriched environment compared to the control. This difference becomes even more significant after 24 h: 89 ± 3% vs. 36 ± 2% for Nile red and 91 ± 2% vs. 63 ± 0.1% for retinol. Retinol is released faster than Nile red, which could be explained by the difference in initial content and in NCs' internal structures. Indeed, retinol being more widely present in nanocarriers, their polymeric structure may be degraded more rapidly or the structure more easily destabilized than blank nanoparticles comprised of 99% polymer.

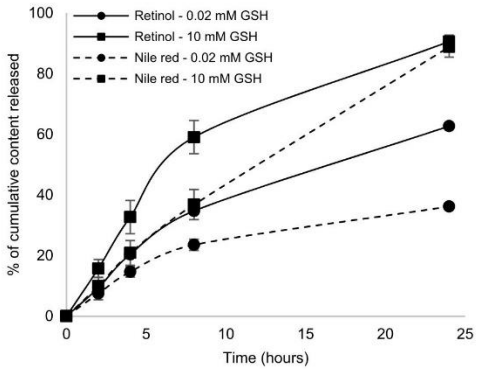


Figure 9. In vitro release of Nile red (dashes) and retinol (full line) from (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) nanocarriers at 37 °C with glutathione (GSH basal level (0.02 mM) and GSH activation level (10 mM).

The release profile of retinol from (PEG-*block*-PLA)-based nanocarriers has not yet been reported in the literature, certainly because of retinol instability. However, (PEG–*block*–PLA)-based nanocarriers have been described for the protection and release of all-*trans* retinoic acid (atRA, log P ~ 5) [48,49]. The atRA cumulative release depends on hydrophobic and hydrophilic chain lengths. In Tiwari et al.'s study, atRA-loaded (PEG–*block*–PLA)-based nanocarriers produced by the nanoprecipitation method reached a size close to 150 nm. The atRA cumulative release reached ~7.5% after 24 h [49]. In fact, the strategy described in this paper could be applied to retinoids in general to achieve an accelerated release. Even if those studies are not directly comparable, the GSH-enhanced release of hydrophobic content is consistent with the supposed mechanism of the NC degradation via disulfide bonds

cleavage [57,58]. The more plausible explanation according to the literature is that the PEG hydrophilic chains are then detached from the hydrophobic PLA core causing the destabilization of the NCs leading to the higher release of the contents [6]. This destabilization is even more efficient if the structure of the nanocarriers includes residual PEG chains in the core of the NCs. TEM images of R-NCs degraded after GSH treatment are shown as supplementary information (Figure S2 in Supplementary Materials) and are consistent with this hypothesis. Those results show that a ratio 1:2 between (PEG–*block*–PLA) and PLA permits to prepare stimuli-responsive nanosystems.

3.4. In Vitro Cytotoxicity Studies of Retinol-Loaded Nanocarriers

Cytotoxicity of (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) nanocarriers towards skin cells is a key index for their topical use. The results on cell viability of human keratinocytes (HaCaT cells) exposed to increasing concentrations of blank and R-NCs (see Figure 10).

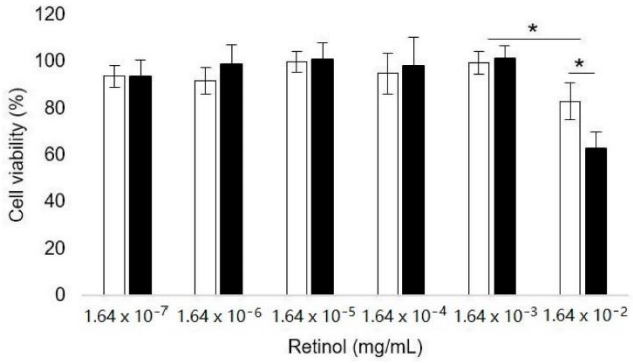


Figure 10. Cell viability of human keratinocytes (HaCaT) exposed to increasing concentrations of blank nanocarriers (open bars) and retinol-loaded nanocarriers (filled bars). Mean ± SD, $n = 6$. * $p < 0.05$.

According to the literature, blank and retinol-loaded nanocarriers suspensions can be considered non-toxic to human keratinocytes up to a corresponding retinol concentration of 1.64×10^{-3} mg/mL (viability > 70%) [59]. At higher retinol concentrations (1.64×10^{-2} mg/mL), human keratinocyte viability decreased to 83% for blank nanocarriers and 63% for retinol-loaded nanocarriers. It is not surprising because retinol is often described as toxic depending on the concentration, generating skin irritation [31].

To conclude, retinol-loaded (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) nanocarriers show a satisfactory biocompatibility for their skin application. Nonetheless, the toxicity can be increased by the encapsulation of active molecules with intrinsic toxicities.

4. Conclusions

Thanks to the simplified synthesis described in this study, it was possible to prepare a redox-responsive blend of PEG–*block*–PLA and PLA with a 1:2 ratio. Smart nanocarriers were formulated by the nanoprecipitation method. Retinol, a hydrophobic and unstable anti-ageing agent, was used as a model active molecule. The strategy to deliberately choose short-length polymers to encapsulate retinol permitted the reaching of high loading and rapid release in a reducing medium in vitro. Nevertheless, the co-encapsulation of stabilizers could increase the chemical stability of the system. Blank NCs showed a good biocompatibility with respect to human keratinocytes, but (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA) NCs can become toxic as function of the concentration of encapsulated molecule, depending on the toxicity of the molecule itself. These nanocarriers could be used to deliver other retinoids for treatment of skin diseases like acne, photoageing, psoriasis vulgaris, melisma or skin cancers [60,61]. In a more general manner,

such redox-responsive nanocarriers could have a high interest for biologically controlled delivery of hydrophobic active molecules in dermatological or cosmetic applications. This study shows that it is not necessary to work in drastic anhydrous conditions and to purify the redox-responsive polymer to obtain a triggered release of disulfide-linked (PEG–*block*–PLA)-blend-(PLA)-based nanocarriers. This simplified copolymer synthesis coupled to nanoprecipitation offers perspective to the industrialization of stimuli-responsive nanosystems.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2073-4360/12/10/2350/s1, Figure S1: Absorbance spectra of retinol-loaded copolymer-based nanoparticles (black); retinol in THF (violet), retinol in distilled water (blue, full line) and retinol in distilled water containing glutathione, 10 mM (blue, dashes); Figure S2. Typical TEM images of retinol-loaded nanocarriers incubated 24 h at 37 °C (a) without and (b) with GSH treatment (10 mM).

Author Contributions: Conceptualization and methodology, E.B. and E.M.; Supervision and Funding acquisition, E.M.; Investigation and formal analysis, L.V.G.; Writing—original draft, L.V.G.; Writing—review and editing, I.C., E.B. and E.M.; project administration, E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work is part of the project MISTIC 2017-00118114 (Cosmétosciences program). This research received financial support from Conseil Régional Centre Val-de-Loire and European Regional Development Fund (FEDER, N°EX003257).

Acknowledgments: Authors are grateful to Julien Burlaud-Gaillard (the IBiSA Electron Microscopy Facility, University of Tours) for TEM images and to Emmanuelle Sachon and Gilles Clodic (IBPS platform, UMR7203, Sorbonne University) for MALDI-TOF mass spectrometry measurement.

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

References

1. Joglekar, M.; Trewyn, B.G. Polymer-based stimuli-responsive nanosystems for biomedical applications. *Biotechnol. J.* **2013**, *8*, 931–945. [CrossRef] [PubMed]
2. Yang, M.; Ding, H.; Zhu, Y.; Ge, Y.; Li, L. Co-delivery of paclitaxel and doxorubicin using mixed micelles based on the redox sensitive prodrugs. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *175*, 126–135. [CrossRef] [PubMed]
3. Balendiran, G.K.; Dabur, R.; Fraser, D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem. Funct.* **2004**, *22*, 343–352. [CrossRef] [PubMed]
4. Révész, L.; Edgren, M.R.; Wainson, A.A. Selective toxicity of buthionine sulfoximine (BSO) to melanoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **1994**, *29*, 403–406. [CrossRef]
5. Traverso, N.; Ricciarelli, R.; Nitti, M.; Marengo, B.; Furfaro, A.L.; Pronzato, M.A.; Marinari, U.M.; Domenicotti, C. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2013**, *2013*, 972913. [CrossRef]
6. Fuoco, T.; Pappalardo, D.; Finne-Wistrand, A. Redox-Responsive Disulfide Cross-Linked PLA–PEG Nanoparticles. *Macromolecules* **2017**, *50*, 7052–7061. [CrossRef]
7. Song, N.; Liu, W.; Tu, Q.; Liu, R.; Zhang, Y.; Wang, J. Preparation and in vitro properties of redox-responsive polymeric nanoparticles for paclitaxel delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2011**, *87*, 454–463. [CrossRef]
8. Wen, H. Redox Sensitive Nanoparticles with Disulfide Bond Linked Sheddable Shell for Intracellular Drug Delivery. *Med. Chem.* **2014**, *4*, 748–755. [CrossRef]
9. Raza, A.; Hayat, U.; Rasheed, T.; Bilal, M.; Iqbal, H.M.N. Redox-responsive nano-carriers as tumor-targeted drug delivery systems. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *157*, 705–715. [CrossRef]
10. Rao, N.V.; Ko, H.; Lee, J.; Park, J.H. Recent Progress and Advances in Stimuli-Responsive Polymers for Cancer Therapy. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2018**, *6*, 110. [CrossRef]
11. Tong, R.; Xia, H.; Lu, X. Fast release behavior of block copolymer micelles under high intensity focused ultrasound/redox combined stimulus. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 886–894. [CrossRef] [PubMed]
12. Jia, L.; Li, Z.; Zhang, D.; Zhang, Q.; Shen, J.; Guo, H.; Tian, X.; Liu, G.; Zheng, D.; Qi, L. Redox-responsive cationer based on PEG-ss-chitosan oligosaccharide-ss-polyethylenimine copolymer for effective gene delivery. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 156–165. [CrossRef]

13. Li, X.Q.; Wen, H.Y.; Dong, H.Q.; Xue, W.M.; Pauletti, G.M.; Cai, X.J.; Xia, W.J.; Shi, D.; Li, Y.Y. Self-assembling nanomicelles of a novel camptothecin prodrug engineered with a redox-responsive release mechanism. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8647. [CrossRef] [PubMed]
14. Han, H.S.; Thambi, T.; Choi, K.Y.; Son, S.; Ko, H.; Lee, M.C.; Jo, D.-G.; Chae, Y.S.; Kang, Y.M.; Lee, J.Y.; et al. Bioreducible Shell-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 447–456. [CrossRef]
15. Xu, Z.; Liu, S.; Kang, Y.; Wang, M. Glutathione-Responsive Polymeric Micelles Formed by a Biodegradable Amphiphilic Triblock Copolymer for Anticancer Drug Delivery and Controlled Release. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 585–592. [CrossRef]
16. Motornov, M.; Roiter, Y.; Tokarev, I.; Minko, S. Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Prog. Polym. Sci.* **2010**, *35*, 174–211. [CrossRef]
17. Liu, X.; Yang, Y.; Urban, M.W. Stimuli-Responsive Polymeric Nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **2017**, *38*, 1700030. [CrossRef]
18. Yang, Q.; Bai, L.; Zhang, Y.; Zhu, F.; Xu, Y.; Shao, Z.; Shen, Y.-M.; Gong, B. Dynamic Covalent Diblock Copolymers: Instructed Coupling, Micellation and Redox Responsiveness. *Macromolecules* **2014**, *47*, 7431–7441. [CrossRef]
19. Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2010**, *75*, 1–18. [CrossRef]
20. Cao-Hoang, L.; Fougère, R.; Waché, Y. Increase in stability and change in supramolecular structure of β-carotene through encapsulation into polylactic acid nanoparticles. *Food Chem.* **2011**, *124*, 42–49. [CrossRef]
21. Ferrari, R.; Cingolani, A.; Moscatelli, D. Solvent Effect in PLA-PEG Based Nanoparticles Synthesis through Surfactant Free Polymerization. *Macromol. Symp.* **2013**, *324*, 107–113. [CrossRef]
22. Lalloz, A.; Bolzinger, M.-A.; Briançon, S.; Faivre, J.; Rabanel, J.-M.; Ac, A.G.; Hildgen, P.; Banquy, X. Subtle and unexpected role of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nano-formulations into intact and impaired skin. *Int. J. Pharm.* **2019**, *563*, 79–90. [CrossRef] [PubMed]
23. Liu, Y.; Zhu, Y.-H.; Mao, C.-Q.; Dou, S.; Shen, S.; Tan, Z.-B.; Wang, J. Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles. *J. Control. Release* **2014**, *192*, 114–121. [CrossRef] [PubMed]
24. El-Naggar, M.E.; Al-Joufi, F.; Anwar, M.; Attia, M.F.; El-Bana, M.A. Curcumin-loaded PLA-PEG copolymer nanoparticles for treatment of liver inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2019**, *177*, 389–398. [CrossRef] [PubMed]
25. Giovino, C.; Ayensu, I.; Tetteh, J.; Boateng, J.S. An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *112*, 9–15. [CrossRef]
26. Varani, J.; Warner, R.L.; Gharaee-Kermani, M.; Phan, S.H.; Kang, S.; Chung, J.; Wang, Z.; Datta, S.C.; Fisher, G.J.; Voorhees, J.J. Vitamin A Antagonizes Decreased Cell Growth and Elevated Collagen-Degrading Matrix Metalloproteinases and Stimulates Collagen Accumulation in Naturally Aged Human Skin1. *J. Investig. Dermatol.* **2000**, *114*, 480–486. [CrossRef]
27. Allwood, M.C.; Plane, J.H. The wavelength-dependent degradation of vitamin A exposed to ultraviolet radiation. *Int. J. Pharm.* **1986**, *31*, 1–7. [CrossRef]
28. Tan, X.; Meltzer, N.; Lindenbaum, S. Determination of the kinetics of degradation of 13-cis-retinoic acid and all-trans-retinoic acid in solution. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1993**, *11*, 817–822. [CrossRef]
29. Oyler, A.R.; Motto, M.G.; Naldi, R.E.; Facchine, K.L.; Hamburg, P.F.; Burinsky, D.J.; Dunphy, R.; Cotter, M.L. Characterizationf of autoxidation products of retinoic acid. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7679–7694. [CrossRef]
30. Manan, F.; Baines, A.; Stone, J.; Ryley, J. The kinetics of the loss of all-trans retinol at low and intermediate water activity in air in the dark. *Food Chem.* **1995**, *52*, 267–273. [CrossRef]
31. Shields, C.W.; White, J.P.; Osta, E.G.; Patel, J.; Rajkumar, S.; Kirby, N.; Therrien, J.-P.; Zauscher, S. Encapsulation and controlled release of retinol from silicone particles for topical delivery. *J. Control. Release* **2018**, *278*, 37–48. [CrossRef] [PubMed]
32. Kim, D.; Jeong, Y.; Choi, C.; Roh, S.; Kang, S.; Jang, M.; Nah, J. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *319*, 130–138. [CrossRef] [PubMed]
33. Hwang, Y.-J.; Oh, C.; Oh, S.-G. Controlled release of retinol from silica particles prepared in O/W/O emulsion: The effects of surfactants and polymers. *J. Control. Release* **2005**, *106*, 339–349. [CrossRef] [PubMed]

34. Laredj-Bourezg, F.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Rovère, M.-R.; Smatti, B.; Chevalier, Y. Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). *Int. J. Pharm.* **2015**, *496*, 1034–1046. [CrossRef] [PubMed]
35. Visentini, F.F.; Sponton, O.E.; Perez, A.A.; Santiago, L.G. Biopolymer nanoparticles for vehiculization and photochemical stability preservation of retinol. *Food Hydrocoll.* **2017**, *70*, 363–370. [CrossRef]
36. Bourissou, D.; Martin-Vaca, B.; Dumitrescu, A.; Graullier, M.; Lacombe, F. Controlled Cationic Polymerization of Lactide. *Macromolecules* **2005**, *38*, 9993–9998. [CrossRef]
37. Hu, Y.; Daoud, W.; Cheuk, K.; Lin, C. Newly Developed Techniques on Polycondensation, Ring-Opening Polymerization and Polymer Modification: Focus on Poly (Lactic Acid). *Materials* **2016**, *9*, 133. [CrossRef]
38. Sasatsu, M.; Onishi, H.; Machida, Y. In vitro and in vivo characterization of nanoparticles made of MeO-PEG amine/PLA block copolymer and PLA. *Int. J. Pharm.* **2006**, *317*, 167–174. [CrossRef]
39. Liu, Q.; Yang, X.; Xu, H.; Pan, K.; Yang, Y. Novel nanomicelles originating from hydroxyethyl starch-g-polylactide and their release behavior of docetaxel modulated by the PLA chain length. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49*, 3522–3529. [CrossRef]
40. Almoustafa, H.A.; Alshawsh, M.A.; Chik, Z. Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. *Int. J. Pharm.* **2017**, *533*, 275–284. [CrossRef]
41. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [CrossRef]
42. Nahire, R.; Haldar, M.K.; Paul, S.; Ambre, A.H.; Meghnani, V.; Layek, B.; Katti, K.S.; Gange, K.N.; Singh, J.; Sarkar, K.; et al. Multifunctional polymersomes for cytosolic delivery of gemcitabine and doxorubicin to cancer cells. *Biomaterials* **2014**, *35*, 6482–6497. [CrossRef] [PubMed]
43. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.P.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4. [CrossRef]
44. Hornig, S.; Heinze, T.; Becer, C.R.; Schubert, U.S. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3838. [CrossRef]
45. Rathi, S.R.; Coughlin, E.B.; Hsu, S.L.; Golub, C.S.; Ling, G.H.; Tzivanis, M.J. Effect of midblock on the morphology and properties of blends of ABA triblock copolymers of PDLA-mid-block-PDLA with PLLA. *Polymer* **2012**, *53*, 3008–3016. [CrossRef]
46. Avgoustakis, K. Pegylated Poly(Lactide) and Poly(Lactide-Co-Glycolide) Nanoparticles: Preparation, Properties and Possible Applications in Drug Delivery. *CDD* **2004**, *1*, 321–333. [CrossRef] [PubMed]
47. Gupta, S.; Gupta, S.; Jindal, N.; Jindal, A.; Bansal, R. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. *Indian Dermatol. Online J.* **2013**, *4*, 267. [CrossRef] [PubMed]
48. Li, Y.; Rong Qi, X.; Maitani, Y.; Nagai, T. PEG–PLA diblock copolymer micelle-like nanoparticles as all-trans-retinoic acid carrier: In vitro and in vivo characterizations. *Nanotechnology* **2009**, *20*, 055106. [CrossRef]
49. Tiwari, M.D.; Mehra, S.; Jadhav, S.; Bellare, J.R. All-trans retinoic acid loaded block copolymer nanoparticles efficiently induce cellular differentiation in HL-60 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2011**, *44*, 643–652. [CrossRef]
50. Jung, Y.J.; Truong, N.K.V.; Shin, S.; Jeong, S.H. A robust experimental design method to optimize formulations of retinol solid lipid nanoparticles. *J. Microencapsul.* **2013**, *30*, 1–9. [CrossRef]
51. Jee, J.-P.; Lim, S.-J.; Park, J.-S.; Kim, C.-K. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2006**, *63*, 134–139. [CrossRef] [PubMed]
52. Eskandar, N.G.; Simovic, S.; Prestidge, C.A. Chemical stability and phase distribution of all-trans-retinol in nanoparticle-coated emulsions. *Int. J. Pharm.* **2009**, *376*, 186–194. [CrossRef] [PubMed]
53. Jones, D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. In *Methods in Enzymology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2002; Volume 348, pp. 93–112. ISBN 978-0-12-182251-4.
54. Griffith, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 922–935. [CrossRef]
55. Smith, C.V.; Jones, D.P.; Guenthner, T.M.; Lash, L.H.; Lauterburg, B.H. Compartmentation of Glutathione: Implications for the Study of Toxicity and Disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1996**, *140*, 1–12. [CrossRef]
56. Greenspan, P.; Fowler, S. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. *J. Lipid Res.* **1985**, *26*, 781–789.
57. Bej, R.; Dey, P.; Ghosh, S. Disulfide chemistry in responsive aggregation of amphiphilic systems. *Soft Matter* **2020**, *16*, 11–26. [CrossRef]
58. Meng, F.; Hennink, W.E.; Zhong, Z. Reduction-sensitive polymers and bioconjugates for biomedical applications. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2180–2198. [CrossRef]

59. Doktorovova, S.; Souto, E.B.; Silva, A.M. Nanotoxicology applied to solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers–A systematic review of in vitro data. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, *87*, 1–18. [CrossRef]
60. Beckenbach, L.; Baron, J.M.; Merk, H.F.; Löffler, H.; Amann, P.M. Retinoid treatment of skin diseases. *Eur. J. Dermatol.* **2015**, *25*, 384–391. [CrossRef]
61. Cullen, J.K.; Simmons, J.L.; Parsons, P.G.; Boyle, G.M. Topical treatments for skin cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *153*, 54–64. [CrossRef]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

polymers

MDPI

Supplementary information

S1: Degradation of retinol released in water observed by UV-vis spectroscopy

UV-visible spectroscopy permits to observe retinol degradation in water. When encapsulated in the hydrophobic core of the nanocarriers, retinol spectrum in water is very close to its spectrum in ethanol. When it is dispersed in water, the maximum of absorption at 327 nm disappears quickly. The presence of gluthatione leads to light scaterring.

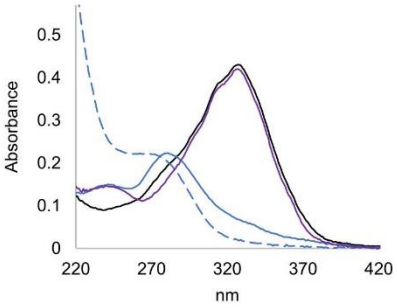


Figure 1. Absorbance spectra of retinol-loaded copolymer-based nanoparticles (**black**); retinol in THF (**violet**), retinol in distilled water (**blue**, full line) and retinol in distilled water containing glutathione, 10 mM (**blue**, dashes).

S2: Impact of glutathione on redox sensitive PEG–*block*–PLA and PLA nanocarriers

TEM images of retinol-loaded nanocarriers, treated or not with GSH (after 24h at 37 °C), were performed. The disruption of the disulfide bond by GSH is supposed lead to the separation of PEG and PLA. PEG are not visible on TEM images because it is transparent to electrons, but after GSH treatment, nanocarriers are still observed, although smaller and less spherical, which can be interpreted as a degradation. Moreover, released retinol could form aggregates, visible in TEM images. The destabilization of nanocarriers by GSH, at the origin of the acceleration of the release of retinol, cannot be proven only by TEM images.

DLS measurements were also done after 24 h of treatment with 10 mM of GSH: the sample is still monodisperse with a hydrodynamic diameter decreased of nearly 10% for both retinol and Nile red. These observation could be consistent with a destabilization of the nanocarriers by the disruption of the disulphide bond.

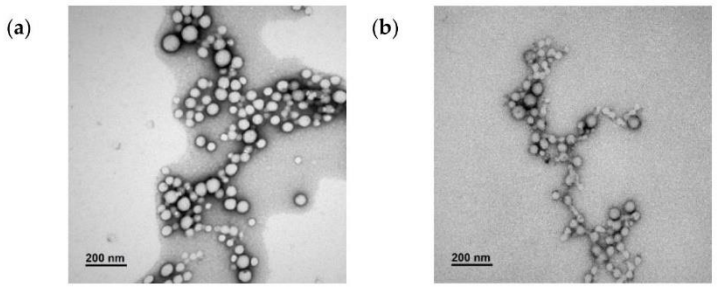


Figure 2. Typical TEM images of retinol-loaded nanocarriers incubated 24h at 37 °C (**a**) without and (**b**) with GSH treatment (10 mM).

Article 2 : "Redox-responsive PEG-block-PLA/PLA nanosystems: impact of the characteristics of the polymer blend on the stimuli-responsiveness"

Louise Van Gheluwe [1], Stephanie David[1], Eric Buchy [2], Igor Chourpa [1] and Emilie Munnier [1]

[1] EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 Avenue Monge, 37 200 Tours, France; louise.vangheluwe@univ-tours.fr (L.V.G.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.)
[2] Laboratoires Eriger, 39 Rue des Granges Galand, 37550 Saint-Avertin, France; eric.buchy@laboratoires-eriger.com

Soumis dans Pharmaceutics

pharmaceutics

MDPI

Article

Redox-responsive PEG-*block*-PLA/PLA nanosystems: impact of the characteristics of the polymer blend on the stimuli-responsiveness

Louise Van Gheluwe [1], Stéphanie David [1], Eric Buchy [2], Igor Chourpa [1] and Emilie Munnier [1,*]

[1] EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Université de Tours, Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge, 37 200 Tours, France; emilie.munnier@univ-tours.fr
[2] Laboratoires Eriger, 39 Rue des Granges Galand, 37550 Saint-Avertin, France
* emilie.munnier@univ-tours.fr

Abstract: Nanocarriers (NCs) were designed from three polymer blends (B1, B2 and B3) and investigated as smart drug delivery systems (SDDS). The blends are composed of a "smart" copolymer, where methoxy poly(ethylene glycol) and poly(lactic acid) are connected via a redox-responsive disulfide bond (mPEG-SS-PLA), and of an "conventional" polymer: poly(lactic acid) (PLA). They differ by mPEG-SS-PLA/PLA ratio and PLA molecular weight. Nanoprecipitation was used to prepare NCs while minimizing the energy consumption. Three concentrations were tested and fluorescent dye Nile red (NR) as a model payload. The results show that the characteristics of the NCs, such as size and drug release kinetics, are influenced by the type of blend and the concentration used during nanoprecipitation process. The more redox-responsive blend was B2 (ratio 1:3, PLA 5 kDa) at 16 mg/mL: the quantity of NR released was multiplied by 3 upon 24h of incubation in a reducing medium. This study reveals that the amount of disulfide bonds present in a NC is not the only parameter to be considered to design a SDDS. The stability of the SDDS in a presumably non-stimulating environment is also important to limit uncontrolled release during storage or in the body, before the biological target is reached.

Keywords: redox-responsive disulfide bond, mPEG-SS-PLA/PLA blend, smart drug delivery system (SDDS), triggered release.

Citation: Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, x. https://doi.org/10.3390/xxxxx

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The concept of smart drug delivery systems (SDDS) has been designed to control the delivery and the release of active molecules into the intended site of action. The drug payload of stimuli-responsive SDDS is released only if a biological or a physical stimulus occurs, which has to be specific to the application. For example, temperature-responsive, pH-responsive or redox-responsive nanocarriers (NCs) are the most widely described smart systems for biomedical uses [1]. The preparation of such SDDS is usually based on the use of stimuli-responsive polymers. For temperature- or pH-responsive systems, the associated stimulus will cause a conformational or structural change in the material, which is mediated by various factors including transition in the temperature below or above its lower critical solution temperature (LCST) or the ionization of acidic or basic functional groups on the polymer chains. Unlike temperature and pH-responsive systems, the production of redox-responsive systems often requires sophisticated chemical modification, notably the insertion of reduction-sensitive linker such as the well-known disulfide bonds (-SS-). The disulfide bond insertion, either between two copolymers [2–4], between the polymer and the drug [4], or in each repeating unit of a polymer [5,6], is time and money-consuming. Indeed, during the synthesis of stimuli-

responsive polymers, several purification and characterization steps are necessary to obtain a pure smart product [7,8].

mPEG-*block*-PLA-based nanocarriers have already proven their efficacy in the encapsulation of siRNA, active pharmaceutical or cosmetic ingredients [9–12]. For example, Liu *et al.* have demonstrated that triple negative breast cancer can be molecularly targeted with siRNA delivered by cationic lipid assisted mPEG-*b*-PLA NCs [9]. Another example is that of El-Naggar *et al.* who developed mPEG-*b*-PLA copolymer NCs for the delivery of curcumin to diabetic male white albino rats. Positively they found that the curcumin loaded nanosystem could trigger a remarkable decrease of serum glucose level, reduce the diabetic rate and attenuate liver inflammation [10]. In the cosmetic field, a previous study from Laredj-Bourezg *et al.* has disclosed a large enhancement of skin delivery of retinol by a factor of 20 for mPEG-b-PLA NCs in comparison to classical micelles of polysorbate 80 [12]. In the team of Si-Shen Feng, polymers blends were used for nanocarriers formulation [13–15]. Notably, blends of mPEG-*b*-PLA copolymer and PLA polymer (mPEG-*b*-PLA/PLA) were used for NCs formulation of anticancer drug to control the drug release by adjusting the blend ratio [15].

In the formulation process of NCs, many parameters may cause crucial changes in the physical characteristics like the morphology, size, and drug encapsulation efficiency (EE) [16–19]. For example, it was described that the NCs morphology depends on the molecular weights of the polymer blocks [19]. Dong and co-workers showed that the mPEG-*b*-PLA nanocarrier size increased when the polymer amount in the organic solvent was increased [18]. Concerning mPEG-*b*-PLA/PLA polymer blends, it was observed that size of NPs decreased when mPEG-*b*-PLA content increased [15]. Redox-responsive mPEG-*b*-PLA NCs containing disulfide bonds between the polymers were developed to construct excellent drug delivery systems for cancer therapy [20,21]. Nevertheless, few studies focused on the impact of the material and preparation parameters on the stimuli-responsiveness of smart nanocarriers.

Lately, a method to synthesize a redox-responsive blend of mPEG-b-PLA/PLA polymers was developed in our laboratory [22]. Briefly, a blend of redox-responsive mPEG-SS-PLA copolymer and a non-responsive PLA polymer (ratio 1:2) was synthesized in three steps and used for retinol encapsulation. This study has notably shown that it is possible to design a redox-responsive system with a restricted amount of reactive materials (≈ 33%), minimizing the cost of the production of such SDDS. Moreover, these nanocarriers show a satisfactory biocompatibility for their skin application. Using this synthesis strategy, it is possible to tune the molecular weights of PLA blocks. Herein, the number of disulfide bonds is linked to the polymer concentration and will most certainly have an impact on the sensitivity of the system to the redox stimulus. The objective of the present study was then to investigate the impact of the polymeric material, i.e. the PLA molecular weight, the mPEG-SS-PLA/PLA molar ratio as well as the blend concentration, on the main physicochemical characteristics of the NCs, in particular on their sensitivity to the redox stimulus. By modifying conditions of the ring-opening polymerization, mPEG-SS-PLA/PLA copolymers were synthesized with different lengths of PLA chains and PLA/PEG ratios. Then, using 3 different mPEG-SS-PLA/PLA blends, several NCs were prepared by nanoprecipitation method. This method allows a spontaneous particle formation with no surfactant and with low energy consumption [23,24] and thus can be easily transposed on an industrial scale. Environment-sensitive fluorophore Nile red (NR) was encapsulated in these nanocarriers and the impact of GSH levels on redox-responsive release of the NR was investigated in vitro.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

2-mercaptoethanol, 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine), anhydrous acetic acid, methanol, O-[2-(3-mercaptopropionylamino)ethyl]-O'-methylpolyethylene glycol (PEG-thiol, 5

kDa), 3,6-dimethyl-1,4-dioxane-2, 5-dione (D,L-lactide), stannous 2-ethylhexanoate, dichloromethane, anhydrous toluene, tetrahydrofuran, Nile red, retinol and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma–Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Dialysis membrane (molecular weight cut-off MWCO 2 kDa, regenerated cellulose) was purchased from BioValley (Marne La Vallée, France). L-Glutathione reduced (GSH), Ultrapure water was produced using a Milli-Q system, Millipore (Paris, France).

2.2. Synthesis and characterization of PEG-b-PLA/PLA redox-responsive blend

The first two steps have been described in a previous study[22]. The first step corresponds to the synthesis of Ethanol, 2-[(5-nitro-2-pyridinyl)dithio]- (abbreviated as compound 1). Briefly, 2,2'-dithiobis(5-nitropyridine) was solubilized in dichloromethane. A solution of 2-mercaptoethanol was prepared in methanol and added to the blend. Finally, anhydrous acetic acid was added. The solution turned yellow and was allowed to stir for 24 hours. The solvent was then removed under vacuum and purified by flash chromatography to give the compound 1.

The second step corresponds to the synthesis of disulfide PEG (abbreviated as P1). Briefly, PEG-thiol, compound 1 and anhydrous acetic acid were solubilized in methanol. The solution turned yellow and was allowed to stir for 30 hours. The progress of the reaction was followed by means of UV-Visible spectrophotometer (Genesys 10S, Thermo Scientific, France) by following the absorbance of thionitropyridine (387 nm) released in the reaction medium. The solvent was then removed under vacuum and the residue was purified by dialysis (water, regenerated cellulose, MWCO = 2 kDa). Finally, the product was freeze-dried for two days to obtain a white powder stocked at -20°C.

The last step corresponds to the synthesis of redox-responsive copolymer (abbreviated as P2). To obtain different length of PLA blocks, the amount of D,L-lactide and the time of reaction differed between blends. Briefly, appropriate amounts of pure D,L-lactide and the same batch of P1 were placed in a two-neck flask with anhydrous toluene and the blend was degassed by bubbling nitrogen for 20 minutes. Under a nitrogen atmosphere, the stannous 2-ethyl-hexanoate was added and the reaction blend was refluxed in an oil bath (120 °C) for appropriate time. During the reaction period, the condenser was cold enough to prevent the volatilization of toluene. The toluene was then removed under reduced pressure and the residue was solubilized in a minimum of THF to perform purification by size exclusion chromatography (Sephadex LH-20, THF). The purification of the polymers P2 produced from the residual lactide monomer was followed by Infrared spectroscopy (Bruker Vector 22, ATR mode). After the collection and the concentration of polymers under vacuum, the product was solubilized in a minimum of THF and precipitated in cold water. After THF removal, freeze-drying was performed for 3 days to obtain a white powder stocked at -20°C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$, ppm): δ 5.18 (m, 1H), 4.38 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 4.35 (q, 1H, J = 7.0 Hz), 3.87 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.64 (m, 4H), 3.40 (t, 2H, J = 4.9 Hz), 3.37 (s, 3H), 2.97 (t, 2H, J = 7.1 Hz), 2.89 (t, 2H, J = 6.7 Hz), 2.58 (t, 2H, J = 7.2 Hz), 1.57 (m, 3H).

Characterizations: For each step, ^{1}H NMR spectra were recorded with a Bruker 300 MHz NMR spectrometer at 25°C with $CDCl_3$ as solvent.

2.3. Preparation and Characterization of Polymer Nanocarriers

Preparation: With each polymeric blend, polymer nanocarriers labelled with Nile red (NR) were prepared by nanoprecipitation method, in triplicate. Briefly, 0.6 mL of acetone solution composed of 4, 10, or 16 mg/mL of polymer blend and 13 µg/mL of NR, was added dropwise to 2 mL deionized water using a syringe pump (KR Analytical, UK) with

a flow rate of 0.3 mL/min and under moderate stirring. The nanocarriers were formed instantly, and the organic solvent was evaporated overnight under stirring at room temperature. The resulting suspensions were filtered through a 0.45 µm polyether sulfone membrane filter to remove unloaded Nile red. All the procedures were performed under dark conditions to preserve the integrity of the molecules.

Size measurements: The mean hydrodynamic diameter (DH) and the polydispersity index (PdI) of the nanocarriers in aqueous suspensions were measured by dynamic light scattering (DLS) technique, using a Nanosizer apparatus (Zetasizer®, Malvern Panalytical, UK) equipped with a He-Ne laser (633 nm, scatter angle 173°). Each sample was diluted 1:10 with deionized water and the measurement was performed three times at a temperature of 25°C. Herein, the DLS measurement results for the nanocarriers diameter are shown in intensity mode.

TEM analysis: The nanocarriers' aqueous suspensions were deposited on carbon film-covered copper grids and then negatively stained. The TEM grids were first plasma-treated in advance, in order to render the carbon support film hydrophilic and improve sample adsorption and spreading, using an ELMO© glow discharge system (Cordouan Technologies, Pessac, France). Then, 5 to 10 µl of the sample suspension were deposited on a grid. Excess liquid was blotted off with filter paper after a 1-2 min incubation. For staining, three ≈10 µl drops of 1.5% (w/v) aqueous uranyl acetate solution were successively deposited on the grid then blotted off, after which the grid was allowed to dry under ambient air. The negatively stained samples were then imaged at 120 kV using a JEOL (Tokyo, Japan) JEM-1400 Plus transmission electron microscope equipped with a GATAN (Pleasanton, CA, USA) OneView CMOS camera.

Cryo-TEM analysis: 5µL of nanocarriers' aqueous suspensions were deposited on C-Flat holey carbon grids (CF-1.2/1.33-3Cu-T-50, Protochips, Morrisville, NC, USA) and vitrified with a Vitrobot Mark IV set at 4°C, 100% humidity (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA). Grids were then transfered on a cryo holder (Cryo-Holder Fischione model 2550, Fischione Instruments, Export, PA, USA) before observations under a transmission electron microscope (JEOL 1400 Plus, Tokyo, Japan).

Nile Red contents: The absorbance of the suspensions was measured in a 1 cm quartz cell placed in a Genesys 10S (Thermo Scientific, France) UV-Vis spectrophotometer. From the absorbance values, Nile Red concentration was determined according to a standard calibration curve made in ethanol. The theoretical loading capacity was calculated by equation (1):

$$\text{Loading capacity (\%)} = \frac{\text{Determined weight of Nile Red in the nanocarriers}}{\text{Initial weight of copolymer}} \times 100 \quad (1)$$

2.3. Redox-Responsivity of Copolymer-Based Nanocarriers

The redox-mediated response to reduced glutathione (GSH) was evaluated by *in vitro* tests, using blank nanocarriers labelled with environment-sensitive fluorescent dye Nile red (NR-NCs). Typically, nanocarriers' suspension was diluted 1:10 with deionized water. Then, 0.5 mL of diluted suspension was mixed with 0.5 mL of GSH solution (20 mM) or 0.5 mL of diluted nitric acid solution to ensure the same pH. Each tube was shaken at 37°C and Nile red (NR) fluorescence was measured at predetermined time intervals (0h, 2h, 4h, 8h, and 24h) using a spectrofluorometer (A Hitachi F-4500). The fluorescence excitation wavelength was fixed to 535 nm, and the emission fluorescence was monitored within the 555–700 nm spectral range. Emission and excitation slits were adjusted as function of

fluorescence intensity of the solution at t_0. To study the NR release as a function of time after GSH treatment, the following formula (2) was used:

$$\% \text{ of Nile Red released at t} = \frac{\text{Fluorescence intensity } t_0 - \text{Fluorescence intensity t}}{\text{Fluorescence intensity } t_0} \times 100 \quad (2)$$

The stimulus-response factor is calculated as follows (3):

$$\text{Stimulus response factor} = \frac{\text{\% of Nile Red released at 24h in GSH solution}}{\text{\% of Nile Red released at 24h in diluted nitric acid solution}} \times 100 \quad (3)$$

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and Characterization of Redox-Responsive PEG-block-PLA

Three blends of polymers were synthesized by modifying the ingredients concentration or the reaction time of the third step of the synthesis developed in the lab and shown in Figure 1 [22].

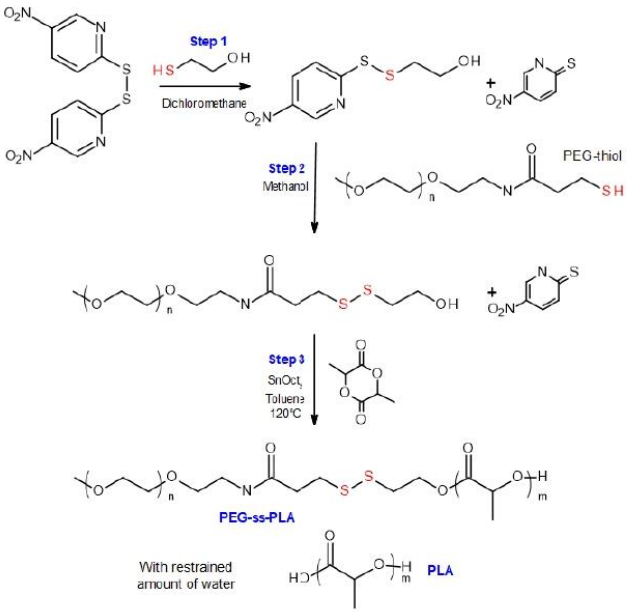


Figure 1. Synthesis of the amphiphilic redox-responsive blend in three steps [22].

After the last step, corresponding to the polymerization of the lactide by ring-opening polymerization, two compounds are expected: mPEG-SS-PLA (**P2a**), polymerized from the hydroxyl functional group at the end of the modified PEG **P1**, and PLA (**P2b**), polymerized from traces of water. These 3 blends (abbreviated as B1, B2, and B3) differ in the length of the polymers which compose them as well as in the mass ratio between stimuli-sensitive polymer and conventional polymer (Table 1). For each blend, the polymer composition was confirmed by ^{1}H NMR as shown in Figure 2.

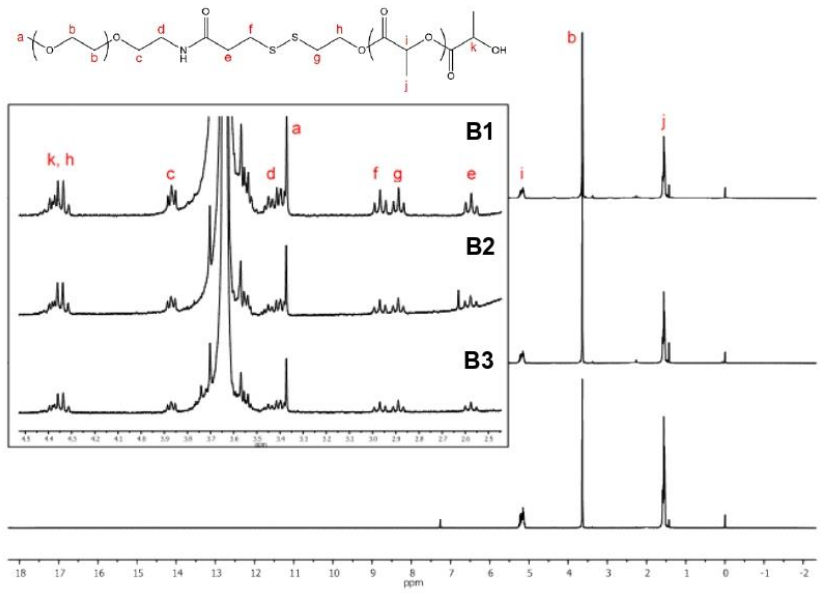
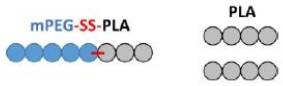
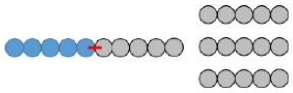
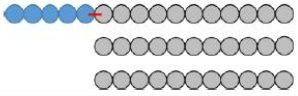


Figure 2. ^{1}H NRM spectrum of blend 1, 2 and 3 (step 3, $CDCl_3$, 25°C).

The peaks at 1.57 and 5.18 ppm belong to methyl (-CH3, j) and methine (-CH, i) protons of the lactate unit of PLA, respectively. The signal at 3.68 ppm (b) was assigned to the methylene protons of PEG units. The methylene protons signal (-CH2-, h) of **P1**, linked to the hydroxyl group, shift from 3.46 to 4.4 ppm after polymerization. This signal is superimposed with that corresponding to the PLA end-group methide proton (-CH, k). If the final product corresponded to only **P2a** copolymer, the integration at 4.4 ppm was then supposed to be 3 (= 3H). Herein, the integration was 4.86, 6.02 and 5.09 for the blend 1, 2, and 3, respectively. It corresponding to 2H of methylene protons (-CH2-, h) and 2.86H, 4.02H, and 3.09H, respectively, associated to PLA end-group methide protons (-CH, k). As described before [22], the assumption is as follows: among the k protons, 1H corresponds to the PLA end-group methide proton of **P2a** and the rest corresponds to the PLA end-group methide protons of PLA polymerized with water traces (**P2b**). The NMR investigation could be interpreted as follows: we have different blend of copolymer **P2a** (mPEG-SS-PLA) and polymer **P2b** (PLA) with an approximate ratio of 1:2 (blend 1 and 3), and an approximate ratio of 1:3 for the blend 2.

PLA molecular weight could be determined using PLA and PEG integrations, notably with methine (-CH, i) and methylene (-CH2-, f or g) protons of the lactate unit of PLA and modified PEG, respectively. For example, for the blend B2, the signal "g" integrates for 2H and the signal "i" integrates for 263H. One repeating unit of PLA corresponds to 1H "i" (-CH, i) with a molecular weight of 72 g/mol. So, for one mole of PEG disulfide, the molecular weight of all repeating units of PLA is: 263H x 72 g/mol ≈ 19 000 g/mol (or 19 kDa). For blend 2, given the ratio mPEG-SS-PLA/PLA of 1:3, 4 PLA blocks are present, and, therefore, the average PLA molecular weight of each block is closed to 19/4 = 5 kDa. The same strategy was used to evaluate the molecular weight of PLA blocks of other blends. Table 1 resumes the blends obtained. No further purification was performed to directly explore the interest of the blend for NCs development.

Table 1. Molecular characteristics of each blend

N° Blend	mPEG-SS-PLA Molecular weight (kDa)	PLA Molecular weight (kDa)	Molar ratio mPEG-SS-PLA / PLA	PEG content (f_{PEG}) in mPEG-SS-PLA	PEG content (f_{PEG}) in blend	Representative diagram of the blends*
1	8 kDa	4 kDa	1:2	63 %	31 %	
2	10 kDa	5 kDa	1:3	50 %	20 %	
3	16 kDa	11 kDa	1:2	31 %	13 %	

*Each ball corresponds to 1 kDa

Blends 1 and 2, showing very close polymer sizes, will be compared in particular to investigate the impact of polymer ratio on the characteristics of the nanocarriers developed. Blends 1 and 3, showing the same ratio will be compared in particular to investigate the impact of PLA molecular weight on the characteristics of the nanocarriers developed.

3.2. Nanocarriers Characteristics

Nanoprecipitation method was used to produce mPEG-SS-PLA/PLA nanocarriers. This method is one of the most popular methods for the manufacture of polymer NCs for pharmaceutical applications [16,25]. In this method, polymer and hydrophobic active molecules dissolved in a water-miscible solvent are added to an aqueous non-solvent phase under stirring, resulting in the formation of NCs by precipitation. Herein, the NCs were formed by the precipitation of polymer as a result of diffusional exchange of solvent (acetone) and non-solvent (water). Since the organic solvent acetone is miscible to water, the solvent in organic phase migrates spontaneously toward water phase once the polymer solution in organic solvent is introduced into water. Sudden change of the solvent composition around the polymer molecules finally induces aggregation of hydrophobic blocks of polymer and subsequently nanocarrier formation. As it can be seen in TEM images (Figure 3), Nile red-loaded nanocarriers (NR-NCs) have a spherical morphology, regardless of blend or concentration used.

Given that polymeric material of each blend is different, i.e. smart/conventional polymer ratio and molecular weight of the hydrophobic polymer blocks, different types of nanosystems could have been expected such as nanomicelles or polymersomes. Indeed, the ratio of the hydrophilic part to the total mass of a copolymer (fPEG value) is determining for the formation of the polymersomes, an fPEG value of between 25 and 40% being optimal [26,27]. Herein, for the blend 3 (fPEG value of 31% in mPEG-SS-PLA), the hydrophobic, long, and bulky segment of PLA should tend to form polymersomes with a bilayer surface. For blend 1 and 2, the structure should be in favor of a core-shell structure where the PLA blocks form the inner core while the majority of the hydrophilic PEG blocks form the outer hydrophilic shell [23,27,28]. Nevertheless, TEM results (Figure 3) and Cryo-TEM results (Supplementary informations, S1) obtained did not allow us

highlight structural differences between the NCs: they seem to be similar in shape, independently from blend type and concentration. It is surely explained by the presence of the "conventional" polymer PLA in the blend, changing the fPEG value. In a general way, the characteristics of the NCs formed (e.g. the kinetic profiles of drug release) may differ depending on their structure [27,29].

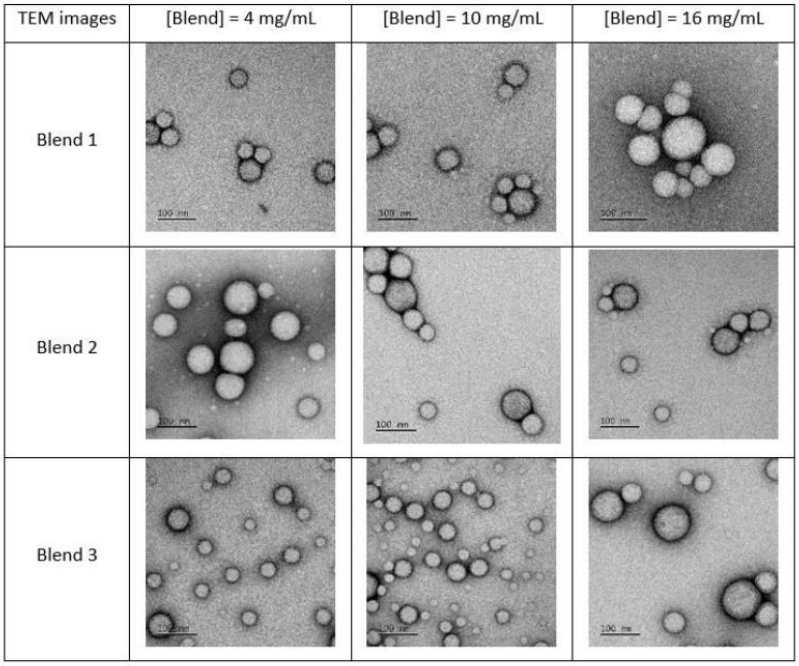
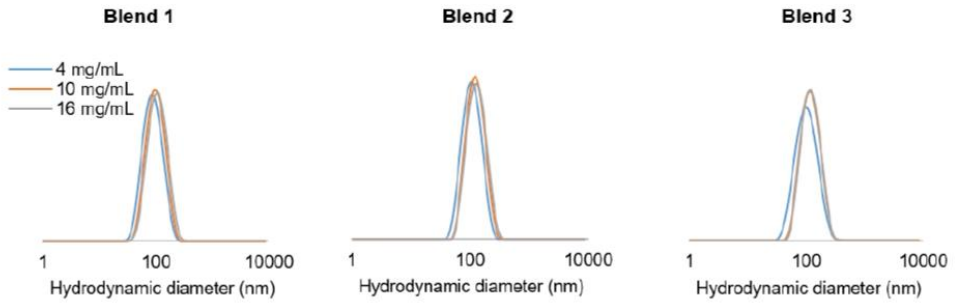


Figure 3. Typical TEM images of nanocarriers obtained from blend 1, 2 and 3, with increasing concentrations.

Even if TEM images seem to show that the samples are composed of particles of various sizes, the mean hydrodynamic diameter (D_H) of nanocarriers is between 90 and 140 nm and the size distribution analysis is in favor of monodisperse samples with a PdI close to 0.1 (Figure 4). The D_H and PdI values of the three tested blends did not vary significantly over 1 year, indicating the physical stability of the suspension (Supplementary informations, S2).

The D_H values increased of about 20 nm as the concentration of the polymer blend during the nanoprecipitation process was multiplied by 4. During the nanoprecipitation process, the diffusion rate is expected to be governed largely by the polymer-solvent, polymer-nonsolvent and solvent-nonsolvent interactions as well as the viscosity of polymer solution. The change of viscosity of the organic phase affects the diffusion rate between organic phase and aqueous coagulation phase. Higher concentrations of polymer in organic phase may induce more viscous media and slow diffusion, making more difficult to disperse organic phase into aqueous phase. Consequently, the organic domains might be solidified before they are dispersed into smaller ones, and bigger particles were formed [15–18,30,31]. In our case, higher concentration of the polymer in the organic phase provides bigger NCs with, certainly, a greater number of redox-responsive bonds per particle.

(a)



(b)

	Blend 1		Blend 2		Blend 3	
[Blend] (mg/mL)	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI
4	91.64 ± 3.47	0.133 ± 0.006	112.73 ± 4.35	0.109 ± 0.011	107.53 ± 6.10	0.143 ± 0.032
10	102.86 ± 4.49	0.112 ± 0.008	129.60 ± 2.23	0.105 ± 0.007	123.17 ± 1.63	0.116 ± 0.01
16	111.23 ± 0.61	0.127 ± 0.011	136.80 ± 7.87	0.113 ± 0.004	125.73 ± 5.95	0.116 ± 0.006

Figure 4. Characteristics of Nile red-labelled nanocarriers: (a) hydrodynamic diameter (D_H) distribution plots; (b) associated values of D_H and PdI.

Also, it seems that the size of NCs decreased when the global PEG wt content in the mPEG-SS-PLA/PLA blend increased. For example, with 10 mg/mL, the D_H was 103 nm for B1-based NCs (fPEG of blend = 31%), 130 nm for B2-based NCs (fPEG of blend = 20%) and 123 nm for B3-based NCs (fPEG of blend = 13%). It was also observed by Gref *et al.* who investigated the effects of the blend ratio on the physicochemical and pharmaceutical properties of NC made of the blends of PLA and mPEG-PLA. The particle size was found to progressively decrease upon increasing the PEG weight fraction, possibly because of the amphiphilic nature of these copolymers, reducing the interfacial tension between the aqueous and the organic phases [31]. Similar phenomenon has also been described by Dong *et al.* [15]. Paclitaxel-loaded nanocarriers were prepared by the nanoprecipitation method from mPEG-PLA/PLA blends at various blend ratios. Increasing from 0 to 100% the mPEG-PLA fraction in the blends, resulted in the particle size decrease from 230.6 to 74.8 nm.

3.3. Nanocarriers Behaviour in a Reductive medium

Glutathione (GSH) is a physiological detoxification molecule bearing a highly reactive thiol function. It has been reported that in cytosol and nuclei of cells, the concentration of GSH can reach 10 mM, while outside the cell the concentration is about 2–20 μM [32–34]. The insertion of the disulfide linkage into the copolymer-based nanocarriers is supposed to accelerate the release of the cargo in GSH-rich environment[20]. In order to follow their behavior in a reducing medium in vitro, the nanocarriers were loaded with ≈ 0.1 % w/w of the solvatochromic fluorophore Nile red (NR) [35]. The NR fluorescence spectra (λ_{ex} = 535 nm) were recorded from diluted aqueous suspensions, exposed or not to GSH treatment, at different incubation times, at 37°C. The NR fluorescence is known to be strongly influenced by its molecular environment. The NR release from the hydrophobic environment of nanocarriers to the surrounding aqueous environment will lead to a dramatic decrease of its fluorescence yield [36]. The NR fraction released from mPEG-SS-PLA/PLA was estimated as described in the Experimental section and release kinetics curves were established.

3.3.1. Impact of the mPEG-SS-PLA/PLA ratio on the physico-chemical characteristics of NCs

The Figure 5 compiles the results obtained for the blend 1 and 2, notably to investigate the impact of the mPEG-SS-PLA/PLA ratio on the payload release kinetics.

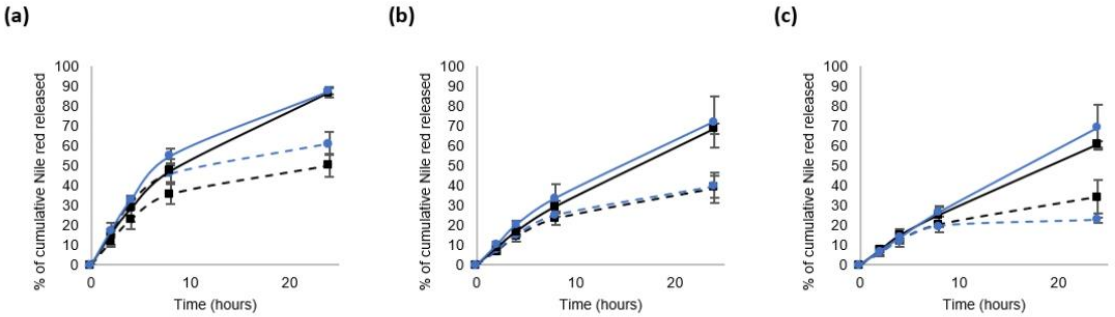


Figure 5. In vitro release of Nile red from the nanocarriers at 37°C in water. The blends were used at three concentrations: 4 mg/mL (a), 10 mg/mL (b) or 16 mg/mL (c). The curves are encoded as follows: Blend 1 (black square) or Blend 2 (blue round); without GSH (dashed lines) and in presence of 10 mM GSH (continuous lines).

Whatever the blend or the concentrations tested, the cumulative release of NR was higher in GSH-enriched environment compared to the control (0 mM GSH). With increasing concentration of mPEG-SS-PLA/PLA blends for NCs development, the overall release of NR decreased. In view of what has been stated above, it could be explained as follows: at higher blend concentration during nanoprecipitation process, more polymers chains are involved in the formation of one nanocarrier. As a consequence the affinity between the hydrophobic core and the hydrophobic encapsulated molecule like Nile red increases, what hinders the NR release. In a medium enriched in GSH, this effect is less strong because the nanocarrier sensitivity to glutathione is increased.

For the blend concentrations 4 or 10 mg/mL, no significant difference was observed regarding the release profiles of Nile Red of B1 or B2-based NCs; after 24 hours of treatment, the stimulus-response factor is, respectively, 1.6 and 1.8. At 16 mg/mL and after 24 hours of treatment, a significant difference emerges between B1 and B2. In a control solution, without GSH, the cumulative release of NR was about 34% for B1-NCs and 23% for B2-NCs. In a GSH-enriched solution, the cumulative release of NR was about 61% for B1-NCs and 69% for B2-NCs. Then, the stimulus-response factor is 1.8 for B1 and 3.1 for B2. Therefore, at 16 mg/mL and after 24 hours of reaction, the NCs produced from B2 have better sensitivity to a reducing medium, compared to those made of B1. For the same mass concentration, it was supposed to have more redox-responsive disulfide bonds involved in the formation of a NC based on B1 than on B2. Therefore, the sensitivity of the NCs to a reducing medium does not depend only on the quantity of sensitive linkers but also on NCs' stability in control solution.

The release kinetics can then be modulated by adjusting the blend ratio. Using the blend B2 (ratio mPEG-SS-PLA/PLA **1:3**) at 16 mg/mL makes it possible to produce more stable NCs in control solution with a better stimulus-response factor than using blend B1 (ratio **1:2**). The more PLA in the blend, the slower the release of the drug will be in a non-stimulating environment, favouring in this study a higher stimulus-response factor. This phenomenon was notably observed for NCs made of non-responsive blend mPEG-PLA/PLA. Indeed, in the study by Dong *et al.*, the drug-release was slower from the NCs made of pure PLA NCs than from those made of only mPEG-PLA [15]. The drug-release

rates from NCs made of polymeric blends (mPEG-PLA/PLA ratio of 75/25, 50/50, and 25/75) was found in between values, adjustable according to the therapeutic needs.

3.3.2. Impact of the molecular weight of PLA blocks on the physico-chemical characteristics of the nanocarriers

The Figure 6 compiles the results obtained for the blend 1 and 3, notably to investigate the impact of the molecular weight of PLA blocks on the nanocarriers characteristics.

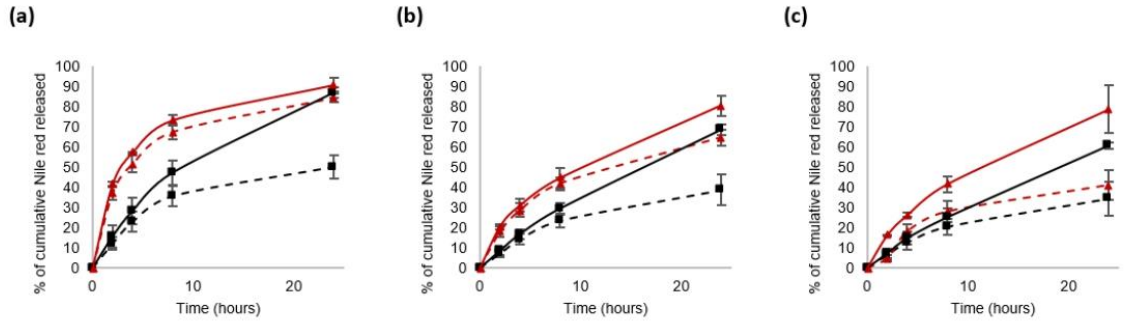


Figure 6. In vitro release of Nile red from the nanocarriers at 37°C in water. The blends were used at three concentrations: 4 mg/mL (a), 10 mg/mL (b) or 16 mg/mL (c). The curves are encoded as follows: Blend 1 (black square) or Blend 3 (red triangle); without GSH (dashed lines) and in presence of 10 mM GSH (continuous lines).

The 24 hours treatment with GSH did not affect the NR release from the NCs made of blend 3 (B3) at 4 mg/mL, while at 10 mg/mL and 16 mg/mL the % of cumulative NR released was respectively multiplied by 1.25 and 1.6. With the NCs made of 16 mg/mL of B3, the NR release in a GSH-enriched medium began to accelerate from 2 hours of incubation. Indeed, the cumulative release of NR was 5 % in control solution compared to 16 % in GSH-enriched environment. After 24h, the stimulus-response factor was 1.6 for B3-based NCs, whereas it was 1.8 for B1-based NCs. Herein, the significant difference between the B1 and B3 blends was the molecular weight of PLA blocks which is 3-4 kDa for B1 and 11 kDa for B3. It means that, for the same mass of each blend, the number of disulfide bonds in the NCs decreases alongside with the increase of the PLA length. This could explain the differences in release kinetics observed between B1 and B3-based NCs. It was observed that the redox-responsiveness of B3-based NCs increased with blend concentration. This may be associated with the increase in the quantity of disulfide bonds in a NC but also with better stability of NCs in control solution, limiting the uncontrolled release of Nile red.

Few studies deals with the impact of PLA blocks on nanosystems characteristics [37–39]. In order to explore specifically the impact of PLA chain length, NCs' made of the same molar concentration of the blend (same numbers of disulfide bonds, same number of PLA chains but of different length: 3-4 kDa vs 11 kDa for B1 and B3, respectively) were compared. Thus, the results obtained with 4 mg/mL of B1 and those obtained with 10 mg/mL of B3 were compared (Figure 7) as they correspond to ≈ 0.2 µmol of each blend.

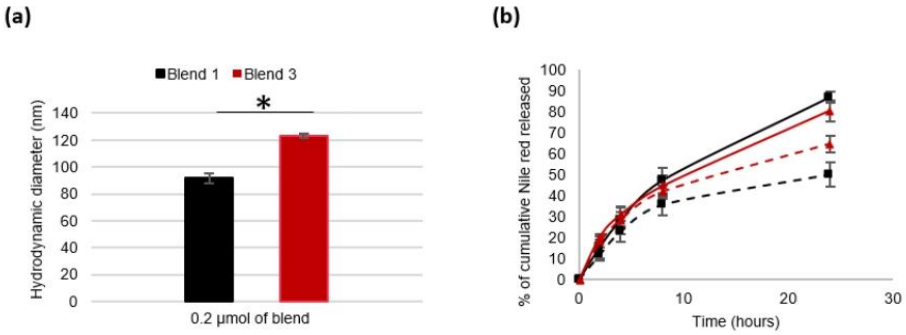


Figure 7. Impact of PLA chain length on the properties and characteristics of nanocarriers. (a) Hydrodynamic diameter D_H. (b) Kinetics of the in vitro release of Nile red at 37°C from the NCs made of 0.2 µmol of blend: B1 (black square) or B3 (red triangle); without GSH (dashed lines); in presence of 10 mM GSH (continuous line).

Nanocarriers developed from 0.2 µmol of B1 blend possessed a size of approximately 91.6 ± 3.5 nm vs 123.2 ± 1.6 nm for NCs developed from 0.2 µmol of B3 blend. As described above, the more PLA there is during nanoprecipitation process, the more viscous the polymer solution the bigger the NCs [15,30,31].

Regarding the NR release profiles, a significant difference was observed, depending on the GSH treatment and the type of blend used. In a non-stimulative medium, the release of NR is faster when it is initially contained in NCs based on B3 compared to those based on B1. This means that NR is less prone to uncontrolled release from NCs based on 0.2 µmol B1 than those based on 0.2 µmol B3. After 24h-long stay in the release medium (10 mM GSH), the stimulus-response factor was 1.6 and 1.2 for the NCs made respectively of B1 and B3. Therefore, the shorter the lengths of PLA the better the sensitivity of the system to the redox stimulus. Probably, the shorter PLA chains lead to a distribution of the polymer chains in favour of better stability of the NCs and a better accessibility of the disulfide bonds for the reducing agent and/or a rapid destructuring of the nanocarriers once the disulfide bonds have been reduced.

5. Conclusion

Using a blend of polymers is an economical, convenient, and often adopted approach to obtain the nanocarrier products with desirable properties. Notably, blends of mPEG-PLA and PLA were investigated by different research team [15,19]. This study demonstrate that with small changes in the polymer blend synthesis schemed we developed, and that is easily transferable to industry, nanocarriers with different properties can be prepared. It was observed that blend 2 (mPEG-SS-PLA/PLA, ratio 1:3), at a concentration of 16 mg/mL, made it possible to develop the most stimuli-sensitive nanocarriers. Indeed, after 24 hours in a medium rich in glutathione, the stimulus-response factor was 3, i.e. the release of Nile Red was multiplied by about 3 times compared to in a control solution, without trigger.

During the nanoprecipitation process, the higher the concentration of polymer blend, the more disulfide bonds in the nanocarriers, and the more NCs will be susceptible to be redox-responsive. Conversely, the higher the concentration of polymer blend, the slower the release of NR due to increasing of the affinity of the lipophilic label to the hydrophobic core of the NC. The choice of the polymers blend and/or nanoprecipitation parameters is therefore a balance between the sensitivity of the system regarding the trigger (here,

glutathione), its stability in a non-stimulable environment and the affinity of the loaded molecule with the polymers..

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title, Table S1: title, Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization and methodology, E.M, S.D, E.B.; Supervision and Funding acquisition, E.M.; Investigation and formal analysis, L.V.G, E.B; Writing-original draft, L.V.G; Writing-review & editing, I.C., EM; project administration, E.M.

Funding: This work is part of the project MISTIC 2017-00118114 (Cosmétosciences program). This research received financial support from Conseil Régional Centre Val-de-Loire and European Regional Development Fund (FEDER, N°EX003257).

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

References

1. Salahpour-Anarjan, F.; Nezhad-Mokhtari, P.; Akbarzadeh, A. Smart Drug Delivery Systems. In *Modeling and Control of Drug Delivery Systems*; Elsevier, 2021; pp. 29–44 ISBN 978-0-12-821185-4.
2. Tong, R.; Xia, H.; Lu, X. Fast Release Behavior of Block Copolymer Micelles under High Intensity Focused Ultrasound/Redox Combined Stimulus. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 886–894, doi:10.1039/C2TB00222A.
3. Jia, L.; Li, Z.; Zhang, D.; Zhang, Q.; Shen, J.; Guo, H.; Tian, X.; Liu, G.; Zheng, D.; Qi, L. Redox-Responsive Catiomer Based on PEG-Ss-Chitosan Oligosaccharide-Ss-Polyethylenimine Copolymer for Effective Gene Delivery. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 156–165, doi:10.1039/C2PY20781H.
4. Li, X.-Q.; Wen, H.-Y.; Dong, H.-Q.; Xue, W.-M.; Pauletti, G.M.; Cai, X.-J.; Xia, W.-J.; Shi, D.; Li, Y.-Y. Self-Assembling Nanomicelles of a Novel Camptothecin Prodrug Engineered with a Redox-Responsive Release Mechanism. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8647–8649, doi:10.1039/c1cc12495a.
5. Han, H.S.; Thambi, T.; Choi, K.Y.; Son, S.; Ko, H.; Lee, M.C.; Jo, D.-G.; Chae, Y.S.; Kang, Y.M.; Lee, J.Y.; et al. Bioreducible Shell-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 447–456, doi:10.1021/bm5017755.
6. Xu, Z.; Liu, S.; Kang, Y.; Wang, M. Glutathione-Responsive Polymeric Micelles Formed by a Biodegradable Amphiphilic Triblock Copolymer for Anticancer Drug Delivery and Controlled Release. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2015**, *1*, 585–592, doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00119.
7. Song, N.; Liu, W.; Tu, Q.; Liu, R.; Zhang, Y.; Wang, J. Preparation and in Vitro Properties of Redox-Responsive Polymeric Nanoparticles for Paclitaxel Delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2011**, *87*, 454–463, doi:10.1016/j.colsurfb.2011.06.009.
8. Yang, Q.; Bai, L.; Zhang, Y.; Zhu, F.; Xu, Y.; Shao, Z.; Shen, Y.-M.; Gong, B. Dynamic Covalent Diblock Copolymers: Instructed Coupling, Micellation and Redox Responsiveness. *Macromolecules* **2014**, *47*, 7431–7441, doi:10.1021/ma5017083.
9. Liu, Y.; Zhu, Y.-H.; Mao, C.-Q.; Dou, S.; Shen, S.; Tan, Z.-B.; Wang, J. Triple Negative Breast Cancer Therapy with CDK1 SiRNA Delivered by Cationic Lipid Assisted PEG-PLA Nanoparticles. *Journal of Controlled Release* **2014**, *192*, 114–121, doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.001.
10. El-Naggar, M.E.; Al-Joufi, F.; Anwar, M.; Attia, M.F.; El-Bana, M.A. Curcumin-Loaded PLA-PEG Copolymer Nanoparticles for Treatment of Liver Inflammation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *177*, 389–398, doi:10.1016/j.colsurfb.2019.02.024.
11. Giovino, C.; Ayensu, I.; Tetteh, J.; Boateng, J.S. An Integrated Buccal Delivery System Combining Chitosan Films Impregnated with Peptide Loaded PEG-b-PLA Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *112*, 9–15, doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.019.

12. Laredj-Bourezg, F.; Bolzinger, M.-A.; Pelletier, J.; Valour, J.-P.; Rovère, M.-R.; Smatti, B.; Chevalier, Y. Skin Delivery by Block Copolymer Nanoparticles (Block Copolymer Micelles). *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *496*, 1034–1046, doi:10.1016/j.ijpharm.2015.11.031.
13. Pan, J.; Feng, S.-S. Targeted Delivery of Paclitaxel Using Folate-Decorated Poly(Lactide)–Vitamin E TPGS Nanoparticles. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2663–2672, doi:10.1016/j.biomaterials.2008.02.020.
14. Liu, Y.; Li, K.; Liu, B.; Feng, S.-S. A Strategy for Precision Engineering of Nanoparticles of Biodegradable Copolymers for Quantitative Control of Targeted Drug Delivery. *Biomaterials* **2010**, *31*, 9145–9155, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.053.
15. Dong, Y.; Feng, S.-S. Nanoparticles of Poly(D,L-Lactide)/Methoxy Poly(Ethylene Glycol)-Poly(D,L-Lactide) Blends for Controlled Release of Paclitaxel. *J. Biomed. Mater. Res.* **2006**, *78A*, 12–19, doi:10.1002/jbm.a.30684.
16. Martínez Rivas, C.J.; Tarhini, M.; Badri, W.; Miladi, K.; Greige-Gerges, H.; Nazari, Q.A.; Galindo Rodríguez, S.A.; Román, R.Á.; Fessi, H.; Elaissari, A. Nanoprecipitation Process: From Encapsulation to Drug Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *532*, 66–81, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.08.064.
17. Lee, J.S.; Hwang, S.J.; Lee, D.S.; Kim, S.C.; Kim, D.J. Formation of Poly(Ethylene Glycol)-Poly(ε-Caprolactone) Nanoparticles via Nanoprecipitation. *Macromol. Res.* **2009**, *17*, 72–78, doi:10.1007/BF03218657.
18. Dong, Y.; Feng, S.-S. Methoxy Poly(Ethylene Glycol)-Poly(Lactide) (MPEG-PLA) Nanoparticles for Controlled Delivery of Anticancer Drugs. *Biomaterials* **2004**, *25*, 2843–2849, doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.055.
19. Känkänen, V.; Seitsonen, J.; Tuovinen, H.; Ruokolainen, J.; Hirvonen, J.; Balasubramanian, V.; Santos, H.A. Evaluation of the Effects of Nanoprecipitation Process Parameters on the Size and Morphology of Poly(Ethylene Oxide)-Block-Polycaprolactone Nanostructures. *International Journal of Pharmaceutics* **2020**, *590*, 119900, doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119900.
20. Fuoco, T.; Pappalardo, D.; Finne-Wistrand, A. Redox-Responsive Disulfide Cross-Linked PLA–PEG Nanoparticles. *Macromolecules* **2017**, *50*, 7052–7061, doi:10.1021/acs.macromol.7b01318.
21. Yang, Q.; Tan, L.; He, C.; Liu, B.; Xu, Y.; Zhu, Z.; Shao, Z.; Gong, B.; Shen, Y.-M. Redox-Responsive Micelles Self-Assembled from Dynamic Covalent Block Copolymers for Intracellular Drug Delivery. *Acta Biomaterialia* **2015**, *17*, 193–200, doi:10.1016/j.actbio.2015.01.044.
22. Van Gheluwe, L.; Buchy, E.; Chourpa, I.; Munnier, E. Three-Step Synthesis of a Redox-Responsive Blend of PEG–Block–PLA and PLA and Application to the Nanoencapsulation of Retinol. *Polymers* **2020**, *12*, 2350, doi:10.3390/polym12102350.
23. Almoustafa, H.A.; Alshawsh, M.A.; Chik, Z. Technical Aspects of Preparing PEG-PLGA Nanoparticles as Carrier for Chemotherapeutic agents by Nanoprecipitation Method. *International Journal of Pharmaceutics* **2017**, *533*, 275–284, doi:10.1016/j.ijpharm.2017.09.054.
24. Hornig, S.; Heinze, T.; Becer, C.R.; Schubert, U.S. Synthetic Polymeric Nanoparticles by Nanoprecipitation. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19*, 3838, doi:10.1039/b906556n.
25. Fessi, H.; Puisieux, F.; Devissaguet, J.Ph.; Ammoury, N.; Benita, S. Nanocapsule Formation by Interfacial Polymer Deposition Following Solvent Displacement. *International Journal of Pharmaceutics* **1989**, *55*, R1–R4, doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.
26. Discher, D.E.; Ahmed, F. POLYMERSOMES. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2006**, *8*, 323–341, doi:10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095838.
27. Khodaverdi, E.; Tayarani-Najaran, Z.; Minbashi, E.; Alibolandi, M.; Hosseini, J.; Sepahi, S.; Kamali, H.; Hadizadeh, F. Docetaxel-Loaded Mixed Micelles and Polymersomes Composed of Poly (Caprolactone)-Poly (Ethylene Glycol) (PEG-PCL) and Poly (Lactic Acid)-Poly (Ethylene Glycol) (PEG-PLA): Preparation and In-Vitro Characterization. *Iran J Pharm Res* **2019**, *18*, 142–155.
28. Lalloz, A.; Bolzinger, M.-A.; Briançon, S.; Faivre, J.; Rabanel, J.-M.; Ac, A.G.; Hildgen, P.; Banquy, X. Subtle and Unexpected Role of PEG in Tuning the Penetration Mechanisms of PLA-Based Nano-Formulations into Intact and Impaired Skin. *International Journal of Pharmaceutics* **2019**, *563*, 79–90, doi:https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.039.

29. Chen, W.; Meng, F.; Cheng, R.; Zhong, Z. PH-Sensitive Degradable Polymersomes for Triggered Release of Anticancer Drugs: A Comparative Study with Micelles. *Journal of Controlled Release* **2010**, *142*, 40–46, doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.023.
30. Ren, J.; Yu, X.; Ren, T.; Hong, H. Preparation and Characterization of Fenofibrate-Loaded PLA–PEG Microspheres. *J Mater Sci: Mater Med* **2007**, *18*, 1481–1487, doi:10.1007/s10856-007-0132-3.
31. Gref, R.; Lück, M.; Quellec, P.; Marchand, M.; Dellacherie, E.; Harnisch, S.; Blunk, T.; Müller, R.H. 'Stealth' Corona-Core Nanoparticles Surface Modified by Polyethylene Glycol (PEG): Influences of the Corona (PEG Chain Length and Surface Density) and of the Core Composition on Phagocytic Uptake and Plasma Protein Adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2000**, *18*, 301–313, doi:10.1016/S0927-7765(99)00156-3.
32. Jones, D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: Assay and biological significance. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2002; Vol. 348, pp. 93–112 ISBN 978-0-12-182251-4.
33. Griffith, O.W. Biologic and Pharmacologic Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, *27*, 922–935, doi:10.1016/S0891-5849(99)00176-8.
34. Smith, C.V.; Jones, D.P.; Guenthner, T.M.; Lash, L.H.; Lauterburg, B.H. Compartmentation of Glutathione: Implications for the Study of Toxicity and Disease. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1996**, *140*, 1–12, doi:10.1006/taap.1996.0191.
35. Klaikherd, A.; Nagamani, C.; Thayumanavan, S. Multi-Stimuli Sensitive Amphiphilic Block Copolymer Assemblies. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 4830–4838, doi:10.1021/ja809475a.
36. Greenspan, P.; Fowler, S. Spectrofluorometric Studies of the Lipid Probe, Nile Red. *The Journal of Lipid Research* 1985.
37. Ghasemi, R.; Abdollahi, M.; Emamgholi Zadeh, E.; Khodabakhshi, K.; Badeli, A.; Bagheri, H.; Hosseinkhani, S. MPEG-PLA and PLA-PEG-PLA Nanoparticles as New Carriers for Delivery of Recombinant Human Growth Hormone (RhGH). *Sci Rep* **2018**, *8*, 9854, doi:10.1038/s41598-018-28092-8.
38. Jain, A.K.; Goyal, A.K.; Gupta, P.N.; Khatri, K.; Mishra, N.; Mehta, A.; Mangal, S.; Vyas, S.P. Synthesis, Characterization and Evaluation of Novel Triblock Copolymer Based Nanoparticles for Vaccine Delivery against Hepatitis B. *Journal of Controlled Release* **2009**, *136*, 161–169, doi:10.1016/j.jconrel.2009.02.010.
39. Riley, T.; Govender, T.; Stolnik, S.; Xiong, C.D.; Garnett, M.C.; Illum, L.; Davis, S.S. Colloidal Stability and Drug Incorporation Aspects of Micellar-like PLA–PEG Nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **1999**, *16*, 147–159, doi:10.1016/S0927-7765(99)00066-1.

Supplementary informations

Table S1: Typical Cryo-TEM images of nanocarriers obtained from blend 1, 2 and 3, with a concentration of 16 mg/mL.

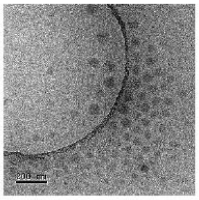
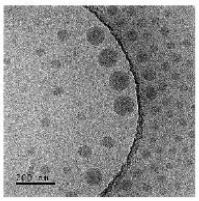
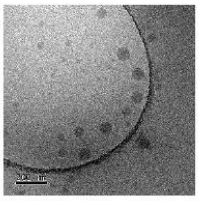
Cryo-TEM images	[Blend] = 16 mg/mL
Blend 1	
Blend 2	
Blend 3	

Table S2: Characteristics of Nile red-labelled nanocarriers (mean values ± SD, n=3) after 1 year stored at 4°C: the hydrodynamic diameter (DH) and PdI.

	Nile red-labelled mPEG-SS-PLA/PLA nanocarriers - **Blend 1**		Nile red-labelled mPEG-SS-PLA/PLA nanocarriers - **Blend 2**		Nile red-labelled mPEG-SS-PLA/PLA nanocarriers - **Blend 3**	
[Blend] (mg/mL)	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI	D_H (nm)	PdI
4	93.21 ± 1.46	0.167 ± 0.036	109.87 ± 2.58	0.116 ± 0.006	100.46 ± 9.93	0.121 ± 0.006
10	95.51 ± 3.82	0.083 ± 0.013	124.70 ± 1.54	0.089 ± 0.010	118.90 ± 0.44	0.106 ± 0.003
16	99.59 ± 3.06	0.079 ± 0.015	131.77 ± 3.33	0.094 ± 0.012	124.97 ± 2.99	0.107 ± 0.011

Conclusion et perspectives

Dans cette partie de la thèse, nous avons choisi de synthétiser un mélange de polymères sensible à une élévation du potentiel réducteur du milieu. L'objectif étant d'utiliser ce mélange pour développer un système stimuli-sensible qui permettra une libération contrôlée de l'actif encapsulé. Cette libération dépendra du milieu biologique de la peau de chaque consommateur, apportant une option de personnalisation au produit cosmétique.

Les nanosystèmes à base de mPEG-*b*-PLA ont déjà prouvé leur efficacité dans l'encapsulation de siARN, d'actifs pharmaceutiques ou cosmétiques (El-Naggar et al., 2019; Giovino et al., 2013; Laredj-Bourezg et al., 2015; Liu et al., 2014). L'idée première de ce chapitre de thèse était de synthétiser un copolymère mPEG-SS-PLA sensible à un déséquilibre du potentiel réducteur des cellules de la peau et de l'utiliser pour développer des systèmes polymères intelligents (SDDS) et *in fine*, des formulations cosmétiques innovantes. La stratégie de synthèse utilisée nous a permis d'obtenir non pas un copolymère mPEG-SS-PLA mais plutôt un mélange de polymères : mPEG-SS-PLA (sensible à une élévation du potentiel réducteur du milieu) et PLA (dit conventionnel). Ce mélange a été utilisé sans purification supplémentaires pour les raisons suivantes :

1. Pour des raisons économiques. En effet, la purification de polymères nécessite du matériel spécifique, des solvants, du temps, de la main d'œuvre, et donc de l'argent.
2. Pour augmenter la stabilité des systèmes développés. En effet, dans la littérature, pour augmenter la stabilité d'un système à base de mPEG-PLA, du PLA peut être ajouté afin de renforcer le cœur hydrophobe. Généralement, ces polymères sont synthétisés indépendamment (Dong and Feng, 2006; Lalloz et al., 2019; Sasatsu et al., 2006). Ici, la synthèse permet de synthétiser à la fois du mPEG-PLA et du PLA, *one pot*.

Différents mélanges de polymères mPEG-SS-PLA/PLA ont été synthétisés en 3 étapes. Des nanosystèmes ont ensuite été développés à l'aide de la technique de nanoprécipitation. La taille des nanosystèmes obtenus était d'environ 100-130 nm, ce qui est acceptable pour une utilisation dermo-cosmétique (Gupta et al., 2013). La sensibilité de ces systèmes vis-à-vis d'un milieu réducteur (riche en glutathion) a été évaluée *in vitro* via la technique de fluorescence. En effet, des molécules lipophiles aux propriétés fluorescentes (rétinol ou Nile red) ont été encapsulées afin de suivre leur relargage et donc la sensibilité des systèmes vis-à-vis d'un milieu réducteur. La première conclusion qui a pu être faite est la suivante : il n'est pas nécessaire d'avoir un système d'encapsulation constitué de 100% de polymères stimuli-sensibles pour obtenir un système stimuli-sensible. Cette mise en évidence est cruciale notamment pour une production à grande échelle de systèmes intelligents. En effet, à la difficulté technique de produire des systèmes dits intelligents, s'ajoute les problèmes de coûts associés. Par conséquent, si on peut réduire la quantité de polymères intelligents nécessaire à la conception d'un système intelligent, cela réduira les coûts finaux de fabrication/formulation.

Il a notamment été montré qu'il est possible de développer des nanosystèmes plus ou moins stimuli-sensibles en variant les concentrations du type de mélange ou les longueurs de chaînes PLA. Chaque type de mélanges, et donc SDDS, présente des avantages et des inconvénients spécifiques pour l'encapsulation, la protection et la libération de la molécule active. Il faut donc bien établir ses besoins pour pouvoir choisir le bon système, avec ici la possibilité de gérer le rapport sensibilité/stabilité des nanosystèmes.

Les perspectives envisageables au terme de ces travaux sont diverses : une meilleure caractérisation des SDDS développés, leur incorporation dans des formules cosmétiques ou encore leur objectivation.

Tout d'abord, il est à noter que les techniques utilisées dans cette partie ne nous ont pas permis de conclure quant à la structure, notamment interne, des systèmes développés. Bien que la réactivité vis-à-vis du stimulus ait été prouvée, il serait intéressant d'étudier de manière plus approfondie la structure des SDDS, et notamment la localisation des ponts disulfures et leur accessibilité à l'agent réducteur. Cela nécessiterait certainement de collaborer avec des équipes spécialistes de l'étude des structures.

Les nanosystèmes étudiés dans cette partie sont dispersés dans l'eau. Il serait intéressant d'incorporer ces systèmes dans des formulations plus complexes, proche de ce que l'on pourrait retrouver dans le commerce (avec des excipients, des parfums, des conservateurs, etc.). Mais le système étant stimuli-sensible, son incorporation nécessitera certainement une plus grande attention. En effet, il pourrait interagir avec d'autres composants de la formulation cosmétique et libérer l'actif avant même son application sur la peau. Il faudrait alors consacrer une étude à cela avec : 1. l'incorporation d'un SDDS dans une formule cosmétique, 2. l'étude de sa stabilité au sein de la formule et 3. l'étude de la séparation du SDDS de son véhicule une fois en contact avec l'environnement cutané ainsi que l'expression de son caractère stimuli-sensible.

Bien que les études dans le domaine des nanotechnologies soient nombreuses, leur concrétisation en produits commercialisés est encore limitée. Ce manque de transfert à grande échelle peut être attribué, entre autres, à des problèmes de caractérisation des nanosystèmes (Fornaguera and Solans, 2018). Concernant les SDDS, la caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques (par exemple, la taille et la charge de surface) est bien décrite. Mais de nombreux efforts doivent être consacrés à la caractérisation de leurs interactions avec le milieu biologique, d'autant plus que, bien souvent, il sera à l'origine du relargage de l'actif. Par conséquent, des études d'évaluation biologique des SDDS développés devront être réalisées. La difficulté réside dans le fait qu'il va falloir développer des modèles d'études mimant l'environnement cutané, et notamment mimant le stimulus qui sera à l'origine du relargage de l'actif. Notre partenaire *Transderma Systems* pourrait intervenir, tout en sachant la difficulté de développer de telles méthodes d'objectivation. Sans ces études biologiques, il est impossible de prédire l'efficacité des produits développés, ni même leur pénétration cutanée.

PARTIE 3 : Caractérisation et évaluation de formulations chargées en nanosystèmes polymères.

Introduction

1. Généralité sur les Poloxamères

Les poloxamères sont connus sous les noms commerciaux Pluronic® (BASF), Kolliphor® (BASF) et Synperonic® (Croda International), par exemple. Les poloxamères sont des copolymères biocompatibles triblocs formés par un groupe hydrophobe de poly(oxyde de propylène) (PPO) entouré de deux groupes hydrophiles de polyéthylène glycol (PEG) (Figure 12). Du fait de leur structure amphiphile, les poloxamères ont des propriétés tensio-actives qui les rendent utiles dans les domaines cosmétique et pharmaceutique. En effet, ils peuvent être utilisés pour augmenter la solubilité dans l'eau de substances hydrophobes et huileuses. Les poloxamères trouvent donc une utilisation dans de nombreuses applications nécessitant la solubilisation ou la stabilisation de composés.

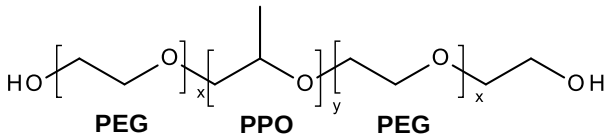


Figure 12: Structure des Poloxamères® (PEG pour polyéthylène glycol et PPO pour poly(oxyde de propylène))

Grâce à leurs propriétés tensio-actives, les poloxamères peuvent s'auto-assembler en solution aqueuse et servir, en nanomédecine, à des systèmes d'administration de médicaments. Au-dessus d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC) et d'une certaine température micellaire critique (CMT), ces copolymères s'auto-assemblent en milieu aqueux sous forme de micelles très stables. Ces micelles sont composées d'un cœur hydrophobe de PPO et d'une couronne hydrophile de PEG. Le noyau de la micelle de polymères peut servir de microenvironnement pour des molécules actives hydrophobes. La couronne externe hydrophile stabilise l'interface entre l'actif et le milieu externe. La capacité d'encapsulation dépend de l'affinité cœur/principe actif. La balance hydrophile-lipophile (HLB) des poloxamères varie en fonction du rapport PEG/PPO et module leur affinité pour les molécules actives.

Les poloxamères sont aussi des polymères présentant une LCST (*Low Critical Solution Temperature*), c'est-à-dire qu'à une température inférieure à la LCST, le polymère est hydrosoluble et qu'au-dessus de la température LCST il est non soluble. Les valeurs de LCST varient entre 20 et 85°C en fonction de la concentration en poloxamères (Mishra, 2017). Cette caractéristique est parfois utilisée pour stimuler la libération d'actifs (Van Gheluwe et al., 2021).

En règle générale, les micelles de poloxamères ont un rayon hydrodynamique moyen d'environ 10 à 100 nm, suffisamment petit pour pénétrer dans les cellules mais suffisamment grand pour éviter la filtration

par les reins. En raison de ces propriétés, ces matériaux polymères ont été fortement exploités pour diverses applications biomédicales. Bien que le nombre d'études concernant l'utilisation de nanomicelles de poloxamères soit moindre pour des applications cutanées ou capillaires, il en existe quelques exemples. Des nanomicelles de poloxamères ont été envisagées pour encapsuler des antioxydants (Parmar et al., 2011), des actifs antibactériens et anti-inflammatoires (Niu et al., 2020), des terpènes (Kahraman et al., 2018), des molécules de parfum (Grillo et al., 2018) ou des actifs anti-acné (Kahraman et al., 2016).

Le Tableau 4 référence les polymères synthétiques de poloxamères rencontrés dans le domaine des cosmétiques (Alvarez-Lorenzo et al., 2011).

Tableau 4: Caractéristiques structurelles et CMC (à 37°C) de certains poloxamères

Noms commerciaux	Masse molaire (g/mol)	Formule	Unités PEG	Unités PPO	HLB	CMC (mM)
L-44	2200	$PEG_{10}PPO_{23}PEG_{10}$	20	23	16	3,6
F-68	8400	$PEG_{76}PPO_{29}PEG_{79}$	153	29	29	0,48
F-87	7700	$PEG_{61}PPO_{40}PEG_{61}$	122	40	24	0,091
F-127	12600	$PEG_{100}PPO_{65}PEG_{100}$	200	65	22	0,0028

2. Formulation de nanomicelles de poloxamères

Il existe plusieurs manières de réaliser des formulations à base de poloxamères. Les techniques les plus communes sont les suivantes : dissolution directe, transition de phase induite par la température, hydratation en couche mince, évaporation de solvant (Bodratti and Alexandridis, 2018). Dans notre cas, nous allons utiliser la technique d'émulsion-évaporation de solvant assistée par ultrasons pour former des nanosystèmes de poloxamères. Cette technique a effectivement montré des résultats convaincants quant à l'élaboration des nanosystèmes de poloxamères 407 (nom commercial Pluronic® F-127) stables chargés en un actif lipophile (Munnier et al., 2020).

La formulation de nanosystèmes se déroulera brièvement comme suit (Figure 13) : l'actif hydrophobe sera dissous dans du carbonate de diméthyle (DMC) et le polymère Pluronic® F-127 (abrégé par PF127 dans le reste du document) sera dissous dans du tampon phosphate salin 1× (abrégé PBS). L'émulsion sera réalisée avec une sonde à ultrasons pendant 3 minutes (20 kHz, amplitude 30%) en injectant la phase organique dans la phase aqueuse directement après le début des ultrasons. Une cellule de rosette est utilisée pour une sonication intensive et uniforme des phases. Le DMC sera ensuite immédiatement évaporé sous pression réduite.

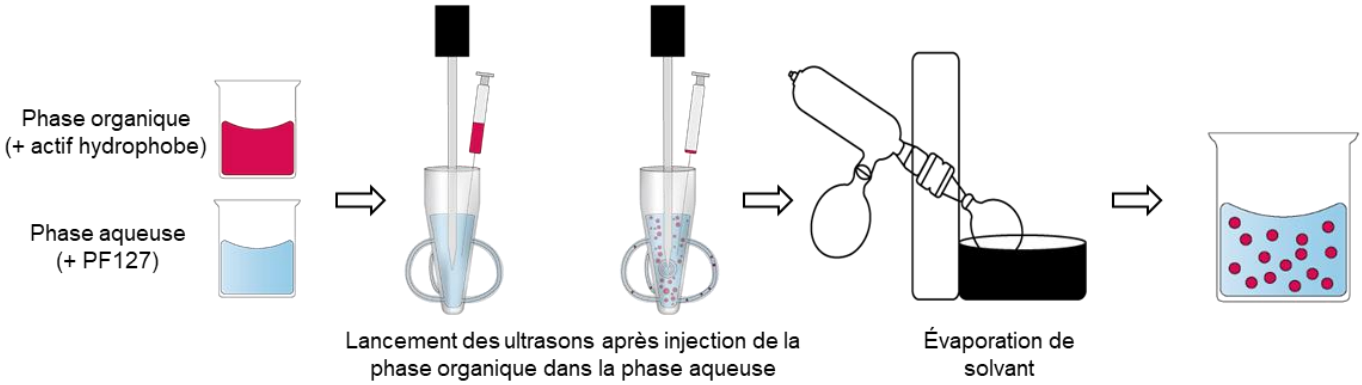


Figure 13: Formulation de nanomicelles de Pluronic® F127 chargées en actif lipophile à l'aide de la méthode dite d'émulsion-évaporation de solvant. Successivement, 1. Mélange de la phase aqueuse et de la phase organique, 2. Emulsion assistée par ultrasons et 3. Evaporation du solvant organique.

Dans la suite de cette partie, deux types d'applications seront envisagées pour ce type de nanosystème :

1) Une application cutanée ; les nanosystèmes de PF127 chargés en un actif lipophile (agent amincissant) seront incorporés dans une forme galénique pour un contact optimal avec la peau. Et dans le cadre du projet MISTIC, la forme explorée est le film. La technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman sera utilisée pour étudier l'incorporation d'un tel nanosystème.

2) Une application capillaire ; la suspension aqueuse des nanosystèmes de PF127 chargés avec un colorant modèle sera explorée sur le cheveu. La technique d'imagerie confocale de fluorescence sera utilisée pour étudier l'intérêt d'un tel nanosystème pour une application capillaire.

Chapitre 1 : Caractérisation de nanosystèmes polymères incorporés dans un film cosmétique

1. Incorporation de nanosystèmes polymères dans des films cosmétiques

1.1. Intérêt des films cosmétiques

L'efficacité d'un traitement par voie topique est liée à la diffusion de la molécule active dans la peau. Celle-ci dépend d'une part des propriétés physico-chimiques de la molécule active et d'autre part de la capacité de la forme galénique à maintenir celle-ci en contact avec la peau pendant une durée suffisante. Les formulations conventionnelles pour l'administration topique d'ingrédients actifs cosmétique (ACI) possèdent certaines limites telles que leur adhérence à la peau ou un inconfort d'application pour le patient. Les films et patchs cosmétiques sont des formes intéressantes et constituent une nouvelle approche en formulation (Kathe and Kathpalia, 2017). En effet, ces systèmes ont la capacité à adhérer à la peau, formant un film mince et souvent transparent. Ainsi, lorsqu'ils contiennent une substance active, les films permettent de maintenir celle-ci sur le site d'action durant une période de temps efficace.

Après application de la formulation filmogène sur la peau, un film se forme en surface et va évoluer durant la phase de séchage à l'air ambiant. Cette évolution engendre des modifications de surface qui induisent différents résultats de couleurs, de motifs (réguliers ou irréguliers), de textures ou encore de stabilité, et peut aussi engendrer des modifications de propriétés. Les propriétés élastiques de la peau ainsi que les substances qu'elle sécrète, peuvent elles aussi influencer ces paramètres. Dans ce processus de séchage, la concentration d'ACI augmente, atteignant un niveau de saturation et avec la possibilité d'atteindre un niveau de sursaturation à la surface de la peau. La sursaturation entraîne un flux d'ACI amélioré à travers la peau en augmentant l'activité thermodynamique de la formulation sans affecter la barrière cutanée, réduisant ainsi les effets secondaires ou l'irritation (Frederiksen et al., 2016).

Les produits filmogènes cosmétiques récents intègrent majoritairement des polymères hydrosolubles, parmi lesquels l'alcool polyvinylique (PVA), la polyvinylpyrrolidone ou des polysaccharides (alginate, pullulane, chitosane). Quelques études se focalisent sur l'intérêt de l'encapsulation d'un ACI afin de le disperser dans un film hydrophile pour une application cutanée (Contri et al., 2016; Gehrcke et al., 2021; Niamlang et al., 2017; Tran and Tran, 2019; Zaid Alkilani et al., 2018). Par exemple, dans l'étude de Contri *et al*., des nanocapsules de polymères encapsulant de l'huile de rose musquée ont été dispersées dans un film à base de chitosane afin de traiter des problèmes de pigmentation, d'ulcération ou de cicatrisation (Contri et al., 2016). Cette formule cosmétique a présenté des propriétés adaptées à l'application sur la peau, combinant les avantages des nanocapsules (encapsulation d'une dose efficace d'huile de rose musquée et protection contre l'oxydation UV) aux avantages du chitosane (propriétés de cicatrisation et d'adhérence). Dans l'étude de Niamlang *et al.*, le chlorhydrate de tétracycline a été encapsulé dans des nanoparticules de

chitosane, elles-mêmes dispersées dans un film à base de PVA. Ces films ont montré une activité antibactérienne, prouvant leur potentiel intérêt dans la conception de pansements (Niamlang et al., 2017). Dans l'étude de Gehrcke, des films de gomme gellane contenant des nanocapsules chargées de silibinine ont été développés comme nouvelle approche pour l'administration cutanée de ce flavonoïde. L'encapsulation de la silibinine a notamment permis sa distribution homogène dans le film ainsi qu'une libération prolongée (Gehrcke et al., 2021).

1.2. Contrôle qualité des films cosmétiques

Pour être considéré comme un film cosmétique idéal, plusieurs paramètres sont à prendre en compte tels que : son élasticité, sa transparence, sa stabilité physico-chimique, etc. Les films topiques sont alors généralement caractérisés en termes de morphologie, de propriétés mécaniques et de composition chimique (Karki et al., 2016; Tran and Tran, 2019).

La mesure de l'épaisseur est nécessaire car elle est directement corrélée à la quantité de médicament dans le film. De plus, une épaisseur appropriée est requise pour une administration confortable des films. Généralement, l'épaisseur des films formés est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse ou d'un micromètre numérique (Contri et al., 2016; Gehrcke et al., 2021; Karki et al., 2016; Patel et al., 2018).

Il est important que le film produit ait une bonne résistance mécanique. Les propriétés mécaniques des films peuvent être définies en termes de module de Young, d'allongements en pourcentage, de résistance à la traction et de résistance à la déchirure (Contardi et al., 2017; Gehrcke et al., 2021; Karki et al., 2016). La détermination de ces propriétés mécaniques se fait bien souvent à l'aide d'un analyseur de texture.

Pour que l'actif contenu dans le film pénètre dans la peau ou la membrane biologique, il doit s'en libérer. Souvent, l'étude de la libération *in vitro* de l'actif à partir de films est réalisée à travers des cellules de diffusion de Franz verticales (Gehrcke et al., 2021). Autrement, le film est placé dans un milieu spécifique et la libération de l'ACI est suivi à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Contardi et al., 2017).

Le film doit apparaître homogène pour assurer la distribution uniforme de l'actif dans tout le mélange polymère. Par conséquent, l'évaluation de la morphologie et de la texture de la surface est cruciale. Les deux techniques le plus souvent employées sont : la microscopie à force atomique (AFM) (Garvie-Cook et al., 2015; Magalhães et al., 2017; Schmidt et al., 2005) et la microscopie électronique à balayage (MEB) (Contardi et al., 2017; Gehrcke et al., 2021; Niamlang et al., 2017; Patel et al., 2018).

Afin d'évaluer la distribution des composés dans les films polymères, les techniques de microspectroscopies vibrationnelles sont utilisées. La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) a été utilisée pour caractériser la nature chimique des matériaux préparés (Contardi et al., 2017; Voss et al., 2020), ou pour identifier les interactions moléculaires entre l'actif et les autres composants du film (Magalhães et al., 2017; Patel et al., 2018; Tran et al., 2011). La spectroscopie Raman permet également d'évaluer la distribution des composés dans les films (Garvie-Cook et al., 2015; Schmidt et al., 2005). Grâce au principe confocal, non seulement la surface peut être étudiée, mais des informations à une certaine profondeur à l'intérieur du film peuvent également être obtenues (Zou et al., 2019).

1.3. Objectifs du chapitre

Le Délipidol® (nom INCI : *Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters*), fournit par l'entreprise Solabia, est un agent amincissant lipophile nécessitant un contact prolongé avec les zones de la peau à traiter. Il s'agit d'un mélange d'esters pâteux enrichi en punicate de tyrosyle (Figure 14), obtenu par estérification enzymatique de l'acide punicique (pépins de grenade) par le tyrosol.

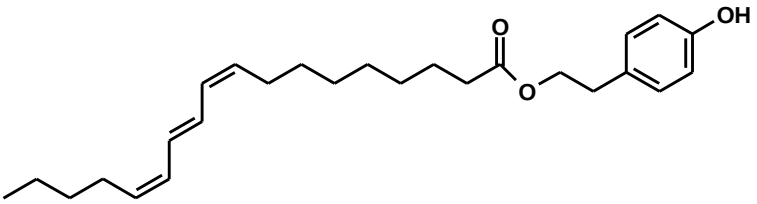


Figure 14: Structure du punicate de tyrosol (isomère ZEZ)

Un des objectifs de ce chapitre était d'incorporer cet actif dans un film cosmétique. La nanoencapsulation du Délipidol® au sein de nanomicelles polymères PF127 a d'ores et déjà été envisagée au sein du laboratoire Nanomédicaments et Nanosondes afin d'augmenter sa concentration dans un film hydrophile de PVA (Annexe 1, (Munnier et al., 2020)). Dans la suite du document, on abrégera ces nanosystèmes chargés en Délipidol® en NanoPHE (PHE, pour ***P**unica granatum seed oil **h**ydroxyphenethyl **e**sters*, nom INCI du Delipidol®). Il a été montré dans cette précédente étude, grâce à la technique de spectroscopie Raman, que le PHE encapsulé était réparti de manière homogène dans les films d'environ 10 µm d'épaisseur comparé au PHE libre. A première vue, l'encapsulation d'actifs hydrophobes semble être une méthode pertinente pour introduire de manière homogène ce type d'ingrédient dans un film hydrophile.

Pour aller plus loin dans cette étude, des concentrations croissantes de NanoPHE seront incorporées dans des films à base de PVA pour 1) étudier l'impact de la concentration de NanoPHE sur la distribution de PHE dans le film et 2) étudier la possibilité d'utiliser la spectroscopie Raman pour effectuer une analyse semi-quantitative du PHE dans le film.

2. Bases théoriques de la spectroscopie Raman

2.1. Principe de la diffusion Raman

Lorsqu'un échantillon est soumis à un rayonnement monochromatique (source laser), une grande partie de la lumière est diffusée sans changement de fréquence. On parle de diffusion Rayleigh ou diffusion élastique. Mais une petite partie des photons est diffusée avec un changement de longueur d'onde suite à un transfert d'énergie entre la molécule et le photon. Ce phénomène est appelé diffusion Raman (ou diffusion inélastique). Dans la grande majorité des cas, le photon incident cède de l'énergie à la molécule. A l'échelle de la molécule, cette énergie est utilisée pour provoquer les vibrations des liaisons. La molécule arrive à un état vibrationnel d'énergie supérieure à celle de l'état fondamental. Le photon diffusé va donc présenter une longueur d'onde (λ) plus grande que le photon incident : on parle de diffusion Raman Stockes (en rouge sur la Figure 15). A l'inverse, avec une très faible probabilité, la molécule cède de l'énergie vibrationnelle au photon diffusé dont la fréquence sera supérieure à la fréquence du rayonnement incident. On parle de diffusion Raman anti-Stockes (en bleu sur la Figure 15).

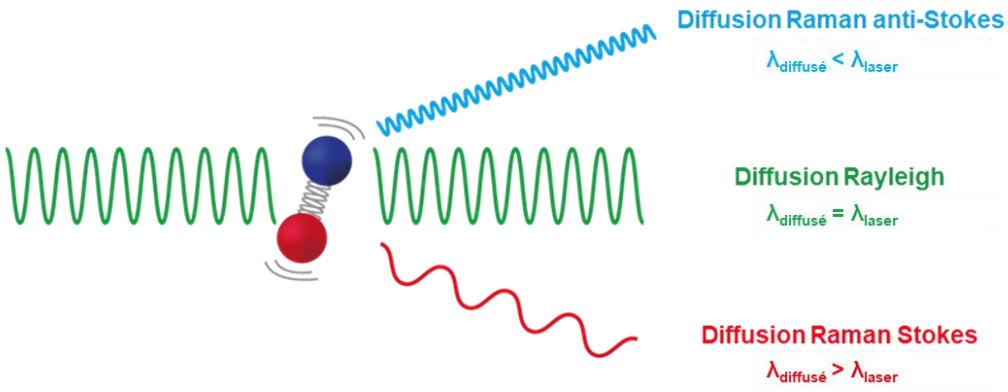


Figure 15: Phénomènes de diffusion de la lumière

Le gain ou la perte d'énergie des photons inélastiques émis par rapport aux photons incidents est traduit sur les spectres Raman par un déplacement en fréquence. Les bandes Raman observées à un déplacement en fréquence donné ($\nu_0 - \nu_{inelast}$) correspond à l'écart en énergie entre les niveaux vibrationnels de la molécule analysée. Le spectre est symétrique par rapport à la fréquence nulle (ν_0-ν_0) correspondant à la bande Rayleigh, les écarts positifs étant représentatifs de la diffusion Stockes et les écarts négatifs de la diffusion anti-Stockes. La diffusion anti-Stockes étant largement minoritaire, on s'intéresse plus particulièrement à la partie Stockes du spectre Raman, présentant des bandes beaucoup plus intenses (Marzi et al., 2017). Les fréquences de ces bandes sont attribuées à des modes vibrationnels au moyen de tables d'attribution.

La position d'un pic de diffusion Raman renseigne donc sur la nature de la liaison chimique du matériau. Elle est caractéristique de l'énergie de vibration du mode de la liaison associée. L'énergie de vibration dépend

de la masse des atomes de la liaison mise en jeu et de la force de liaison. Par conséquent, l'intensité d'un pic de diffusion Raman est proportionnelle à la concentration de l'espèce chimique sondée. Ce qui signifie que la quantité d'un composé spécifique peut être estimée par spectroscopie Raman.

2.2. Imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR)

L'imagerie « point par point » permet de reconstruire une image de l'échantillon en déplaçant la platine porte-échantillon par incréments réguliers. Chaque point correspond à un spectre acquis. Il s'agit d'une carte à deux dimensions (2 dimensions spatiales et une dimension spectrale). Le tracé d'un tel jeu de données se fait le plus souvent en visualisant un paramètre extrait de la cartographie (une intensité, un ratio, etc.). Une multitude de paramètres peut ainsi être imagée à partir d'une seule acquisition d'image spectrale.

De manière générale, on parlera d'imagerie hyperspectrale dans le cas où, à chaque point de l'image, l'on enregistre un spectre constitué de nombreux nombres d'ondes consécutifs. L'imagerie hyperspectrale permet généralement en premier lieu de reconnaître dans chaque spectre individuel la « signature » des composants qui forment l'objet, c'est-à-dire de les identifier. On pourra de plus non seulement identifier les différents constituants, mais également dans certains cas en déterminer les concentrations, en ajoutant ainsi une dimension quantitative à la cartographie. Il est enfin également possible de mesurer certaines des propriétés physico-chimiques par l'analyse de leurs caractéristiques spectrales fines (position de la bande, faibles décalages des bandes par rapport à une référence, variation de largeur à mi-hauteur, intensité de la bande, …).

Cette technique de spectroscopie a pour avantages principaux l'absence de préparation particulière de l'échantillon, qu'il soit solide, liquide ou gazeux, et le caractère non destructif et non invasif de l'analyse, qui peut être réalisée *in situ* voire *in vivo*. La présence d'eau dans l'échantillon n'est pas un obstacle à la réalisation de l'analyse ou à l'interprétation des résultats. En revanche, l'analyse peut être gênée par la fluorescence de l'échantillon et des précautions doivent être prises pour éviter la décomposition de ce dernier sous l'influence du rayonnement laser.

3. Analyse semi-quantitative de la distribution d'un actif nanoencapsulé dans un film mince par Imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR)

Des NanoPHE fraîchement préparées ont été inclus dans deux types de films : 1) un film dit simple à base de PVA (Munnier et al., 2020) et 2) un film plus complexe composé de PVA, Glycérol (humectant/plastifiant) et Sépicide™ HB (conservateur). Le film complexe sera nommé : film PVA-GS. La technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) a été utilisée pour étudier la distribution du PHE encapsulé dans

les films ainsi que pour réaliser une analyse semi-quantitative de l'actif. La Figure 16 représente de manière schématique les étapes suivies, de la formation du film à son analyse Raman.

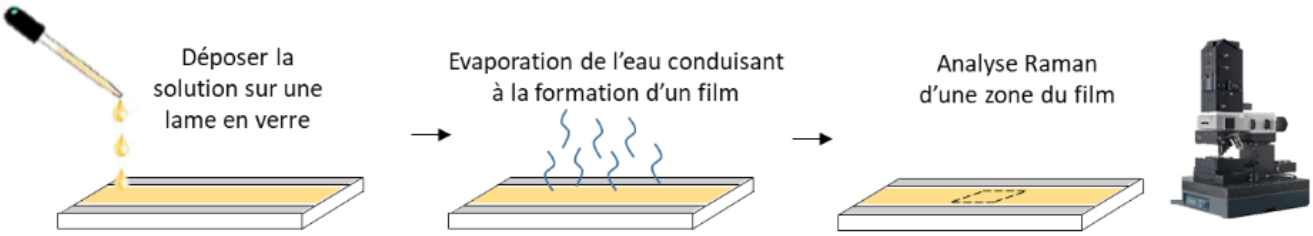


Figure 16: De la formation du film à son analyse Raman

Peu importe le type de film, il a été montré une distribution homogène de l'actif hydrophobe PHE encapsulé dans les films. La composition des films PVA-GS se rapprochant davantage d'un produit cosmétique fini, nous allons présenter dans l'article qui suit les résultats obtenus pour ce type de film.

Article 3 : "Confocal Raman spectroscopic imaging for evaluation of distribution of nano-formulated hydrophobic active cosmetic ingredients in hydrophilic films"

Louise Van Gheluwe [1], Hichem Kichou [1], Kamilia Kemel [1], Frédéric Mahut [2], Marylène Vayer [2], Christophe Sinturel [2], Hugh J. Byrne [3], Florent Yvergnaux [4], Igor Chourpa [1], Emilie Munnier [1], Franck Bonnier [1,*]

[1] EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Université de Tours, Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge, 37200 Tours, France
[2] UMR CNRS 7374 - Université d'Orléans ICMN, Orléans
[3] FOCAS Research Institute, TU Dublin, City Campus, Kevin Street, Dublin 8, Ireland
[4] Bioeurope, Route d'Oulins, Anet, France

Molecules 2021, 26 (24), 7440. https://doi.org/10.3390/molecules26247440

molecules

MDPI

Article

Confocal Raman Spectroscopic Imaging for Evaluation of Distribution of Nano-Formulated Hydrophobic Active Cosmetic Ingredients in Hydrophilic Films

Louise Van Gheluwe [1], Emilie Munnier [1], Hichem Kichou [1], Kamilia Kemel [1], Frédéric Mahut [2], Marylène Vayer [2], Christophe Sinturel [2], Hugh J. Byrne [3], Florent Yvergnaux [4], Igor Chourpa [1] and Franck Bonnier [1,*]

[1] EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes, Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 Avenue Monge, 37200 Tours, France; louise.vangheluwe@univ-tours.fr (L.V.G.); emilie.munnier@univ-tours.fr (E.M.); hichem.kichou@univ-tours.fr (H.K.); kami.kemel@gmail.com (K.K.); igor.chourpa@univ-tours.fr (I.C.)
[2] UMR CNRS 7374-Université d'Orléans ICMN, 45071 Orléans, France; frederic.mahut@c2n.upsaclay.fr (F.M.); marylene.vayer@univ-orleans.fr (M.V.); christophe.sinturel@univ-orleans.fr (C.S.)
[3] FOCAS Research Institute, TU Dublin, City Campus, Kevin Street, Dublin 8, Ireland; hugh.byrne@tudublin.ie
[4] Bioeurope, Route d'Oulins, 28260 Anet, France; florent.yvergnaux@solabia.fr
* Correspondence: franck.bonnier@univ-tours.fr

Abstract: Film-forming systems are highly relevant to the topical administration of active ingredients (AI) to the body. Enhanced contact with the skin can increase the efficacy of delivery and penetration during prolonged exposure. However, after the evaporation of volatile solvents to form a thin film, the distribution of the ingredient should remain homogenous in order to ensure the effectiveness of the formula. This is especially critical for the use of hydrophobic molecules that have poor solubility in hydrophilic films. In order to address this concern, hydroxyphenethyl esters (PHE) of *Punica granatum* seed oil were prepared as a nanosuspension stabilised by poloxamers (NanoPHE). NanoPHE was then added to a formulation containing polyvinyl alcohol (PVA) as a film forming agent, Glycerol as a plasticiser and an antimicrobial agent, Sepicide^{TM} HB. Despite their reliability, reference methods such as high-performance liquid chromatography are increasingly challenged due to the need for consumables and solvents, which is contrary to current concerns about green industry in the cosmetics field. Moreover, such methods fail to provide spatially resolved chemical information. In order to investigate the distribution of ingredients in the dried film, Confocal Raman imaging (CRI) coupled to Non-negatively Constrained Least Squares (NCLS) analysis was used. The reconstructed heat maps from a range of films containing systematically varying PHE concentrations highlighted the changes in spectral contribution from each of the ingredients. First, using NCLS scores it was demonstrated that the distributions of PVA, Glycerol, Sepicide^{TM} HB and PHE were homogenous, with respective relative standard deviations (RSD) of 3.33%, 2.48%, 2.72% and 6.27%. Second, the respective relationships between ingredient concentrations in the films and their Raman responses, and the spectral abundance were established. Finally, a model for absolute quantification for PHE was be constructed using the percentage of spectral abundance. The prepared %w/w concentrations regressed against predicted %w/w concentrations, displaying high correlation (R^2 = 0.995), while the Root Mean Squared Error (0.0869% w/w PHE) confirmed the precision of the analysis. The mean percent relative error of 3.75% indicates the accuracy to which the concentration in dried films could be determined, further supporting the suitability of CRI for analysis of composite solid film matrix. Ultimately, it was demonstrated that nanoformulation of hydrophobic PHE provides homogenous distribution in PVA based film-forming systems independent of the concentration of NanoPHE used in the formula.

Keywords: active cosmetic ingredients; nanosuspension; polyvinyl alcohol; film; confocal Raman imaging; multivariate analysis; quantitative analysis

check for updates

Citation: Van Gheluwe, L.; Munnier, E.; Kichou, H.; Kemel, K.; Mahut, F.; Vayer, M.; Sinturel, C.; Byrne, H.J.; Yvergnaux, F.; Chourpa, I.; et al. Confocal Raman Spectroscopic Imaging for Evaluation of Distribution of Nano-Formulated Hydrophobic Active Cosmetic Ingredients in Hydrophilic Films. *Molecules* **2021**, *26*, 7440. https://doi.org/10.3390/molecules26247440

Academic Editors: Andrzej Grzechnik and Maria Paula Marques

Received: 4 November 2021
Accepted: 3 December 2021
Published: 8 December 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The effectiveness of a topical product depends on the physicochemical properties of the active substances and on the capacity of the formula to maintain close contact with the skin for prolonged exposure, enabling the diffusion of the molecules in or through the skin. Topical film-forming systems are increasingly studied for drug delivery because they adhere to the skin, forming a thin transparent film in situ and providing delivery of the active ingredients (AI) to the body tissue [1–3]. A cosmetic film-forming system contains three types of components: the active ingredient(s), the excipients (film-forming polymer, plasticizers or additives), and volatile solvent(s) [4] that evaporate upon contact with the skin to form the film.

In 1998, ethyl cellulose (EC) and polyvinyl pyrrolidone (PVP) were used as film formers to develop transdermal drug delivery systems [5]. Since then, various polymers with potential film-forming properties including acrylates polymers (e.g., Eudragit® polymers, Demacryl®), cellulose derivatives (Klucel®), vinyl polymers (e.g., Kollidon®, Polyvinyl alcohol (PVA)), chitosan, starch, and silicones have been studied in this context [6–10]. Plasticisers can be added to formulations to render them appropriately flexible for use on the skin and to increase drug diffusion [7]. Additionally, some chemical enhancers can be added to polymeric film formulations in order to improve the skin penetration of active ingredients [11].

The resulting film should form a homogenous reservoir of the active ingredient on the skin. It has been reported in the literature that only drugs in molecular (as opposed to solid) form in the residual film can diffuse [4]. During the film-forming process, the evaporation of volatile components can change the characteristics of the formulation and even produce drug precipitation on the skin surface (so called vehicle metamorphosis [12]). This phenomenon is particularly observed for hydrophobic AI dispersed in a hydrophilic film. To prevent the precipitation of AI, effective precipitation inhibitors [13] can be added to the mixture, or the hydrophobic AI can be encapsulated [14].

Physicochemical characterisation of newly developed products can be a pivotal step in optimising and refine formulae to reach the desired texture and sensorial properties without loss of efficacy. Commonly, topical films are characterised in terms of their morphology and mechanical properties. For example, surface texture (smooth or rough) of the film can be observed using light microscopy, scanning electron microscopy (SEM) [15–18] and atomic force microscopy (AFM) [19–21]. Analytical control to confirm the concentration of ingredients in films can be performed with gold standard techniques such as high-performance liquid chromatography (HPLC) [17]. However, to determine the content of an AI, fastidious extraction protocols need to be applied prior to analysis. Firstly, such approaches fail to deliver spatially resolved information about AI distribution in the films. Secondly, there is an increasingly high demand from the cosmetic industry for greener methods that are environmentally responsible, and hence alternatives with lower requirements of consumables and solvents are sought.

Vibrational spectroscopy, i.e., infrared absorption and Raman scattering spectroscopy, is a non-destructive, label-free and reagent (solvent)-free technique that provides molecular fingerprints, enabling the chemical composition of samples to be probed. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) has also been used for the characterisation of films [1,15] and or to identify the molecular interactions between active ingredients and the other constituent components of films [16,19]. Use of Raman spectroscopy has been reported for study the composition of various thin polymer films [14,20,21]. Most studies have relied on point measurements [1,15,19–21], whereas coupling the molecular specificity of the analysis with the micrometric spatial resolution of Raman confocal microscope offers a powerful non-destructive tool to study the local distribution of AI in cosmetic films. Confocal Raman Imaging (CRI) has been extensively studied in, for example, the sub-cellular analysis of single cells to investigate physiological processes [22] or the internalization of anticancer drugs [23] and nanoparticles [24] as well as the cartography of tissue sections from different organs for diagnostic purposes [25], monitoring AI penetration into the skin [26] and

the analysis of solid forms such as pharmaceutical tablets for quality control [27] and identifying counterfeits [28].

More recently, a study using Raman cartography highlighted that hydrophobic compounds from *Punica granatum* seed oil hydroxyphenethyl esters (PHE) stabilised in a poloxamer-based nanosystem showed very homogeneous distribution in hydrophilic PVA films compared to the free form introduced as an ethanol solution [14]. While quantitative analysis of AI concentrations in cosmetic and pharmaceutical products using Raman spectroscopy is increasingly documented for solutions and semi-solids forms (gels, cream) [29–31], application of the technique to solid complex mixtures remains largely limited to semi-quantitative analysis [32–34].

In the current study, Raman spectroscopy coupled with Non-negatively Constrained Least Squares (NCLS) analysis is used to deliver reconstructed chemical maps to evaluate not only the distribution but also the constituent chemical content of nanoformulated *Punica granatum* seed oil hydroxyphenethyl esters (NanoPHE) in thin hydrophilic PVA films containing Glycerol as a plasticiser along with an antimicrobial agent. Increasing concentrations of NanoPHE were incorporated in PVA-based films to study the homogeneity of the AI distribution and evaluate the compatibility of the formula with a broad range of concentrations. Moreover, achieving quantification of the ingredients using Confocal Raman Imaging (CRI) is addressed, while the technique is proposed as a non-destructive and reagent-free approach that can support the shift towards green chemistry and environmentally responsible industrial processes in the cosmetic field.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters (PHE), commercialized as Delipidol®, were kindly provided by BioEurope (Solabia group, Anet, France). Pluronic® F127 was kindly provided by BASF (Levallois-Perret, France). Polyvinyl alcohol (Mw: 31,000–50,000 g/mol, 87–89% hydrolysed) (PVA), Vitamin E (VitE) and dimethyl carbonate (DMC) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Glycerol was purchased from Cooper® (Melun, France) and Sepicide™ HB from SEPPIC® (La garenne-Colombes, France). Sepicide™ HB is a mixture of phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben, henceforth referred as AMA (for AntiMicrobial Agent) in the text. Ultrapure water was obtained with a MilliQ system (Millipore, Molsheim, France).

2.2. Methods

2.2.1. Sample Preparation

Nanoformulation of PHE (NanoPHE: NanoPHE were prepared by a green emulsion–solvent evaporation process assisted by ultrasound, as described in a previous study [14]. Briefly, the aqueous phase was prepared by dissolving 600 mg of Pluronic® F127 in 10.5 g of ultrapure water. The organic phase was prepared by dissolving 1225 mg of DL and 80 mg of Vitamin E in 2.70 g of dimethyl carbonate. The nanoemulsion was obtained by sonicating the mixture during 2 min in a glass rosette cell (20 kHz, amplitude 30%, Vibracell 75041-Sonics). The organic solvent was evaporated (60 mbar 1 h, 25 °C, LABOROTA 40001-Heidolph) to obtain nanodispersion (NanoPHE). The volume of the preparation was adjusted to 20 mL with ultrapure water to ensure the reproducibility of the concentration.

Characterisation of NanoPHE: The hydrodynamic diameter (D_H) and polydispersity index (PdI) of NanoPHE were measured at 25 °C using a dynamic light scattering (DLS) instrument (NanoZS, Malvern Instruments, Orsay, France) piloted by Zetasizer Software (zetasizer software.ink, version 7.10, Malvern panalytical, Worcester, UK). Each sample was diluted 1:10 in ultrapure water, then measured using a 633 nm laser with a detection angle of 173°. NanoPHE zeta potential was measured at the same dilution and with the same equipment, with a detection angle of 13°. All measurements were carried out in triplicate.

PVA-GS NanoPHE-loaded film preparation: Six different film-forming solutions were prepared within a constant matrix: PVA, Glycerol and AMA (abbreviated as PVA-GS),

with different concentration of NanoPHE (abbreviated as C0, C1, C2, C3, C4, and C5). Figure 1 shows the chemical formulae of these compounds.

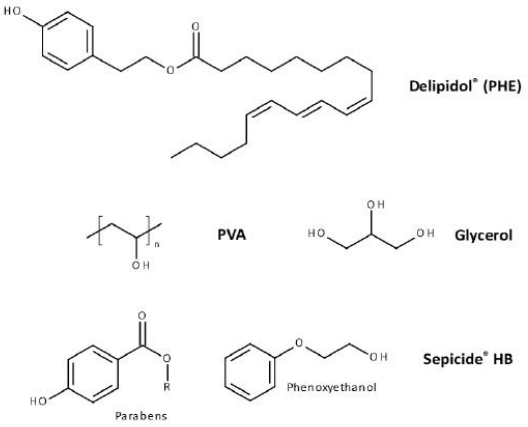


Figure 1. Main components for the preparation of PVA-GS films.

PVA solution was prepared under heating (90 °C) and vigorous stirring until complete dissolution in ultrapure water (approximately 4 h), then cooled to room temperature. In order to avoid potential degradation of other components, PVA solutions were prepared upstream, then Glycerol, AMA, and NanoPHE were added. Glycerol and AMA were first added to the PVA solution and stirred for 20 min; finally, the NanoPHE suspension was added and stirred for 30 min before film preparation.

For each sample, 10 g of the final film-forming solution was prepared (Table 1). The initial PVA solution was adjusted for C0–C5 to keep the final concentration at ~10% *w*/*w*. Glycerol and AMA had respective final concentrations of ~10% *w*/*w* and 1% *w*/*w*. NanoPHE concentration ranged from 1.15% *w*/*w* (C1) to 10.218% *w*/*w* (C5). The final nominal concentration (%*w*/*w*) for each component in the dried films is provided in Table 2.

Table 1. Quantity of PVA solution, Glycerol, AMA, and NanoPHE for the preparation of film-forming solutions with a range of five concentrations of NanoPHE.

N°	PVA Solution (g)	Glycerol (g)	AMA (g)	NanoPHE (g)
C0	8.8065	1.0572	0.1006	- (0.1162 g of water)
C1	8.80850	1.0140	0.1027	0.11500
C2	8.65000	0.9957	0.1023	0.26190
C3	8.40000	1.0020	0.1010	0.53590
C4	8.15000	1.0147	0.1017	0.74240
C5	7.89930	1.0031	0.1020	1.02180

Films were prepared on Superfrost® histological glass slides (ThermoScientific, Waltham, MA, USA; Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) by scraping the solution between four adhesive tapes used to form a rectangular shaped mould. Another clean glass slide was used to spread the sample over the entire length of the substrate, leaving a liquid film with a constant thickness. Samples were left to air-dry overnight in darkness. Films for each concentration were prepared in triplicate and identified as R1, R2 and R3.

Table 2. Concentration of PHE, PVA, Glycerol and AMA in dried film (%*w*/*w*).

N°	Nominal % of PHE (*w*/*w*)	Nominal % of PVA (*w*/*w*)	Nominal % of Glycerol (*w*/*w*)	Nominal % of AMA (*w*/*w*)
C0	0	46.3	48.96	4.7
C1	0.333	47.2	47.5	4.8
C2	0.761	47.1	46.9	4.8
C3	1.53	46.5	46.5	4.7
C4	2.09	45.7	46.4	4.6
C5	2.86	45.5	45.5	4.6

2.2.2. Confocal Raman Imaging

Acquisition: Raman images were acquired using an Alpha 300 R microspectrometer (WITec, Ulm, Germany). Spectral data were recorded using a 532 nm excitation laser source with a power of 20 mW at the sample. The instrument is calibrated daily using a two-step procedure. First, the TrueCal function of Project 5 (WITec, Ulm, Germany) was used; this is an automatic multipoint calibration routine performed with a Mercury-Argon (HgAr) light source integrated in the Raman microscope. Second, prior to data acquisition, verification was done using the peak at 520.7 cm^{-1} from a silicon substrate. The laser was focused onto the sample through a 50× objective (Zeiss, LD Epiplan HD, N.A. 0.5). Backscattered light was detected by dispersing Raman-shifted radiation onto a Deep Depletion CCD detector (1024 × 128 pixels) using a 600 lines/mm grating centred at 2500 cm^{-1}, resulting in a spectral resolution of ≈4 cm^{-1}. The acquisition time was set to 10 s, with two accumulations. 100 × 100 μm^2 Raman maps were recorded with an X and Y lateral step size of 4 µm (corresponding to 625 spectra). For each concentration and condition, three separate films were prepared (R1, R2, R3), and the measurements were performed once for each sample. Additionally, reference Raman spectra were recorded for all constituent compounds of the films.

Data handling: Raman maps were pre-processed and analysed using Matlab® (Mathworks, Portola Valley, CA, USA). Spectra were cut in the range 300 to 1800 cm^{-1} and then subjected to offset correction followed by vector normalisation.

Principal Components Analysis (PCA): PCA is a multivariate analysis technique that is widely used to simplify a complex data set of multiple dimensions. It permits a reduction in the number of variables in a multidimensional data set while retaining most of the variation within the data set. The other advantage of this method is the derivation of component (PC) loadings, which represent the variance of each variable (wavenumber) for a given PC. Analysis of the loading vector of a PC can provide information about the source of the variability inside a data set derived from variations in the chemical components contributing to the spectra [26].

Non-negatively Constrained Least Squares analysis (NCLS): NCLS is a method for the unmixing of spectral data described by Kwan et al. [35]. The NCLS algorithm calculates the signal contribution of the molecule of interest in each experimental Raman spectrum collected from the sample based on a set of reference spectra. A simplified description of the NCLS outcome can be defined as Equation (1):

$$S_S = (F_1 \times S_{R1}) + (F_2 \times S_{R2}) + + (F_i \times S_{Ri}) + R \quad (1)$$

where S_S—simulated spectrum for a given pixel of the Raman map, S_{Ri}—reference spectra, F_i—abundance fraction estimated, i—number of reference spectra included in the model and R—the residual. The algorithm aims to calculate an S_S which is as close as possible to the experiential spectrum, with minimal residual.

The NCLS algorithm requires reference spectra in order to calculate the relative spectral contributions of each compound for every pixel of the Raman map. Calculation

cannot be performed with a single reference spectrum [26], and it has been demonstrated by Miloudi et al. that increasing the number of replicates for a given reference compound significantly increases the reliability of the outcome [26]. Therefore, for each component (free or encapsulated PHE, Vitamin E, Pluronic® F127, Glycerol, and AMA), ten spectra were used in the NCLS. Concerning the PVA, a control film containing only the polymer was prepared and a total of 1875 reference spectra were collected and used in the NCLS. For clarity, the results are presented as the mean contribution of each compound, calculated from the n replicates of reference spectra.

First, the results were presented as reconstructed heat maps, with a scale bar ranging from blue (low concentration) to red (high concentration) reflecting the spectral contribution calculated from reference spectra, as determined by NCLS fitting. Individual maps were therefore obtained for each individual reference compound used for the NCLS calculations. The obtained NCLS score corresponds to the spectral abundance fraction of a given ingredient, and it is between 0 and 1. A value of 1 is equal to 100% of the reference spectrum used in the calculation.

Second, NCLS results were expressed as the percentage of spectral abundance. The contribution F of a given compound was normalised to 1 by dividing its score obtained by NCLS by the sum of the scores of all references used, then multiplied by 100, as follows:

$$\%\ \text{spectral abundance of X in film C}_n = \frac{F_x}{(F_1 + F_2 + \cdots + F_i)} \times 100 \quad (2)$$

where X—PVA, Glycerol, AMA or PHE, C*n*—the concentration of NanoPHE in the film, *n*—the number of concentrations tested (from 0 to 5), F—the spectral abundance fraction estimated from NCLS, i—the number of reference compounds included in the model. The spectral abundance was then used to construct linear regression plots.

It should be noted, however, that while the terms spectral abundance and percent spectral abundance are used in the description above, each constituent compound has a different Raman cross-section, and therefore can contribute more or less strongly to the Raman spectrum of the film. The percentage-based spectral maps thus provide a semi-quantitative representation of the relative contributions, but do not directly correspond to the actual percentages of the concentrations.

Thirdly, in an effort to take the final step towards full quantification, a calibration model for PHE is constructed using the percentage of spectral abundance as a function of *%w/w* PHE in dried films. The results for maps R1 of each concentration (C0 to C5) were used as data points for the calibration curve, then the percentages of spectral abundances calculated from the maps R2 and R3 were projected in the model as unknown samples to be determined. A linear regression of the predicted concentration against the prepared concentrations resulted, with the linearity (coefficient of determination-R^2) and Root Mean Square Error (RMSE) used as criteria of the model's reliability, with RMSE defined as follows:

$$\text{RMSE} = \sqrt{\sum_{i=1}^{n} \frac{(\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad (3)$$

where *n*—number of observations, y_i—observed values, and $\hat{y}_i$—predicted values.

3. Results and Discussion

3.1. Preparation and Characterisation of NanoPHE

Pluronic® F127 is a non-ionic amphiphilic triblock polymer, poly(ethylene oxide)$_{101}$–poly(propylene oxide)$_{56}$–poly(ethylene oxide)$_{101}$. Composed of two hydrophilic blocks (polyethylene oxide, PEO) and one hydrophobic (polypropylene oxide, PPO), the micellar organisation of Pluronic F127 in aqueous solution induces a core-shell nanostructure. In this study, the hydrophobic active ingredient PHE has been housed in the polypropylene oxide hydrophobic core, producing NanoPHE structures.

The nanoformulation size was characterized by DLS. NanoPHE aqueous suspensions typically displayed hydrodynamic diameter values of 126.3 ± 1.0 nm and exhibited low PdI values (0.107 ± 0.002), indicative of the monodispersity of the suspension. The zeta potential was slightly negative. Electrostatic repulsion of the particles was not an issue, as the colloidal stability was expected to be ensured by the steric hindrance of the PEO chains of Pluronic® F127, stabilising the system [36].

The properties of NanoPHE were similar to those previously reported, highlighting the reproducibility of the protocols [14]. These nanostructures, with a D_H close to 120 nm, can be considered as suitable for skin administration [37].

3.2. Spectral Characterisation of NanoPHE

The Raman spectrum of PHE (Figure 2A) exhibits two strong features, at 1636 cm^{-1}, corresponding to C=C stretching, and at 1169 cm^{-1}, corresponding to C-C and C-O stretching. Other bands in the range of 800 cm^{-1}–1450 cm^{-1} display lower intensities, but can still be easily observed in the enlarged inset of Figure 2. The corresponding vibrational mode assignments are listed in Table 3.

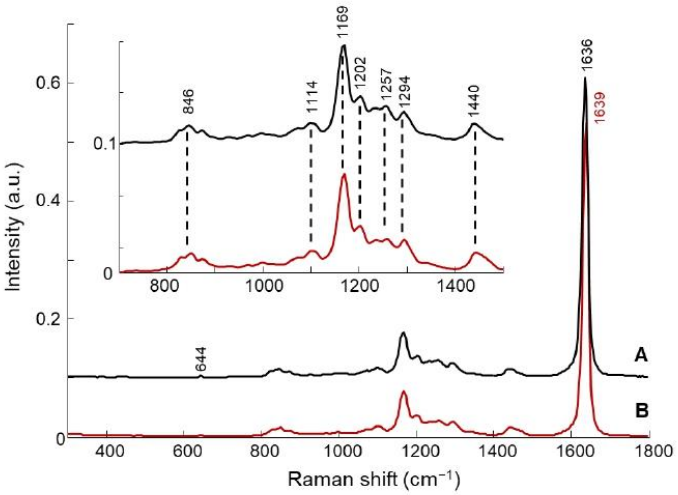


Figure 2. Typical Raman spectra of free PHE (**A**) and nanoformulated PHE (NanoPHE, **B**). Spectra are offset for clarity.

Table 3. Raman shift assignments for PHE spectrum.

Raman Shift (cm^{-1})	Shift Assignments
1636–1639	C=C stretching
1440	CH_2 scissoring, asymmetric CH_3 bending
1294	C-OH (enol group) bending, C-C-H bending (aromatic ring), CH_2 twisting
1257	C-C stretching, =CH bending
1202	C-C stretching
1169	C-O stretching, C-C stretching
1114	C-O stretching, C-C stretching
846	C-C stretching

The Raman spectrum of NanoPHE (Figure 2B) is similar to that of pure PHE, with a significant band shift in the C=C stretching of PHE from 1636 cm^{-1} to 1639 cm^{-1}, explained by molecular interaction with other components from the shell or the core of the nanosystem. The other features do not appear to be modified by the nanoformulation.

The PCA scatter plot in Figure 3A shows a clear separation along Principal Component 1 (PC-1) (94% of the total explained variance) between the data corresponding to PHE spectra (black dots) and NanoPHE spectra (red dots). The loading plot corresponding to PC-1 (Figure 3(Ba)) shows that the main features driving the discrimination between PHE and NanoPHE are the 1636–1639 cm^{-1} peaks, corresponding to C=C stretching of the aromatic ring of PHE.

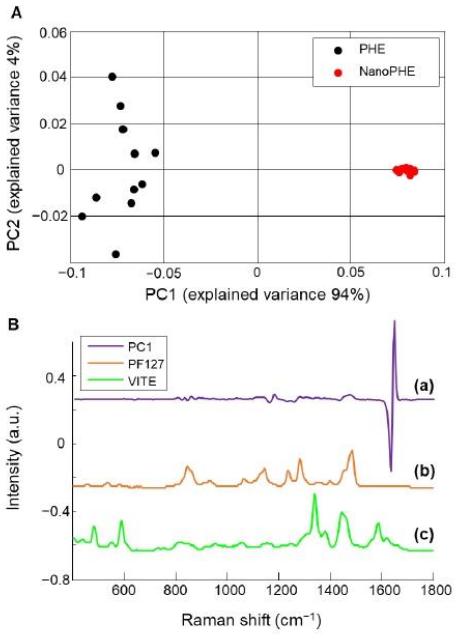


Figure 3. (**A**): PCA Scatter plot from reference spectra of free (black) or NanoPHE (red). (**B**): Loading 1 from the PCA (**a**) compared to the reference spectra of Pluronic® F127 (**b**) and vitamin E (**c**). Spectra are offset for clarity.

However, there is no clear evidence that the Pluronic® F127 (Figure 3(Bb)) found in the shell of nanosystems or the VitE (Figure 3(Bc)) present in the core mixed with PHE contributed significantly to the collected spectral signature. The main features of Pluronic® F127 [38] (Figure 3(Bb)), observed at 844–860 cm^{-1} (methylene and methyl rocking), 1144 cm^{-1} (C-C and C-O stretching modes), 1380 cm^{-1} (CH_3 twisting) and 1450 cm^{-1} (CH_2 scissoring), do not appear in the PC1 loading. Similarly, the bands specific to VitE [39,40] (Figure 3(Bc)) at 490 cm^{-1} (ring structure), 591 cm^{-1} (O-H out of plane bending), 1340 cm^{-1} (CH_2 twisting), 1450 cm^{-1} (CH_2 scissoring), 1582 cm^{-1} (C=C stretching aromatic ring) and 1615 cm^{-1} (C=C stretching aromatic ring) are not observed.

3.3. Spectral Characterisation of PVA-GS-NanoPHE Films

3.3.1. Reference Compounds

Reference Raman spectra of NanoPHE, PVA, Glycerol and AMA were recorded to identify the characteristic vibrational bands of the molecules (Figure 4).

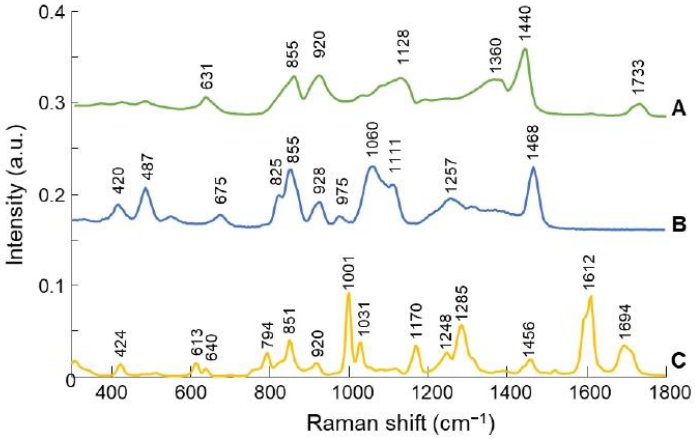


Figure 4. Raman spectra of other main compounds of PVA-GS-NanoPHE films: (**A**) control PVA film, (**B**) Glycerol, and (**C**) AMA. Spectra are offset for clarity.

The main spectral features of PVA (Figure 4A) occur at 855 cm^{-1} (C-C stretching), 920 cm^{-1} (C-C stretching), 1128 cm^{-1} (C-O stretching, O-H bending), 1360 cm^{-1} (C-H and O-H bending), and 1440 cm^{-1} (C-H and O-H bending) [41]. The Raman spectrum of Glycerol (Figure 4B), in the 1000–1500 cm^{-1} spectral region, contains two broad bands that encompass modes due to CCO stretching, CH_2 twisting, and COH stretching vibrations of the primary -H groups. The bands at 1060 and 1111 cm^{-1} are assigned to the symmetric stretching mode of the primary and secondary -OH groups, respectively. The bands in the 1207–1310 cm^{-1} spectral region and the band at 1468 cm^{-1} are assigned to CH_2 twisting [42].

The Raman spectrum of AMA (Figure 4C) contains an intense Raman line at 1001 cm^{-1}, corresponding to the aromatic ring of its components, phenoxyethanol and parabens [43,44]. Further intense features were observed at 1285 cm^{-1} (CH_2 twisting, C-H (ring) bends, and aromatic ring deformation of phenoxyethanol), 1612 cm^{-1} (C-H (ring) bends and aromatic ring deformation of phenoxyethanol) and 1694 cm^{-1} (C=O stretching of parabens) [43,44].

3.3.2. PVA-GS-NanoPHE Films

Each pixel from a Raman map contains a full spectrum resulting from the combined contribution of all constituents. Figure 5 displays the mean spectra obtained from PVA-GS-NanoPHE films with increasing concentrations of NanoPHE (C0 to C5).

The mean spectrum of C0 exhibits the spectral features of the films formed from the mixture without NanoPHE. The signature is mainly due to the combined contribution of PVA and Glycerol, most of whose peaks overlap, for example in the spectral ranges 825–855 cm^{-1}, 920–928 cm^{-1}, 1060–1128 cm^{-1}, and 1440–1468 cm^{-1}. The contribution from AMA is limited to the 1001 cm^{-1} and 1612 cm^{-1} features.

The emergence of the strong PHE feature at 1639 cm^{-1} as a function of NanoPHE concentrations added to the films is particularly noticeable (Figure 5, C1–C5). At first, the PHE band appears as a separate band beside features from AMA (Figure 5, C1 and C2) but for higher concentrations, the dominance of the PHE band results in a merging with the weaker AMA features (Figure 5, C3, C4 and C5). Over the range of 300–1500 cm^{-1}, the spectral variations linked to PHE are not as obvious. However, PCA performed in the 700 and 1500 cm^{-1} region leads to a clear separation of data clustered as a function of PHE concentrations along the principal component 1 axis (PC1, 68.5% of the total explained variance) (Figure 6A).

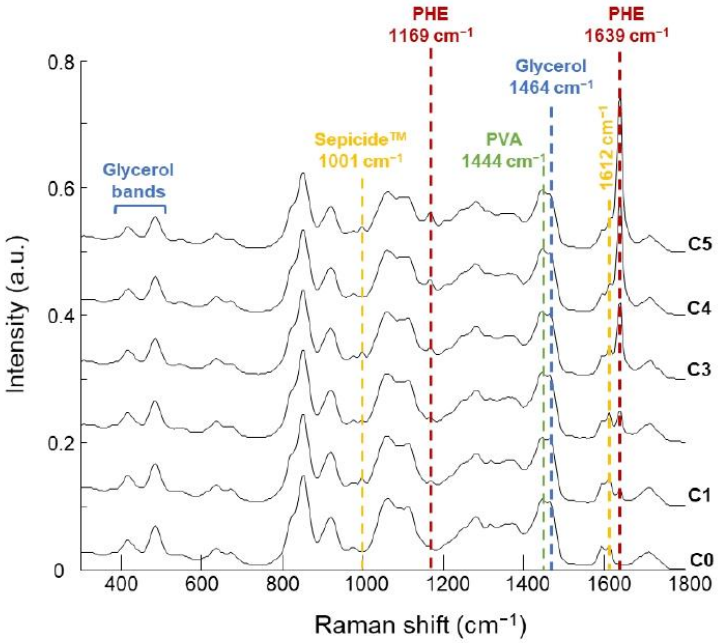


Figure 5. Mean Raman spectra of PVA-GS films loaded with increasing concentration (from C0 to C5) of NanoPHE. Spectra offset for clarity. Dotted line highlights most relevant features of PVA (green), Glycerol (blue), AMA (yellow), and PHE (red).

Interestingly, the loading plot (Figure 6(Bb)) highlights spectral differences matching features specific to PHE (Figure 6(Ba)), which are negative, consistent with the increasing PHE concentration (Figure 6A). The negative peak at 1001 cm^{-1} cannot be assigned to PHE but indicates the contributions of AMA (See Figure 5) to the composite spectrum. Positive peaks between 800–950 cm^{-1} are PVA- and Glycerol-related. It can be observed on the scatter plot that PC 2 accounts for 20% of the explained variance. The PC 2 loading vector is presented in Figure 6(Bc). There is no evidence of any positive or negative features linked to PHE. However, the positive peak around 800 cm^{-1} and the sharp positive band at ~1000 cm^{-1} can be assigned to AMA (Figure 4C). The other bands are mixed contributions from PVA and glycerol (Figure 4A,B).

PCA provides clear evidence that, in the data collected from films, the PHE contribution is not limited to the most intense feature at 1639 cm^{-1}, but that the presence of the AI at different concentrations is identifiable across the full spectrum. Spectral unmixing approaches like NCLS can be performed using the full range, and the fit can be improved when multiple features from reference spectra of each compound can be identified in the film spectra.

3.4. Distribution and Content of PHE in PVA-GS-Based Films

Figure 7 presents reconstructed false colour maps obtained from NCLS analysis applied to the first replicate (R1) of each PVA-GS film prepared for each concentration (C0 to C5). Rows represent the NCLS scores (spectral abundance fractions) calculated for PHE, PVA, Glycerol and AMA. A score equal to zero indicates no contribution for a given compound, while 1 corresponds to 100%, i.e., a spectrum from the map matching 100% with a pure spectrum from a reference. None of the images displayed NCLS scores higher than ~0.5–0.6, and therefore intensities are displayed between 0 and 0.7 for clarity and to help direct comparison of the reconstructed heat maps.

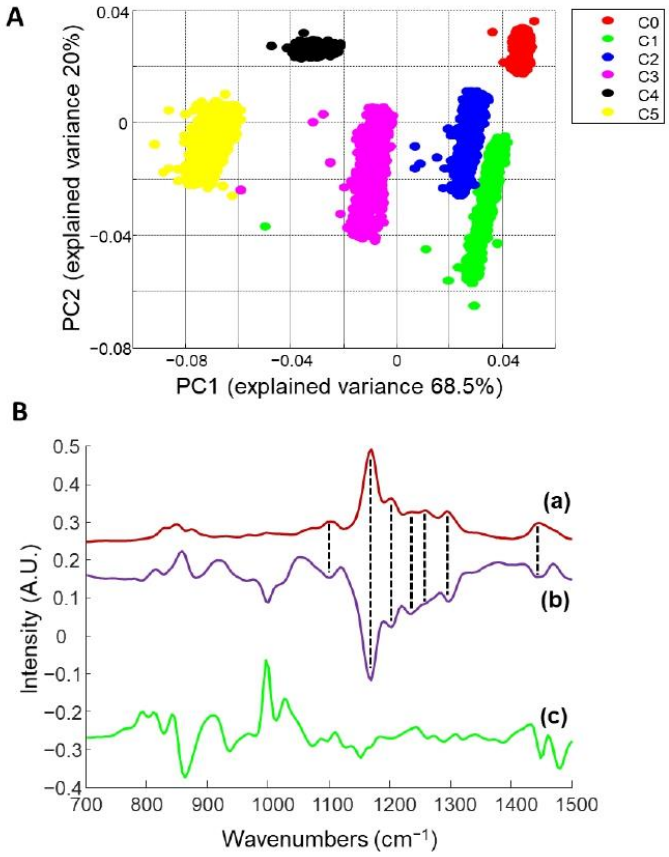


Figure 6. (**A**): Scatter plot from principal component analysis (PCA) performed on PVA-GS films with increasing NanoPHE concentrations (C0: red, C1: green, C2: blue, 3: pink, C4: black, and C5: yellow). (**B**): Loading 1 (**b**) and Loading 2 (**c**) of the PCA (**b**) compared to the reference spectra of NanoPHE (**a**). Spectra are offset for clarity.

For C0, the NCLS analysis of Figure 7 correctly returns a 0% contribution for PHE, while the PVA, Glycerol, and AMA contributions are ~0.42, 0.53 and 0.10, respectively. The initial NCLS score for PHE for C0 (0.000394) is of great importance to verify that the model constructed using NCLS is reliable. It demonstrates there is no false positive, hence no overestimation in the determination of PHE in the films containing 0%. As previously discussed by Miloudi et al., the number of reference spectra used plays a key role in the specificity of the NCLS [26]. Notably, it is important that the reference spectra account for the matrix (i.e., PVA) in order to ensure that the algorithm builds the model on a robust basis to then estimate other constituents. For the purpose of this study, 1875 spectra collected from three PVA films were used in the NCLS.

Ratios between compounds are clearly seen to evolve systematically across the formulations C1–C5. While PHE maps display a change of colour from 0% contribution (deep blue) in C0 to ~45% in C5, reflecting the increase of concentrations in films, PVA and Glycerol have the opposite behaviour, with decreasing NCLS scores from C0 to C5. For AMA, the heat maps do not exhibit significant changes in intensity.

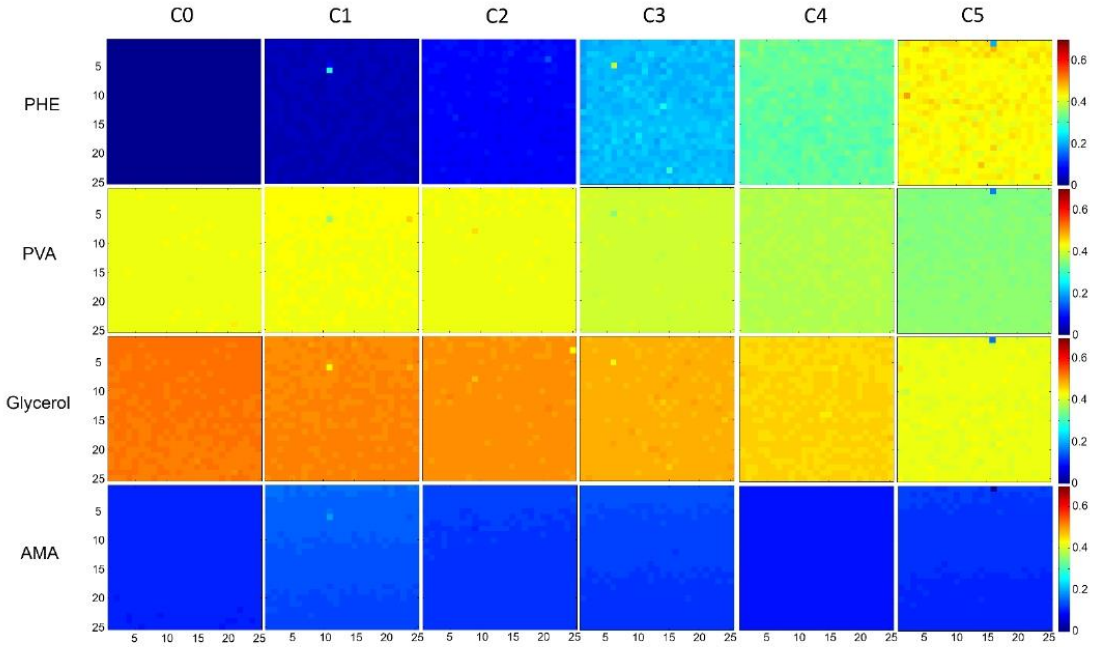


Figure 7. Typical reconstructed non-negatively constrained least squares (NCLS) maps following analysis of PVA-GS films loaded with increasing concentration of PHE: C0, C1, C2, C3, C4, and C5. The scale bar represents the contribution of each component spectrum in the Raman spectra at each pixel.

Irrespective of the PHE concentration tested, the NCLS reconstructed color-coded maps demonstrate the homogeneous distribution of the constituent components of the films. For concentration C5, the mean and standard deviations for NCLS scores are, respectively, 0.433 ± 0.014, 0.351 ± 0.009, 0.419 ± 0.011 and 0.112 ± 0.007 for PHE, PVA, Glycerol and AMA, corresponding to respective relative standard deviations (RSD) of 3.33%, 2.48%, 2.72% and 6.27%. These values confirm that the variations in concentration across the Raman maps of the dried films are minimal. The value, however, is slightly higher for AMA, suggesting a more heterogeneous distribution in the maps. Taking the mean from the three replicates, R1, R2 and R3, the RSD gives ranges from 0.58% (C1) to 1.74% (C5) for PVA and from 0.53% (C0) to 1.83% (C5) for Glycerol. For PHE, the mean RSD values are 4.90%, (C3), 4.43% (C4) and 3.70% (C5). For C0, C1 and C2, RSD values above 10% are reached, which can be explained by the low NCLS scores that progressively decrease towards 0, leading to increased weight of heterogeneity compared the concentration in the films. Nevertheless, it can be concluded that nanoformulation is an efficient way to ensure even distribution of a hydrophobic AI such as PHE in the hydrophilic matrix formed by polymers.

As regards estimating the respective content of ingredients in the films, NCLS scores cannot be used directly, as the relative spectral abundances are weighted by the respective spectral responses of each compound. Sums of spectral abundance exceed a value of 1, especially when the PHE concentration increases; hence, the correlation of NCLS results with actual constituent concentrations is not evident at first. For instance, in Figure 7 the sum of the NCLS scores corresponding to PHE, PVA, Glycerol and AMA for, respectively, C0, C1, C2, C3, C4 and C5 are 1.11, 1.14, 1.17, 1.26, 1.31 and 1.35. In this study, Raman analysis was performed on dry films; therefore, changing the amount of PHE inevitably modifies the concentration, expressed as $\%w/w$, of all constituents. It is necessary to convert this notion to NCLS scores in order to have a better appreciation of the systematic evolution of the spectral abundance fractions calculated by NCLS as a function of PHE

concentrations. Once the percentages of spectral abundance were calculated (see Material and Methods), it was possible to construct linear regression plots (Figure 8).

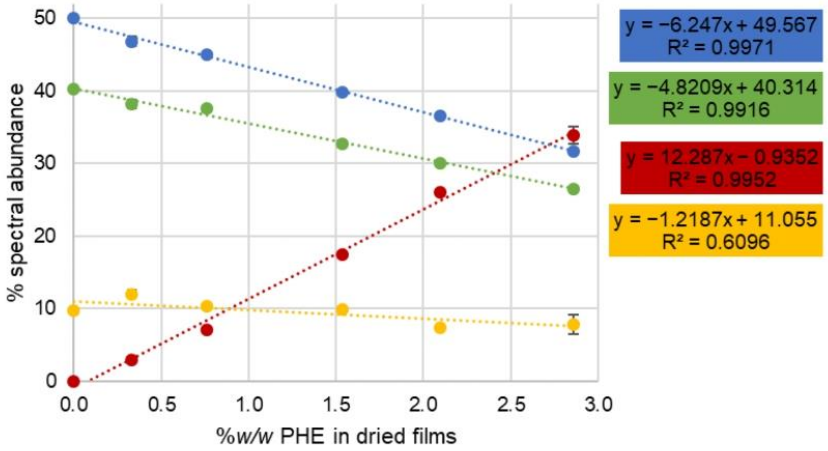


Figure 8. NCLS results with normalized abundance fraction of each component as a function of the concentration of PHE (%*w*/*w* in dried films). Red: PHE fraction, Blue: Glycerol fraction, Green: PVA fraction, and yellow: AMA fraction. Error bars represent standard error for $n = 3$ replicate films.

Raman response or Raman cross section dictates the relative strength of the signal originating from the compounds found in the analysed mixture. Depending on the chemical structures involved, the contribution of molecules can significantly differ from one to another. In the spectral map of C0, the relative spectral abundances of PVA and Glycerol are 0.42 and 0.53 respectively (PVA/Glycerol = 0.792). In Table 2, however, their nominal, as prepared %*w*/*w* contents are 46.30 and 48.96% (PVA/Glycerol = 0.946), indicating that the spectral contribution of PVA is relatively weaker than that of Glycerol by a factor of ~0.84. As can be seen from the linear regressions in Figure 8, this ratio of relative percentage of spectral abundance is maintained across the films as the concentration of PHE is increased. PVA and Glycerol have relative concentrations that are inversely correlated with PHE content, as also clearly observed in spectral abundance fractions in the NCLS reconstructed images (Figure 7, rows 2 and 3). In practice, Raman spectra are collected from a voxel defining the volume of analysis where the laser is focused. When analysis is performed on dry films, adding PHE inevitably leads to a decrease in PVA, Glycerol and AMA within this voxel. Linear regressions result in good fitting, with $R^2 = 0.9971$ ($Y = -6.247x + 49.567$) and $R^2 = 0.9916$ ($Y = -4.8209x + 40.314$), respectively, for Glycerol and PVA (Figure 8, blue and green). Similarly for AMA, taking into account the relative spectral abundance of 0.102 observed in image C0, it can be determined that its spectral contribution is ~2.4 stronger compared to PVA and ~2 stronger than Glycerol. AMA, however, has a lower R^2 with 0.6096 ($Y = -1.2187x + 11.055$). The consistency of the NCLS analysis is evidenced by the fact that the regression slope for PHE, 12.287, is equal to the sum of the slopes for PVA, Glycerol and AMA (Figure 8).

The PHE percentage of spectral abundance of 0.0373% ± 0.008 for C0 increases to a maximum of 33.90 ± 1.21% for C5 (Figure 8, red). The linear regression obtained from the mean values of each concentration delivers a relationship of $Y = 12.287x - 0.9352$ with $R^2 = 0.9952$, highlighting the proportionality of the Raman response according to the AI concentration in the dried films. However, while the concentration of PHE ranges from 0% *w*/*w* (C0) to 2.86% *w*/*w* (C5) (Table 2), the observed percent spectral abundance is ~12 times higher, suggesting the AI has a particularly strong Raman response compared to the other ingredients. This is confirmed by the spectral map of C1 (Figure 7), in which the relative spectral abundances of PHE and PVA are equal to 0.0334 and 0.427

(PHE/PVA = 0.0782), respectively. In Table 2, however, their nominal, as prepared %w/w contents are 0.33% and 47.2% (PHE/PVA = 0.00699), respectively, indicating that the spectral contribution of PHE is significantly stronger than that of PVA, by a factor of ~11.2. Similarly, in the spectral map of C1, the relative spectral abundance of Glycerol is 0.514, and hence PHE/Glycerol = 0.0650. In Table 3, however, its nominal, as prepared *%w/w* content is 47.5%, a ratio of PHE/Glycerol = 0.00694, indicating that the spectral contribution of PHE is also significantly stronger than that of Glycerol, by a factor of ~9.37.

The relative spectral abundance of AMA in the spectral map of C1 is 0.139, and hence PHE/AMA = 0.240 for a prepared concentration of 4.8% *w/w* (Table 2). The ratio PHE/AMA = 0.06875 suggest that the spectral contribution of PHE is also significantly stronger than that of AMA, by a factor of ~3.49.

3.5. Absolute Quantification of PHE in PVA-GS Films

NCLS analysis is an unmixing method that delivers results as scores, i.e., abundance fractions, for each compound introduced into the calculation for references. The expression of results as percentages of spectral abundance enables construction of a linear regression for PHE as a function of concentration in the film (Figure 8). Thanks to the proportionality between *%w/w* PHE in films and percent spectral abundance in the Raman data, a predictive model can be constructed. To demonstrate this, the map of R1 was used for calibration to define the equation of the linear regression ($Y = 12.711x - 1.2796$, $R^2 = 0.9939$), and then the percent spectral abundance for all data points from maps R2 and R3 were determined as unknown samples. Figure 9 presents the prepared concentrations plotted against the predicted concentrations. This representation, widely used for spectral data subjected to quantitative data analysis [45–48], provides a visualisation of the quality of the fitting achieved. With $Y = 0.9499x + 0.0406$ and $R^2 = 0.995$, the high correlation between the concentration of the AI in the dried films and the concentrations estimated using the NCLS results is confirmed. The RMSE is a standard way to measure the error of a model in predicting quantitative data. For instance, an RMSE = 0.0868% *w/w* PHE, that is, 6.07% of the median concentration of the range analysed, confirms the reliability of the analysis. The mean percent relative errors in the predicted concentration is equal to 3.75%, highlighting the accuracy of the analysis. Considering the concentrations individually, it is observed that the percentages of relative errors are, respectively, 1.61 ± 0.79, 13.6 ± 0.15, 3.42 ± 1.81 and 1.92 ± 0.70 for C1, C2, C3, C4 and C5. Except for C2, the concentrations are predicted with relative errors below 5%.

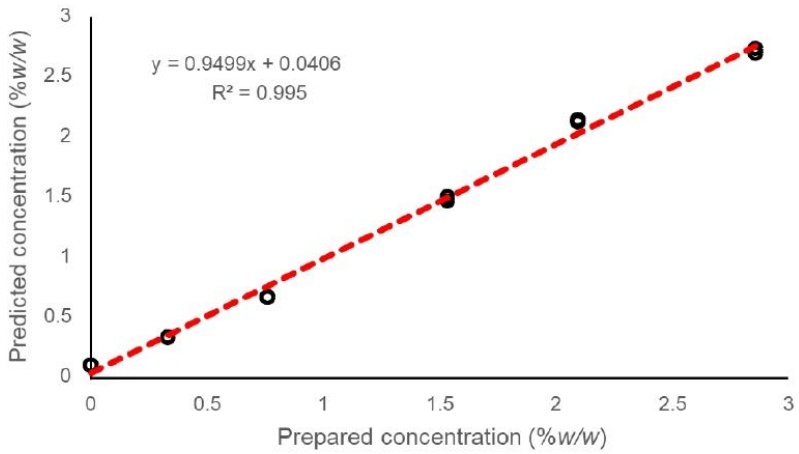


Figure 9. Absolute quantification of PHE in PVA-GS films. Prepared concentration *%w/w* regressed against predicted concentration *%w/w*.

NCLS analysis of Raman microspectroscopic profiles can therefore be employed to perform quantitative analysis of the percentage of AI content within a composite solid film matrix with a high degree of accuracy. The methodology of mapping provides a qualitative analysis of the film in terms of, for example, the degree of homogeneity of the composition, and also provides relatively large datasets to construct and validate calibration models for absolute quantitation purposes.

4. Conclusions

First, chemical maps reconstructed from Raman maps using NCLS confirm the homogeneous distribution of PHE, the active ingredient, after drying. The results support stabilisation of hydrophobic active cosmetic ingredients such as Pluronic® F127 stabilised nanoformulation as a promising approach to prepare film-forming cosmetics for topical application. In addition, NCLS analysis enables the distribution of other ingredients to be visualised, specifically thanks to a collection of reference Raman spectra collected from pure compounds. Linear regressions for PVA, Glycerol and PHE displayed $R^2 > 0.99$, highlighting their high correlation in Raman features with varying amounts of the AI within the films. Ultimately, it is further demonstrated that NCLS scores, i.e., calculated spectral abundance for each ingredient, can be used to perform absolute quantification. The $R^2 = 0.995$ between the $\%w/w$ prepared and $\%w/w$ predicted concentrations strengthens the potential of Raman spectroscopy coupled to multivariate analysis as a tool to support the development of new film-forming topical products. Second, this study demonstrates that confocal Raman Imaging is a valuable non-destructive, label-free and reagent-free tool that can support the development of green analytical protocols in the cosmetics industry. In addition to delivering spatially resolved chemical maps with micrometric resolution, this technique can contribute greatly to reducing the consumption of consumables and solvents from the early stages of development of new formulae to final quality control of products. Coupling Raman confocal imaging with advanced multivariate analysis such as NCLS opens perspectives for standardisation and automation of data mining protocols, and thus for its implementation for daily use in the industry.

Author Contributions: Conceptualization, E.M., C.S., F.Y. and F.B.; Data Curation, L.V.G., H.K. and K.K.; Funding Acquisition, E.M.; Investigation, E.M. and F.B.; Methodology, F.M., M.V., C.S., E.M. and F.B.; Resources, F.Y., I.C. and E.M.; Supervision, E.M. and F.B.; Writing—Original Draft, L.V.G., E.M., H.J.B. and F.B.; Writing—Review and Editing, H.J.B., E.M. and F.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ambition Recherche et Développement Centre Val de Loire (ARD-CVL), project MISTIC, grant number ARD 2020 Cosmetosciences 2017-00118114" and Fonds Europeen de Developpement Regional (FEDER), grant number 2017-EX003256.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Voss, G.T.; Gularte, M.S.; de Oliveira, R.L.; Luchese, C.; Fajardo, A.R.; Wilhelm, E.A. Biopolymeric Films as Delivery Vehicles for Controlled Release of Hydrocortisone: Promising Devices to Treat Chronic Skin Diseases. *Mater. Sci. Eng. C* **2020**, *114*, 111074. [CrossRef] [PubMed]
2. Kathe, K.; Kathpalia, H. Film Forming Systems for Topical and Transdermal Drug Delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**, *12*, 487–497. [CrossRef] [PubMed]
3. Pünnel, L.C.; Lunter, D.J. Film-Forming Systems for Dermal Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 932. [CrossRef]

4. Frederiksen, K.; Guy, R.H.; Petersson, K. The Potential of Polymeric Film-Forming Systems as Sustained Delivery Platforms for Topical Drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 349–360. [CrossRef] [PubMed]
5. Rao, P.R.; Diwan, P.V. Formulation and in Vitro Evaluation of Polymeric Films of Diltiazem Hydrochloride and Indomethacin for Transdermal Administration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 327–336. [CrossRef]
6. Zurdo Schroeder, I.; Franke, P.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.-M. Development and Characterization of Film Forming Polymeric Solutions for Skin Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65*, 111–121. [CrossRef]
7. Frederiksen, K.; Guy, R.H.; Petersson, K. Formulation Considerations in the Design of Topical, Polymeric Film-Forming Systems for Sustained Drug Delivery to the Skin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *91*, 9–15. [CrossRef]
8. Mandapalli, P.K.; Labala, S.; Jose, A.; Bhatnagar, S.; Janupally, R.; Sriram, D.; Venuganti, V.V.K. Layer-by-Layer Thin Films for Co-Delivery of TGF-β SiRNA and Epidermal Growth Factor to Improve Excisional Wound Healing. *AAPS PharmSciTech* **2017**, *18*, 809–820. [CrossRef]
9. Aisyah, Y.; Irwanda, L.P.; Haryani, S.; Safriani, N. Characterization of Corn Starch-Based Edible Film Incorporated with Nutmeg Oil Nanoemulsion. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *352*, 012050. [CrossRef]
10. Alkilani, A.; McCrudden, M.T.; Donnelly, R. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. *Pharmaceutics* **2015**, *7*, 438–470. [CrossRef] [PubMed]
11. Amnuaikit, C.; Ikeuchi, I.; Ogawara, K.; Higaki, K.; Kimura, T. Skin Permeation of Propranolol from Polymeric Film Containing Terpene Enhancers for Transdermal Use. *Int. J. Pharm.* **2005**, *289*, 167–178. [CrossRef] [PubMed]
12. The Mystical Effects of Dermatological Vehicles-FullText-Dermatology 2005, Vol. 210, No. 2-Karger Publishers. Available online: https://www.karger.com/Article/FullText/82572 (accessed on 27 April 2021).
13. Adrover, A.; di Muzio, L.; Trilli, J.; Brandelli, C.; Paolicelli, P.; Petralito, S.; Casadei, M.A. Enhanced Loading Efficiency and Mucoadhesion Properties of Gellan Gum Thin Films by Complexation with Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 819. [CrossRef] [PubMed]
14. Munnier, E.; Al Assaad, A.; David, S.; Mahut, F.; Vayer, M.; Van Gheluwe, L.; Yvergnaux, F.; Sinturel, C.; Soucé, M.; Chourpa, I.; et al. Homogeneous Distribution of Fatty Ester-based Active Cosmetic Ingredients in Hydrophilic Thin Films by Means of Nanodispersion. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2020**, *42*, 512–519. [CrossRef] [PubMed]
15. Contardi, M.; Heredia-Guerrero, J.A.; Perotto, G.; Valentini, P.; Pompa, P.P.; Spanò, R.; Goldoni, L.; Bertorelli, R.; Athanassiou, A.; Bayer, I.S. Transparent Ciprofloxacin-Povidone Antibiotic Films and Nanofiber Mats as Potential Skin and Wound Care Dressings. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *104*, 133–144. [CrossRef]
16. Patel, S.; Srivastava, S.; Singh, M.R.; Singh, D. Preparation and Optimization of Chitosan-Gelatin Films for Sustained Delivery of Lupeol for Wound Healing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 1888–1897. [CrossRef] [PubMed]
17. Gehrcke, M.; de Bastos Brum, T.; da Rosa, L.S.; Ilha, B.D.; Soares, F.Z.M.; Cruz, L. Incorporation of Nanocapsules into Gellan Gum Films: A Strategy to Improve the Stability and Prolong the Cutaneous Release of Silibinin. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *119*, 111624. [CrossRef] [PubMed]
18. Niamlang, P.; Tongrain, T.; Ekabutr, P.; Chuysinuan, P.; Supaphol, P. Preparation, Characterization and Biocompatibility of Poly(Vinyl Alcohol) Films Containing Tetracycline Hydrochloride-Loaded Quaternized Chitosan Nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2017**, *38*, 36–44. [CrossRef]
19. Magalhães, T.M.; Guerra, R.C.; da San Gil, R.A.S.; Valente, A.P.; Simão, R.A.; Soares, B.G.; de Carvalho Mendes, T.; dos Santos Pyrrho, A.; de Sousa, V.P.; Rodrigues-Furtado, V.L. PAMAM Dendrimer Hydrogel Film—Biocompatible Material to an Efficient Dermal Delivery of Drugs. *J. Nanopart. Res.* **2017**, *19*, 277. [CrossRef]
20. Garvie-Cook, H.; Frederiksen, K.; Petersson, K.; Guy, R.H.; Gordeev, S. Characterization of Topical Film-Forming Systems Using Atomic Force Microscopy and Raman Microspectroscopy. *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 751–757. [CrossRef] [PubMed]
21. Schmidt, U.; Hild, S.; Ibach, W.; Hollricher, O. Characterization of Thin Polymer Films on the Nanometer Scale with Confocal Raman AFM. *Macromol. Symp.* **2005**, *230*, 133–143. [CrossRef]
22. Ghita, A.; Pascut, F.C.; Sottile, V.; Denning, C.; Notingher, I. Applications of Raman Micro-Spectroscopy to Stem Cell Technology: Label-Free Molecular Discrimination and Monitoring Cell Differentiation. *EPJ Tech. Instrum.* **2015**, *2*, 6. [CrossRef] [PubMed]
23. Rammal, H.; Al Assaad, A.; Dosio, F.; Stella, B.; Maksimenko, A.; Mura, S.; Van Gulick, L.; Callewaert, M.; Desmaële, D.; Couvreur, P.; et al. Investigation of Squalene-Doxorubicin Distribution and Interactions within Single Cancer Cell Using Raman Microspectroscopy. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2021**, *35*, 102404. [CrossRef] [PubMed]
24. Dorney, J.; Bonnier, F.; Garcia, A.; Casey, A.; Chambers, G.; Byrne, H.J. Identifying and Localizing Intracellular Nanoparticles Using Raman Spectroscopy. *Analyst* **2012**, *137*, 1111. [CrossRef] [PubMed]
25. Beleites, C.; Bonifacio, A.; Codrich, D.; Krafft, C.; Sergo, V. Raman Spectroscopy and Imaging: Promising Optical Diagnostic Tools in Pediatrics. *CMC* **2013**, *20*, 2176–2187. [CrossRef] [PubMed]
26. Miloudi, L.; Bonnier, F.; Tfayli, A.; Yvergnaux, F.; Byrne, H.J.; Chourpa, I.; Munnier, E. Confocal Raman Spectroscopic Imaging for in Vitro Monitoring of Active Ingredient Penetration and Distribution in Reconstructed Human Epidermis Model. *J. Biophotonics* **2018**, *11*, e201700221. [CrossRef]
27. Paudel, A.; Raijada, D.; Rantanen, J. Raman Spectroscopy in Pharmaceutical Product Design. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *89*, 3–20. [CrossRef] [PubMed]
28. Waffo Tchounga, C.A.; Sacre, P.Y.; Ciza, P.; Ngono, R.; Ziemons, E.; Hubert, P.; Marini, R.D. Composition Analysis of Falsified Chloroquine Phosphate Samples Seized during the COVID-19 Pandemic. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2021**, *194*, 113761. [CrossRef]

29. Miloudi, L.; Bonnier, F.; Bertrand, D.; Byrne, H.J.; Perse, X.; Chourpa, I.; Munnier, E. Quantitative Analysis of Curcumin-Loaded Alginate Nanocarriers in Hydrogels Using Raman and Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 4593–4605. [CrossRef]
30. Mazurek, S.; Szostak, R. Quantitative Analysis of Topical Gels and Ointments by FT-Raman Spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2016**, *83*, 1–7. [CrossRef]
31. Strachan, C.J.; Rades, T.; Gordon, K.C.; Rantanen, J. Raman Spectroscopy for Quantitative Analysis of Pharmaceutical Solids. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *59*, 179–192. [CrossRef] [PubMed]
32. Hertrampf, A.; Sousa, R.M.; Menezes, J.C.; Herdling, T. Semi-Quantitative Prediction of a Multiple API Solid Dosage Form with a Combination of Vibrational Spectroscopy Methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *124*, 246–253. [CrossRef] [PubMed]
33. Bakkar, M.A.; Nawaz, H.; Majeed, M.I.; Naseem, A.; Ditta, A.; Rashid, N.; Ali, S.; Bajwa, J.; Bashir, S.; Ahmad, S.; et al. Raman Spectroscopy for the Qualitative and Quantitative Analysis of Solid Dosage Forms of Sitagliptin. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, *245*, 118900. [CrossRef]
34. Bajwa, J.; Nawaz, H.; Majeed, M.I.; Hussain, A.I.; Farooq, S.; Rashid, N.; Bakkar, M.A.; Ahmad, S.; Hyat, H.; Bashir, S.; et al. Quantitative Analysis of Solid Dosage Forms of Cefixime Using Raman Spectroscopy. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, *238*, 118446. [CrossRef] [PubMed]
35. Kwan, C.; Ayhan, B.; Chen, G.; Wang, J.; Ji, B.; Chang, C.-I. A Novel Approach for Spectral Unmixing, Classification, and Concentration Estimation of Chemical and Biological Agents. *IEEE Trans. Geosci. Remote Sens.* **2006**, *44*, 409–419. [CrossRef]
36. Chiper, M.; Hervé Aubert, K.; Augé, A.; Fouquenet, J.-F.; Soucé, M.; Chourpa, I. Colloidal Stability and Thermo-Responsive Properties of Iron Oxide Nanoparticles Coated with Polymers: Advantages of Pluronic® F68–PEG Mixture. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 395605. [CrossRef] [PubMed]
37. Gupta, S.; Gupta, S.; Jindal, N.; Jindal, A.; Bansal, R. Nanocarriers and Nanoparticles for Skin Care and Dermatological Treatments. *Indian Dermatol. Online J.* **2013**, *4*, 267–272. [CrossRef] [PubMed]
38. Guo, C.; Liu, H.; Wang, J.; Chen, J. Conformational Structure of Triblock Copolymers by FT-Raman and FTIR Spectroscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *209*, 368–373. [CrossRef]
39. Beattie, J.R.; Maguire, C.; Gilchrist, S.; Barrett, L.J.; Cross, C.E.; Possmayer, F.; Ennis, M.; Elborn, J.S.; Curry, W.J.; McGarvey, J.J.; et al. The Use of Raman Microscopy to Determine and Localize Vitamin E in Biological Samples. *FASEB J.* **2007**, *21*, 766–776. [CrossRef] [PubMed]
40. Wang, K.; Sun, D.-W.; Wei, Q.; Pu, H. Quantification and Visualization of α-Tocopherol in Oil-in-Water Emulsion Based Delivery Systems by Raman Microspectroscopy. *LWT* **2018**, *96*, 66–74. [CrossRef]
41. Yang, C.-C.; Chiu, S.-J.; Lee, K.-T.; Chien, W.-C.; Lin, C.-T.; Huang, C.-A. Study of Poly(Vinyl Alcohol)/Titanium Oxide Composite Polymer Membranes and Their Application on Alkaline Direct Alcohol Fuel Cell. *J. Power Sources* **2008**, *184*, 44–51. [CrossRef]
42. Mudalige, A.; Pemberton, J.E. Raman Spectroscopy of Glycerol/D2O Solutions. *Vib. Spectrosc.* **2007**, *45*, 27–35. [CrossRef]
43. Badawi, H.M. Vibrational Spectra and Assignments of 2-Phenylethanol and 2-Phenoxyethanol. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2011**, *82*, 63–68. [CrossRef] [PubMed]
44. Ansari, Z.; Bhattacharya, T.S.; Saha, A.; Sen, K. Block Copolymer Mediated Generation of Bimetallic Ni-Pd Nanoparticles: Raman Sensors of Ethyl Paraben and Ciprofloxacin. *React. Funct. Polym.* **2018**, *124*, 1–11. [CrossRef]
45. Elderderi, S.; Wils, L.; Leman-Loubière, C.; Henry, S.; Byrne, H.J.; Chourpa, I.; Munnier, E.; Elbashir, A.A.; Boudesocque-Delaye, L.; Bonnier, F. Comparison of Raman and Attenuated Total Reflectance (ATR) Infrared Spectroscopy for Water Quantification in Natural Deep Eutectic Solvent. *Anal. Bioanal. Chem.* **2021**, *413*, 4785–4799. [CrossRef] [PubMed]
46. Elderderi, S.; Wils, L.; Leman-Loubière, C.; Byrne, H.J.; Chourpa, I.; Enguehard-Gueiffier, C.; Munnier, E.; Elbashir, A.A.; Boudesocque-Delaye, L.; Bonnier, F. In Situ Water Quantification in Natural Deep Eutectic Solvents Using Portable Raman Spectroscopy. *Molecules* **2021**, *26*, 5488. [CrossRef]
47. Makki, A.A.; Elderderi, S.; Massot, V.; Respaud, R.; Byrne, H.J.; Tauber, C.; Bertrand, D.; Mohammed, E.; Chourpa, I.; Bonnier, F. In Situ Analytical Quality Control of Chemotherapeutic Solutions in Infusion Bags by Raman Spectroscopy. *Talanta* **2021**, *228*, 122137. [CrossRef] [PubMed]
48. Makki, A.A.; Massot, V.; Byrne, H.J.; Respaud, R.; Bertrand, D.; Mohammed, E.; Chourpa, I.; Bonnier, F. Vibrational Spectroscopy for Discrimination and Quantification of Clinical Chemotherapeutic Preparations. *Vib. Spectrosc.* **2021**, *113*, 103200. [CrossRef]

La technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) a permis de mettre en évidence la distribution homogène de l'actif PHE au sein de films de PVA. La spectroscopie Raman est une technique avec un très fort potentiel pour les analyses quantitatives. Lorsque les bandes Raman caractéristiques de chaque composant ne se superposent pas, l'analyse des films est facilitée. Dans des cas plus complexes, notamment lorsque les signaux des ingrédients interfèrent entre eux ou avec l'actif, l'analyse des données se complexifie. Grâce à des méthodes d'analyse multivariées (ici, NCLS pour *Non Negatively Least Squares*), il est possible d'extraire de chaque spectre la contribution de chaque composante et de réaliser alors une analyse semi-quantitative du PHE encapsulé et dispersé dans les films. Cette approche peut cependant être chronophage, que ce soit lors de l'acquisition ou lors du traitement des données (correction de la ligne de base, normalisation, etc.). Ça n'a pas été le cas ici mais, en fonction de l'étude, de nombreux paramètres peuvent être à tester (choix de la longueur d'onde du laser, choix de l'objectif, etc.) afin d'améliorer la qualité globale du spectre.

Dans cette étude, l'analyse des films à l'aide de la technique IMCR a été réalisée en surface des films (x-y). Mais il est également possible de visualiser la distribution des composants du film en profondeur (en z) dans le film avec notamment le mode *Depth*. Pour cela, la résolution en profondeur des systèmes d'imagerie est d'une importance capitale pour discriminer les différentes couches (si elles existent) dans la direction z. A l'aide du logiciel WITec (Project FIVE), il est possible d'analyser de façon préliminaire la distribution en profondeur des composés du film en suivant une bande Raman caractéristique : 1635 cm^{-1} pour PHE, ~1440 cm^{-1} pour le PVA, ou 1464 cm^{-1} pour le Glycérol. La Figure 17 représente les cartographies d'intensité en z pour chaque bande caractéristique choisie, en fonction du type de film et de la concentration en NanoPHE.

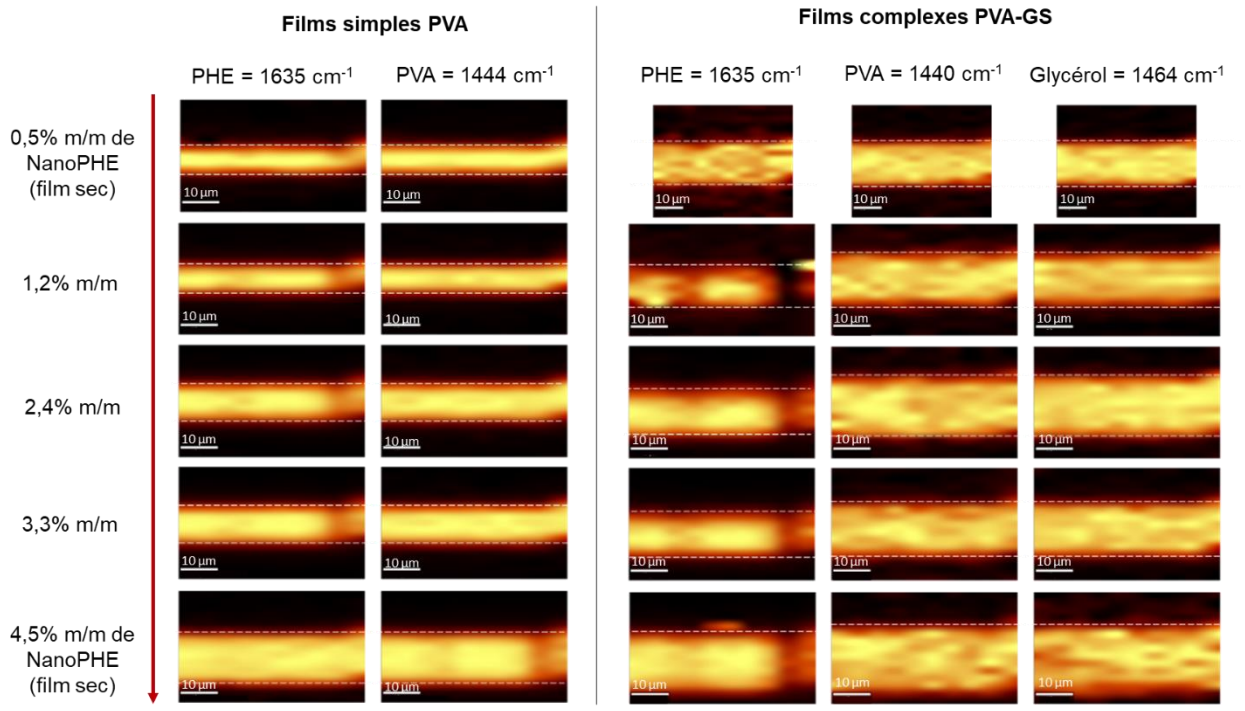


Figure 17: Cartographies d'intensité en z des bandes caractéristiques des composés principaux des films à base de PVA

Que ce soit pour les films simples ou complexes, on remarque une distribution plutôt homogène de chaque composé dans l'épaisseur. De la même façon que précédemment, une méthode statistique semi-quantitative, de type NCLS (Non Negatively Least Squares), pourra être utilisée pour tracer des profils reliant la contribution du signal de l'actif (en profondeur, z) avec la quantité initialement incorporée. De plus, la méthode des nuées dynamiques, appelée communément K-means, pourra être utilisée pour mettre en évidence des groupes, ici spectres, semblables.

Pour les films simples de PVA, on remarque que l'augmentation de la quantité de NanoPHE (de 1% à 10% m/m) conduit à une augmentation de l'épaisseur du film pour une même masse étalée de la même manière. En effet, l'augmentation de la concentration des matériaux utilisés entraînera une augmentation de l'épaisseur du film (Mc Hugh, 1993). Concernant les films plus complexes (PVA-GS), un traitement des données associé à une évaluation statistique serait nécessaire. On remarque cependant que les films contenant du glycérol et du Sépicide^{TM} HB ont une épaisseur supérieure à celle des films à base de PVA uniquement. L'incorporation de Glycérol diminue le taux d'évaporation de l'eau, car la molécule de glycérol à trois groupes hydroxyle peut former une structure de réseau avec le PVA par liaison hydrogène, et les groupes hydroxyle restants peuvent également former une liaison hydrogène avec l'eau (Wang et al., 2003). Par conséquent, la présence de glycérol augmente la viscosité du système. Et, lorsque la viscosité est plus élevée, le film sera plus épais.

Le film à base de PVA, Glycérol et Sépicide^{TM} HB (PVA-GS), se rapprochant le plus de ce qui pourrait être retrouvé sur le marché des produits cosmétiques, a été sélectionné pour réaliser des analyses supplémentaires telles que des mesures mécaniques et de mouillabilité. Les films précédemment produits et analysés en Raman s'avèrent beaucoup trop fins pour être manipulés pour de tels mesures. Par conséquent, des films plus épais seront formulés.

4. Propriétés mécaniques et caractérisation du mouillage des films

Les travaux qui vont suivre ont été réalisés grâce à un séjour dans l'équipe URCOM (Unité de Recherche en Chimie Organique et Macromoléculaire, Université du Havre) dirigée par le Professeur Michel Grisel. L'initiation aux techniques exposées ci-dessous a été permise grâce au Dr. Ecaterina Gore.

Les propriétés mécaniques et de mouillabilité des films complexes PVA-GS, chargés ou non en NanoPHE, ont été étudiées. On parlera de films contrôles lorsqu'il n'y aura pas de NanoPHE incorporés. Les films ont été préparés comme suit : 10 mL d'une solution filmogène de PVA-GS (avec ou non des nanosystèmes NanoPHE à 10% m/m) est versée dans un emporte-pièce 8x8 cm déposé sur du papier aluminium. Le film est laissé séché à l'air libre pendant minimum 3 jours. Une fois les films secs, ils sont démoulés des emportes pièces et divisés en plusieurs sous-échantillons (appelés éprouvettes). Afin d'évaluer l'homogénéité de l'épaisseur, trois mesures ont été effectuées sur chaque éprouvette (une à chaque extrémité de l'éprouvette et une au milieu) à l'aide d'un micromètre numérique. Les valeurs moyennes

d'épaisseur ont été calculées et exprimées en mm. Plus précisément, chaque film a été divisé en 7 éprouvettes ; 6 ont été gardées pour des analyses mécanique (texturomètre) et 1 a été gardée pour des analyses de mouillabilité. En fonction de la qualité du film et de l'homogénéité en épaisseur sur toute la longueur du film, le nombre d'éprouvettes pouvait varier. Ici, nous n'avons conservé que les éprouvettes régulières d'environ 10 x 80 mm avec pour épaisseur ; 0.2 mm.

4.1. Propriétés mécaniques du film

4.1.1. Contexte des mesures

L'analyse instrumentale de la texture d'un produit cosmétique, utilisant un appareil nommé texturomètre, permettrait d'optimiser son développement en anticipant la perception des propriétés de texture éprouvées par les consommateurs lors de son utilisation. Les mesures réalisées par un texturomètre sont basées sur une déformation du produit et la mesure de sa réaction à la déformation. Un texturomètre est en fait un capteur de force. Il est constitué d'une sonde, fixée à un bras mobile, lequel est mis en mouvement afin d'entrer en contact avec le produit à caractériser. En fonction du type de sonde utilisée, plusieurs paramètres peuvent être déterminés tels que la dureté, la fermeté, la consistance, l'élasticité, ou encore l'adhésion du produit cosmétique (Roso and Brinet, 2004; Smewing, 2007).

Dans notre cas, un test préliminaire d'étirement des films va être réalisé pour évaluer l'impact de l'incorporation des nanosystèmes sur les propriétés mécaniques du film.

4.1.2. Protocole – test texturométrique

Les analyses sont effectuées sur un texturomètre TAXT Plus (Stable Micro Systems, Cardiff, UK) avec la sonde A/ATG (pour *articulated tensile grips*). Le protocole suivant a été mis en place :

- Chaque éprouvette sélectionnée est placée entre les deux pinces verticales du texturomètre qui sont positionnées à 60 mm l'une de l'autre (Figure 18).

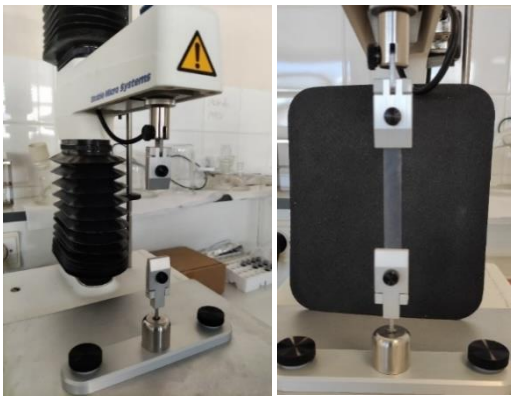


Figure 18: Montage de l'étude d'étirement des films PVA-GS

- Le film subit alors un étirement de 100% de sa longueur, soit 60mm, à une vitesse de 8 mm/s.
- Après ce premier étirement, 3 autres répétitions sont effectuées dans les mêmes conditions.

4.1.3. Résultats

Le résultat de la mesure est un graphique représentant la force (exercée par la sonde sur l'échantillon) en fonction du temps du test (Figure 19). Cela nous permet notamment d'évaluer la force maximale nécessaire pour étirer le film à 100% de sa longueur. Cette force est de 341.44 ± 33.72 g pour les films chargés et de 359.68 ± 38.92 g pour les films contrôles. L'incorporation de 10% m/m de nanosystèmes dans les films de PVA-GS ne semble pas impacter de manière significative la force nécessaire pour étirer le film à 100% de sa longueur.

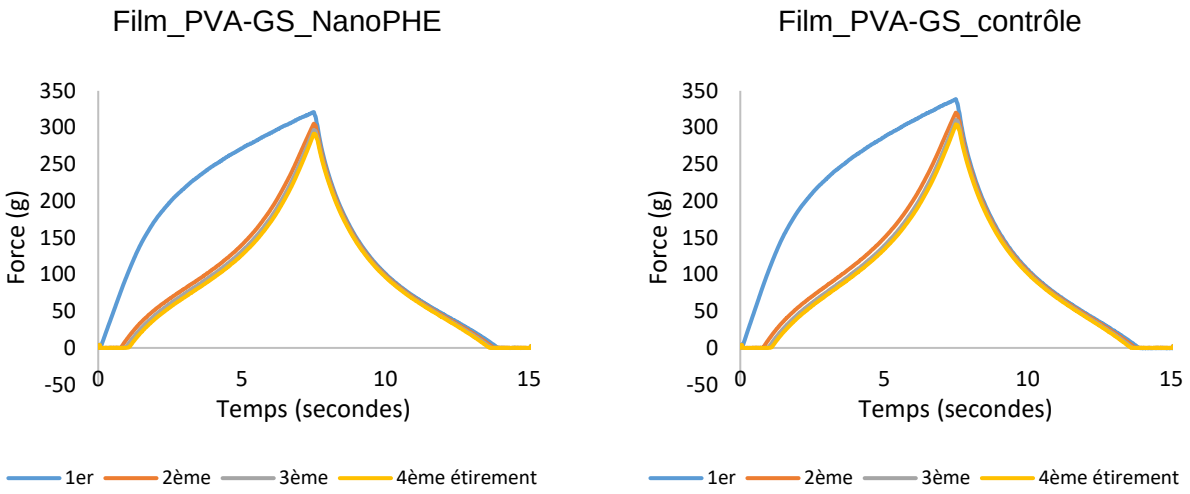


Figure 19: Résultats typiques obtenus après étirement du film PVA-GS, chargé ou non en nanosystèmes NanoPHE – Représentation de la force exercée par la sonde pour étirer le film à 100% de sa longueur en fonction du temps du test

Les trois répétitions suivant le premier étirement ont permis de mesurer l'élasticité des films. En effet, après une déformation de 100%, le film ne récupère pas complètement sa longueur initiale. Ici on parle d'une longueur résiduelle d'allongement qui est mesurée à partir des données brutes pour chaque répétition. C'est le deuxième paramètre relevé (Figure 20).

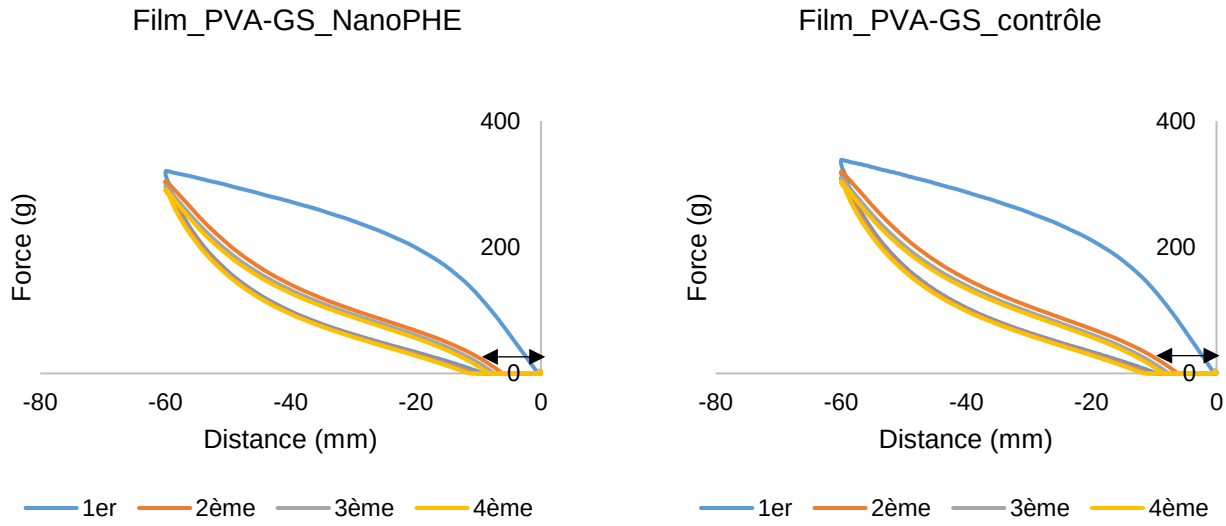


Figure 20: Résultats typiques obtenus après étirement du film PVA-GS, chargé ou non en nanosystèmes NanoPHE - Représentation de la force exercée par la sonde pour étirer le film à 100% de sa longueur en fonction de la distance parcourue (mm).

Les résultats d'étirement obtenus avec les films chargés ou contrôles sont compilés dans le Tableau 5. Les longueurs résiduelles sont les mêmes, quel que soit le type de film. En effet, après le premier étirement, les films s'allongent d'environ 6,35 mm. Après le 2ème étirement, leur longueur résiduelle est alors d'environ 7,85 mm puis de 8,75 mm après le 3ème étirement.

Tableau 5 : Allongement du film (en mm) en fonction du nombre d'étirement exercé sur le film

	Allongement du film (mm)		
	1er étirement	2ème étirement	3ème étirement
PVA-GS_NanoPHE	-6,45 ± 0,75	-7,89 ± 0,85	-8,77 ± 0,88
PVA-GS_contrôle	-6,31 ± 0,26	-7,80 ± 0,33	-8,68 ± 0,30

Les résultats obtenus à l'aide du texturomètre nous permettre de conclure la chose suivante ; l'incorporation des nanosystèmes NanoPHE au sein du film PVA-GS ne semble pas impacter les propriétés d'étirement du film.

4.2. Mesure de la mouillabilité des films par goniométrie

4.2.1. Principe général

La caractérisation de la mouillabilité est une technique largement utilisée pour étudier les propriétés de surface des matériaux. Elle est définie par l'angle de contact, représenté par l'angle θ_A sur la Figure 21, qui traduit l'affinité entre une surface (ici, la surface du film) et un liquide (ici, de l'eau).

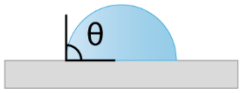


Figure 21: Angle de contact ϑ_A entre une surface solide et un liquide

La valeur de l'angle de contact entre une surface et un liquide donné dépend de la tension de surface du solide. Si le matériau possède une faible tension de surface, l'eau aura du mal à s'étaler du fait du manque de liaisons chimiques actives permettant de créer des liaisons hydrogènes. On observera alors un angle de contact de l'eau supérieur à 90° qui décrit une surface hydrophobe (Figure 22A). En revanche, un matériau à haute tension de surface favorise la création de liaisons hydrogène avec l'eau qui aura tendance à bien s'étaler sur la surface solide. Ces matériaux sont caractérisés par un angle de contact de l'eau inférieur à 90° (Figure 22B) et sont qualifiés de matériaux hydrophiles, voire superhydrophiles si l'angle est proche de zéro.



Figure 22: Profil de l'angle de contact de l'eau en fonction de l'hydrophilie de la surface

4.2.2. Protocole - mouillabilité

L'objectif de ces mesures physico-chimiques était de déterminer si l'incorporation de nanosystèmes chargés en PHE (actif lipophile) allait changer les propriétés de mouillabilité du film. Les mesures de l'angle de contact ont été réalisées selon la méthode de la goutte posée, à l'aide d'un goniomètre portatif PGX+ (ScanGaule, Gravigny, France), connecté au logiciel PGPlus. Le goniomètre portatif utilisé est équipé d'une caméra haute résolution pour acquérir les images, associée à un système d'éclairage et de miroir spécifique permettant de visualiser la goutte. Les mesures sont réalisées à température ambiante. Pour réaliser les mesures, une goutte d'eau distillée de faible volume est déposée sur la surface à analyser, puis son volume est augmenté par l'ajout de 5 gouttes successives, de même volume, à l'aide d'un appareil pousse-seringue KSD Scientific (Inc, Guilford, Etats-Unis) réglé à un débit de 1mL/h (Figure 23). 5 images sont enregistrées immédiatement après l'addition de chaque goutte.

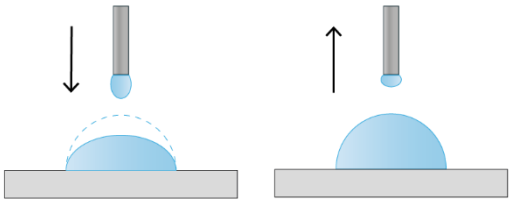


Figure 23: Méthode dépôt-goutte

Les angles sont mesurés à l'aide du logiciel, grâce à l'analyse de la forme de la goutte. Les mesures réalisées à droite et à gauche de la goutte sont moyennées pour obtenir une valeur d'angle par image. La valeur d'angle, notée θ_A, est la valeur maximale mesurée parmi les 5 images analysées.

4.2.3. Résultats

La Figure 24 représente des images typiques obtenues après dépôt de 5 gouttes d'eau distillées sur un film PVA-GS chargé en NanoPHE ou sur des films contrôles PVA-GS (sans nanosystèmes). La valeur d'angle moyenne ($n > 7$) pour les films chargés en NanoPHE est de 33,21 ± 10,87°. Pour les films dits contrôle, elle est de 35,15 ± 8,21°. On remarque donc que, peu importe le type de film, chargé ou non en nanosystèmes, celui-ci à un comportement hydrophile. Il a notamment été constaté que les films gonflaient très rapidement après l'ajout des gouttes d'eau. Il est important de notifier qu'aucune différence significative n'est observée entre les deux types de films. L'ajout de nanosystèmes chargés en un actif lipophile ne semble donc pas impacter la polarité de surface des films PVA-GS-NanoPHE. Cela laisse supposer qu'au sein du film, l'actif lipophile reste encapsulé dans la nanomicelle qui présente une surface hydrophile.

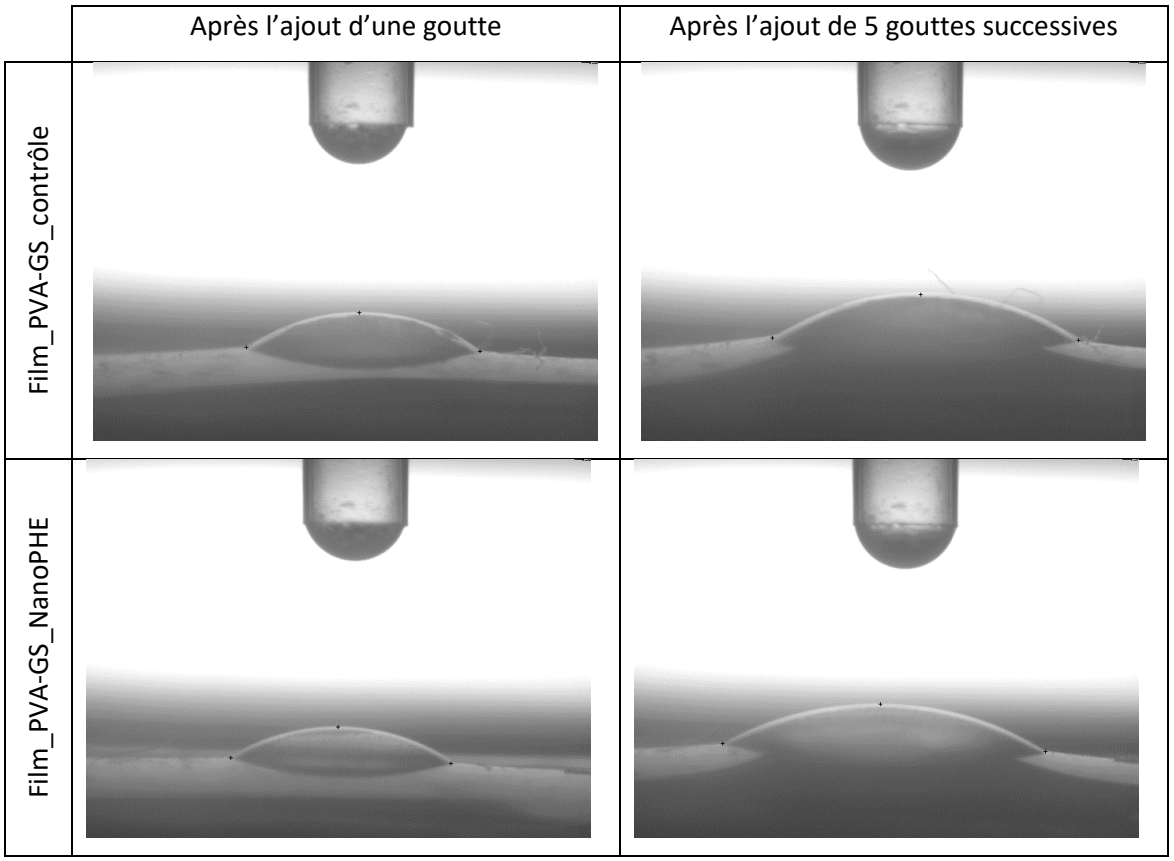


Figure 24 : Images typiques obtenues après dépôt d'une ou de 5 gouttes d'eau distillée sur un film contrôle PVA-GS (sans nanosystèmes) ou sur un film PVA-GS chargé en NanoPHE.

Conclusion et perspectives

L'utilisation de la spectroscopie Raman, couplée à des méthodes statistiques multivariées, a permis une analyse semi-quantitative de molécules actives nanoencapsulées, dispersées dans un produit cosmétique de type film. Il s'agit d'une technique avec une grande spécificité au niveau moléculaire, mais en contrepartie elle présente des sensibilités différentes en fonction de la composition chimique des échantillons et par conséquent l'universalité de l'approche est une question qu'il faut se poser. Sera-t-il possible de quantifier n'importe quel actif cosmétique ? Que se passe-t-il si la matrice du film varie ? Les méthodes de prétraitement et d'analyse peuvent-elles être généralisées ou développées au cas par cas ? Encore de nombreuses questions persistent et montrent que les investigations dans ce domaine ne sont qu'à leurs prémisses. Afin de répondre à quelques-unes de ces questions, l'étude sur les films pourrait se poursuivre en modifiant notamment le type d'agents filmogènes (plus ou moins hydrophiles). Par exemple, le polyvinylpyrrolidone (PVP) ou encore le Glycopatch®, un polysaccharide anionique de haut poids moléculaire ($2x10^6$ Da) commercialisé par notre partenaire industriel SOLABIA.

La technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) a également permis de mettre en évidence la distribution homogène de l'actif PHE au sein des films de PVA. Cette observation nous laisse à penser que le produit fini serait alors plus efficace que si le PHE n'était pas encapsulé. En effet, si sa distribution est homogène dans le film, son application le sera alors très certainement sur la surface de la peau, améliorant son efficacité. Pour valider cette hypothèse, il va être question par la suite d'étudier la libération de l'actif du film. Tout d'abord *in vitro*, en mettant le film en contact avec des solutions de type éthanol ou octanol/eau (intervention de l'équipe ICMN, partenaire du projet MISTIC). Pour aller un peu plus loin, des études de pénétration cutanée *in vitro* pourront être réalisées en utilisant des cellules de Franz (implication du partenaire industriel, *Transderma Systems*). Le processus de séchage, et par conséquent l'évolution du film, sont conditionnés non seulement par des paramètres externes tels que l'humidité relative et la température ambiante mais aussi par la nature et l'état physiologique de la peau. Il faudra prendre en compte tous ces paramètres lors du lancement des tests de pénétration cutanée, afin de « reproduire » au mieux les conditions réelles d'utilisation de la solution filmogène.

L'étude mécanique et de mouillabilité des films nous a permis d'observer que l'incorporation des NS chargés en NanoPHE dans des films de PVA-GS ne modifiait pas les caractéristiques d'étirement ou le caractère hydrophile des films. C'est en effet important de s'assurer que l'incorporation des nanosystèmes dans le film n'impacte pas les propriétés de ce dernier ; notamment son élasticité pour le confort sur le peau, l'adaptation au mouvement, etc.

Chapitre 2 : Etude préliminaire de caractérisation et objectivation de nanosystèmes de polymères pour une application capillaire par imagerie de fluorescence

1. Développement de nanosystèmes pour des produits capillaires

1.1. Généralité sur le cheveu

La tige du cheveu se compose principalement de kératine et est divisée en trois parties : la médulla (partie centrale, aussi appelée moelle), le cortex (région médiane) et la cuticule (partie externe) (Figure 25).

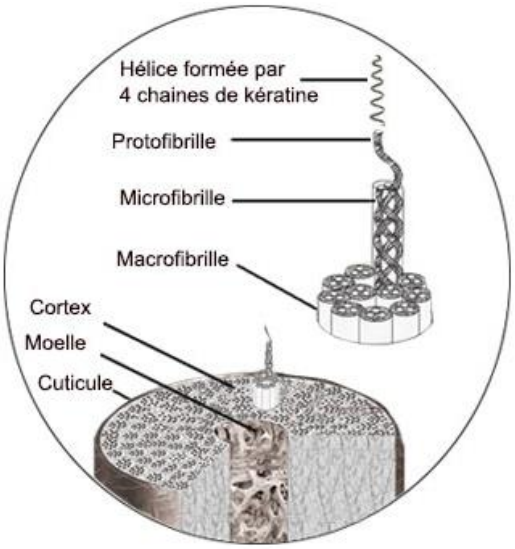


Figure 25: Structure du cheveu (https://activilong.com)

Cette organisation fournit à la fibre de cheveu une souplesse et une résistance mécanique. La kératine, qui représente environ 90% de la matière première des cheveux, est une protéine fibreuse complexe constituée essentiellement de glycine, de leucine et de cystéine. La cuticule est formée de 6 à 10 couches superposées de cellules mortes constituées de kératine et disposées en écailles orientées vers l'extrémité du cheveu. La cuticule est qualifiée de non mouillable à l'eau. La valeur du point isoélectrique (pKi - le pH pour lequel la charge électrique nette de la molécule est nulle) de la kératine étant basse (environ 3,67), dans la plupart des conditions physiologiques de pH la surface des cheveux porte une charge négative (Robbins, 2012). De plus, les cheveux sont exposés chaque jour à des effets nocifs tels que la lumière du soleil, la pollution, etc. Par exemple, les UV-B attaquent les pigments de mélanine et la kératine et les UV-A produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Tous ces processus augmentent le potentiel négatif de la surface capillaire (Cruz et al., 2016).

Les cosmétiques capillaires comprennent une multitude de substances, notamment des polymères naturels et/ou synthétiques, des détergents, des agents revitalisants, des conditionneurs, des substances

végétales et des vitamines présentes dans les shampooings, les après-shampooings et les produits coiffants. Les ingrédients les plus courants retrouvés dans les revitalisants capillaires sont les ammoniums quaternaires (INCI : Polyquaterniums), les alcools gras à longue chaîne, les agents filmogènes, les silicones, les huiles et les hydrolysats de protéines (Gavazzoni Dias, 2015).

1.2. Des nanosystèmes pour une application capillaire

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont rapporté que la voie des annexes cutanées devrait être considérée comme une voie efficace pour la pénétration des médicaments (Patzelt and Lademann, 2013). Les voies annexes peuvent impliquer le transport via les follicules pileux, les glandes sébacées et les canaux sudoripares. Comparés au *stratum corneum* (d'une épaisseur de 10 à 20 µm), les follicules pileux s'étendent plus profondément dans les tissus cutanés - jusqu'à 2 mm (Toll et al., 2004). Il a été démontré que les nanoparticules ont tendance à diffuser et s'accumuler dans les follicules pileux (Lademann et al., 2007; Matos et al., 2015). La stratégie de nanoencapsulation d'actifs permet donc d'améliorer leur pénétration dans les couches plus profondes de la peau, avec une possibilité d'administration prolongée. En partant de ce constat-là, beaucoup de travaux se sont axés sur le développement de nanosystèmes pour cibler les follicules pileux et traiter des maladies du cuir chevelu ou une perte anormale de cheveux (alopécie). Par exemple, des nanoparticules de chitosane ou encore lipidiques chargées en minoxidil se sont montrées prometteuses pour cibler et maintenir l'administration du médicament aux follicules pileux, pouvant améliorer le traitement topique de l'alopécie (Matos et al., 2015; Reis et al., 2014).

Sur la fibre capillaire, beaucoup moins d'études ont été menées. Des nanosystèmes ont été développés pour la coloration de cheveux humains, tels que des nanoparticules d'or (AuNPs), d'argent (AgNPs) ou encore des nanotubes chargés en colorants insolubles dans l'eau (Haveli et al., 2012; Santos et al., 2019; Tang et al., 2021). Le développement de nanosystèmes a également été envisagé afin de limiter la toxicité de certains produits chimiques impliqués dans les processus de teinture capillaire tel que l'agent de fabrication de colorant p-phénylènediamine (PDA). Par exemple, dans l'étude conduite par Lee en 2013, il a été montré que des nanoparticules hyaluroniques réduisait avec succès la toxicité du PDA et augmentait la viabilité cellulaire par rapport au PDA seul (Lee et al., 2013). Plus récemment, des nanosystèmes à base de zéine, une protéine dérivée du maïs, et de kératine, ont été développés pour délivrer des parfums sur les cheveux (Tinoco et al., 2021). Concernant les soins capillaires, Prasertpol et al. ont démontré le potentiel de transporteurs lipidiques nanostructurés en tant que traitement capillaire prometteur contre les dommages causés par les UV, la chaleur (230°C) et la décoloration (Prasertpol and Tiyaboonchai, 2020).

Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous consacrer aux nanosystèmes ciblant la fibre capillaire entière et non pas les follicules pileux.

1.3. Méthodes d'analyse *in vitro/in vivo* du cheveu

Il existe différentes méthodes pour évaluer les propriétés physiques et mécaniques des cheveux (Koch et al., 2020; Velasco et al., 2009). Elles peuvent être considérées comme des méthodes destructives ou non destructives. L'analyse chimique et la protéomique sont des méthodes destructives mais fournissent des données quantitatives informatives sur la composition chimique des échantillons de cheveux. La microscopie optique et la microscopie électronique à balayage (MEB) sont des méthodes non destructives. Les techniques de microscopie à force atomique (AFM) et MEB ont d'ores et déjà été utilisées pour évaluer les conditions morphologiques de la surface des cheveux après application d'une nanoémulsion photoprotectrice (Dario et al., 2020), de nanoparticules chargées en parfums (Tinoco et al., 2021), d'une coloration capillaire (Ahn and Lee, 2002; Bianchi et al., 2020) ou de traitements capillaires cosmétiques (Kaliyadan et al., 2016).

Concernant la pénétration de colorants, une étude qualitative peut être réalisée à l'aide d'images au microscope optique de coupes transversales de cheveux traités avec un colorant (Takahashi, 2018). Les caractéristiques de couleur de tous les échantillons de cheveux teints peuvent être mesurées photométriquement en termes de coordonnées CIELab, à l'aide d'un colorimètre.

La morphologie et la composition chimique des cheveux peuvent être déterminées par des analyses en spectroscopie à dispersion d'énergie et en spectroscopie photoélectronique aux rayons X (Tang et al., 2021).

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) a été utilisée pour différencier les cheveux teints et non teints (Boll et al., 2017). Cette technique a permis également d'étudier les modifications des groupes fonctionnels de la fibre de kératine des cheveux après coloration (Tang et al., 2021).

La spectroscopie confocale Raman a été utilisée pour étudier les fibres capillaires entières (Pudney et al., 2013).

Les techniques à base de fluorescence sont extrêmement sensibles, permettant de détecter de très faibles concentrations de molécules. De plus, elles permettent d'étudier aussi bien des modifications de structure que d'environnement moléculaire. Les développements récents de la microscopie en mode confocal ont ouvert la voie pour ces techniques vers une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. Dans un contexte d'analyse capillaire, il faut prendre en considération que les cheveux présentent des caractéristiques émissives dans la région du visible, principalement en raison de l'absorption et de l'émission de la mélanine et de ses dérivés/précurseurs. Par conséquent, dans les cheveux naturellement pigmentés, la mélanine entraînera l'absorption de la lumière laser et l'autofluorescence subséquente de l'échantillon. Ces propriétés émissives des cheveux dans le visible ont pu être utilisées comme outil d'évaluation des dommages causés aux cheveux et pour soutenir une revendication de protection des cheveux (Pavani et al., 2018). Cependant, lorsque la technique de fluorescence est utilisée pour suivre la fixation d'un marqueur fluorescent et/ou la coloration du cheveu, des fibres capillaires naturelles sans/ou peu pigmentées sont préférées (Haveli et al., 2012). Parfois des sections transversales du cheveux sont réalisées, ce qui nécessite des appareils et techniques spécifiques (microtome) (Haveli et al., 2012).

2. Objectifs de l'étude

Différentes études traitent de l'intérêt des nanosystèmes pour l'administration de médicaments dans les follicules pileux (Lademann et al., 2015, 2007; Lekki et al., 2007) mais peu d'études traitent des cosmétiques basés sur les nanotechnologies pour le soin ou la teinture des cheveux (Rosen 2015).

En cosmétique capillaire, deux choix sont possibles : on peut soigner le cheveu ou alors l'embellir, le colorer. Lorsque l'on soigne le cheveu, on cible à la fois la fibre capillaire mais également le bulbe du cheveu (action sur la repousse par exemple). Lorsqu'on veut le colorer, on va cibler la totalité de la fibre capillaire (de la racine jusqu'aux pointes). Dans tous les cas, que ce soit la fibre ou le cuir chevelu visé, il est impératif que le traitement interagisse de manière optimale avec ces zones.

La coloration d'oxydation, appelée coloration permanente, est largement utilisée pour recouvrir les pigments naturels du cheveu. Elle est employée avec un oxydant (peroxyde d'hydrogène) qui déclenchera la synthèse du colorant et détruira les structures mélaniques du cheveu. Il est également courant d'utiliser un liquide alcalin (par exemple de l'ammoniaque) pour gonfler la tige capillaire, desserrer les écailles et laisser les molécules colorantes (ou précurseurs) pénétrer dans le cortex. Une fois la molécule colorante ancrée dans le cortex, on applique des produits à pH acide, qui à l'inverse du liquide alcalin, permettront de refermer les écailles du cheveu. Tout ce processus de coloration agresse le cuir chevelu et déstructure la cuticule censée protéger les cheveux de toutes les agressions extérieures.

L'étude qui va suivre vise donc à étudier l'intérêt de la nanoencapsulation d'une molécule colorante pour permettre sa pénétration dans la fibre capillaire, jusqu'au cortex, sans utiliser d'oxydants ou d'agents alcalins. L'idée est donc d'étudier la profondeur de pénétration d'un colorant encapsulé ainsi que sa quantité et ce en limitant la préparation de l'échantillon, c'est-à-dire sans préparer des coupes de cheveux. Dans ce chapitre de thèse, nous allons donc étudier l'utilité que peut nous apporter la technique de microspectroscopie de fluorescence pour mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de nanosystèmes pour appliquer des produits/colorants capillaires sans oxydation préalable de la fibre. Dans cette étude, une molécule « colorante » modèle, le rouge de Nile (abrégé NR pour *Nile red*), sera encapsulée dans des nanosystèmes de polymères PF127. Les fonctions hydroxyles terminales du PF127 seront modifiées pour obtenir *in fine* des nanosystèmes avec une surface chargée positivement. On suppose que ce caractère cationique favorisera les interactions électrostatiques avec le cheveu.

3. Matériel et Méthodes

3.1. Matériels

Le Pluronic® F127 (PF127) a été fourni par BASF (Ludwingshafen, Allemagne), 1,1'-carbonyldiimidazole (CDI), éthylènediamine (EDA), acide p-toluènesulfonique (PTSA), carbonate de diméthyle (DMC) et l'acide 2,4,6-trinitrobenzènesulfonique (TNBS, 5% w/v) proviennent de Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le THF anhydre provient de Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France). Tous les autres solvants étaient de qualité analytique ou chromatographique. Les membranes de dialyse (MWCO 2 kDa) proviennent de chez BioValley (Marne La Vallée, France). L'eau ultrapure a été produite à l'aide d'un système Milli-Q, Millipore (Paris, France).

3.2. Modification chimique du Pluronic® commercial F127

3.2.1. Protocole de synthèse du bis(amino)-Pluronic® (abrégé par PF127-NH_2)

L'ajout de fonctions amines aux extrémités du PF127 a d'ores et déjà été réalisé au sein du laboratoire par le Dr. Katel Hervé-Aubert (Chiper et al., 2013). Cette modification se réalise en deux étapes :

Etape 1 : Un excès de 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI, 0,5 g, 3 mmol) est dissous dans du THF anhydre (200 mL) à température ambiante (TA). Le PF127 (5 g, 0,4 mmol) est ajouté et le mélange est maintenu sous agitation pendant une nuit sous atmosphère d'azote. Afin d'éliminer le CDI n'ayant pas réagi, le polymère est précipité avec 600 mL d'éther diéthylique. Après filtration, le polymère est dissout dans du THF, puis précipité à nouveau dans de l'éther. Ce processus est répété trois fois. Le polymère F127 activé par le CDI (PF127-CDI) a été obtenu sous forme de poudre blanche après séchage sous vide.

Etape 2 : Le PF127-CDI est dissous dans du THF anhydre (60 mL) à TA et sous atmosphère d'azote. Une solution composée de 10 mL d'éthylène diamine et de 10 mL de THF est ajoutée goutte à goutte (1h) en utilisant une ampoule à brome. Après 24h, le THF et l'éthylène diamine n'ayant pas réagi sont éliminés par évaporation sous vide. Afin de purifier le polymère modifié PF127-NH_2, le résidu est dialysé contre de l'eau distillée (MWCO de 2 kDa). Le produit purifié PF127-NH_2 est enfin lyophilisé.

3.2.2. Caractérisation de la modification du polymère PF127-NH_2

La modification du polymère a été caractérisée à l'aide de deux méthodes : la RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) et un dosage en CLHP-UV. Le dosage CLHP-UV des amines greffées sur le polymère PF127-NH_2 a été réalisée avec l'aide du Dr. Martin Soucé.

Protocole : 125 µL de TNBS aqueux (à 27 mM), 310 µL de solution aqueuse de PF127-NH_2 (à 20 g/L), 315 µL d'eau distillée et 500 µL de tampon borate 0,2 M pH = 9,2 (préparé à partir de tétraborate de sodium, $Na_2B_4O_7$

-10H_2O) ont été agités pour assurer un mélange parfait et ont été laissés au repos pendant 1h30 à température ambiante (TA).

Le dosage de PF127-NH-TNB a été réalisé grâce à la technique de chromatographie liquide à haute performance (CLHP-UV, système LC 10A, Shimadzu, Japon) opérée à 340 nm. Une colonne en phase inverse (Kromasil 5 µm C18 150x4,6 mm, Interchim) a été utilisée à TA. Afin de quantifier le pourcentage d'amines greffées sur le PF127, la phase mobile est constituée d'isopropanol et d'eau (0,01 M H_3PO_4). La solution de PF127-NH_2 a été injectée à un volume de 5 µL et le débit était de 1,0 mL/min. Le pourcentage d'amines du PF127-NH_2 a été déterminé en comparant les aires de pic avec une courbe étalon d'éthylène diamine (EDA) après réaction avec du TNBS.

3.3. Formulation de nanomicelles de polymères

Une solution de rouge de Nile dans du carbonate de diméthyle (DMC) est préparée à 250 ou 8 µg/mL (dépendant du type de lot de nanomicelles). Le polymère PF127 commercial ou modifié (PF127-NH_2) a été dissous dans du PBS 1X à 20 mg/mL ou 50 mg/mL. La phase aqueuse a été filtrée sur un filtre de PES de 0,45 µm et le pH a été ajusté à 7 avec une solution d'HNO_3 (1M). L'émulsion a été réalisée avec une sonde à ultrasons Vibracell pendant 3 minutes (20 kHz, amplitude 30%, Vibracell 75041 - Sonics) en injectant la phase organique dans la phase aqueuse directement après le début des ultrasons. Le DMC a été immédiatement évaporé sous pression réduite (45 min, 67 mbar, 25°C). Le volume a été ajusté à 15 mL avec du PBS 1X et les nanomicelles ont été purifiées par filtration sur 0,22 µm. L'échantillon est conservé à température ambiante.

3.4. Etude préliminaire de l'intérêt de l'imagerie confocale de fluorescence pour évaluer l'intérêt des nanosystèmes pour une application capillaire

Cette partie a été encadrée par le Pr. Igor Chourpa, spécialiste du domaine. Toutes les analyses de fluorescence ont été réalisées sous un objectif x10 ou x50 d'un microspectromètre confocal à balayage laser LabRAM (Horiba Jobin-Yvon, France) équipé d'une source laser à 491 nm (modèle CalypsoTM 75, Cobolt Suède), du réseau 300 traits/mm et d'un détecteur CCD refroidi par effet Peltier. Toutes les mesures ont été effectuées à température ambiante. La fluorescence du rouge de Nile a été évaluée dans deux situations : (i) en suspension aqueuse de nanomicelles (une goutte de 10 mL déposée sur un support en verre) ; (ii) sur les fibres capillaires (cheveux blancs asiatiques traitées pendant 10 min avec la suspension de nanomicelles ou avec une solution contrôle de rouge de Nile dans l'éthanol). Les fibres ont été fixées sur une lame de microscope en verre à l'aide d'un ruban adhésif et séchées à l'air libre. Les spectres d'émission de fluorescence dans l'intervalle entre 500 et 780 nm ont été enregistrés avec 1 ou 5 accumulation(s) de 0,01 à 5 secondes en fonction des échantillons. Aucune photodégradation des échantillons n'a été observée dans les conditions utilisées.

4. Résultats et Discussion

4.1. Modifications chimiques et caractérisations

Dans l'optique de développer un produit capillaire, le polymère PF127 a été modifié pour obtenir un polymère aux extrémités chargées positivement ($-NH_3^+$) et donc, *in fine*, des nanosystèmes avec une surface chargée positivement. Cette charge positive est supposée favoriser les interactions électrostatiques avec les fibres capillaires (Gavazzoni Dias, 2015). Dans la présente étude, les groupes hydroxyles terminaux du copolymère PF127 ont subi une modification afin d'obtenir des amines primaires terminales (abrégé PF127-NH_2). Brièvement, les groupes hydroxyles du PF127 ont été activés avec du 1,1' carbonyldiimidazole (CDI) pour former des carbamates d'imidazole intermédiaires actifs qui ont ensuite réagi avec de l'éthylènediamine pour donner des groupements amines en position terminale (Figure 26).

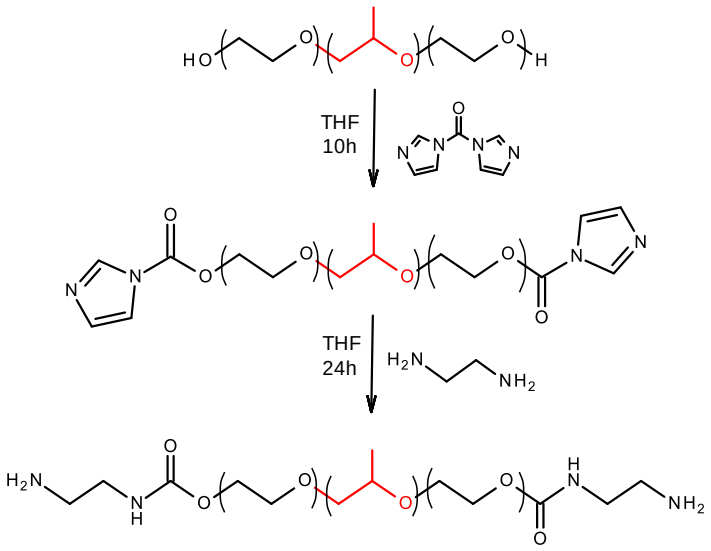


Figure 26: Synthèse du PF127-NH_2

L'insertion de fonctions amines aux extrémités du polymère PF127 a été confirmée par RMN ^1H (Figure 27). Le spectre RMN ^1H du copolymère PF127 montre des pics à 1,1 ppm, 3,4 ppm et 3,55 ppm attribués respectivement aux $-CH_3$, -CH- et $-CH_2$- des unités PPO. Le pic à 3,65 ppm est attribué aux protons des unités répétitives PEG ($-CH_2$-). Le signal large à 2,4 ppm indique la présence de groupements amines terminaux (Gyulai et al., 2016).

Au vu du matériel disponible au sein du laboratoire et de la non-absorption du polymère PF127 en UV, il a fallu mettre en place une méthode de dosage permettant de déterminer les teneurs en amines dans le polymère PF127 modifié. L'utilisation du TNBS comme réactif pour la détermination des concentrations d'amines est largement acceptée depuis son introduction en 1960 par Satake *et al.* (Satake et al., 1960). La teneur en amine peut être directement liée à l'absorbance du mélange réactionnel de trinitrophénylation après une période d'incubation relativement courte à pH=9 et à température ambiante. Ici, la réaction de trinitrophénylation conduit à la formation du complexe PF127-amino-TNB qui absorbe à 340 nm ou 420 nm selon que le groupe amine soit chargé ou non, respectivement (Snyder and Sobocinski, 1975).

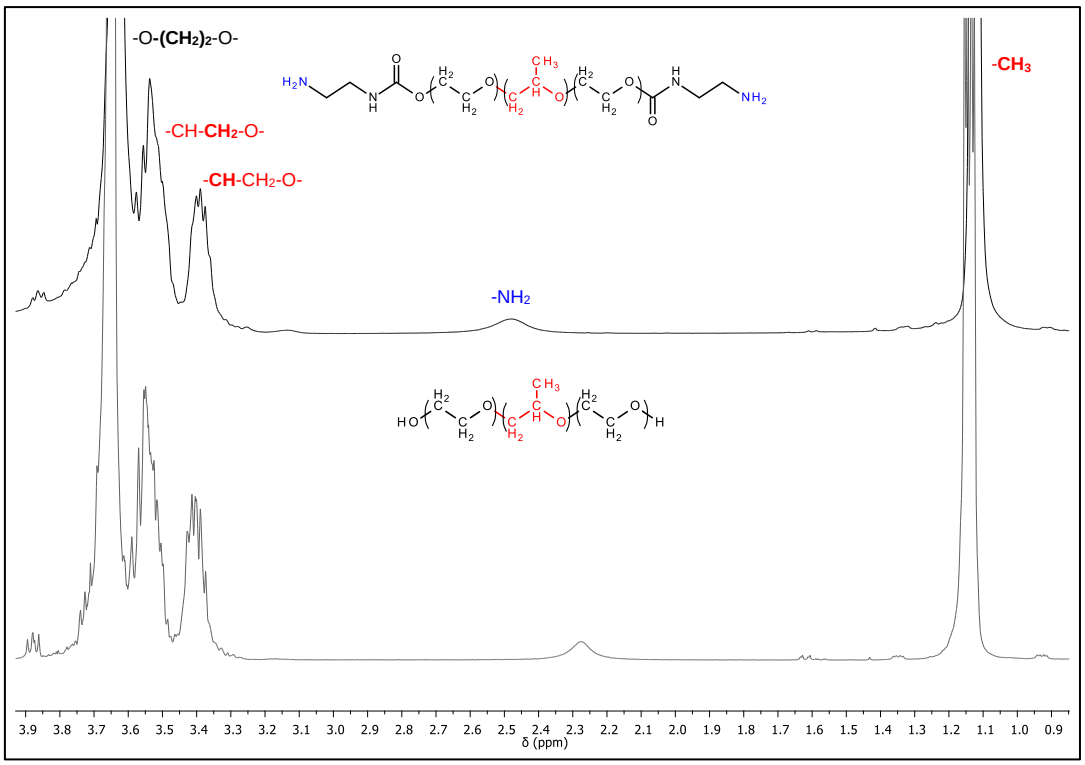


Figure 27: Spectre RMN ^{1}H du PF127 commercial (bas) et du PF127-NH_2 (haut) dans le chloroforme deutéré

Après analyse CLHP-UV, en conditions acides (Figure 28), le dosage a montré que 53 ± 14% des fonctions hydroxyles du polymère étaient transformées en fonctions amines (n=3). Cette méthode ne permet pas de distinguer la forme mono-substituée (HO-PF127-NH_2) de la forme bi-substituée (H_2N-PF127-NH_2).

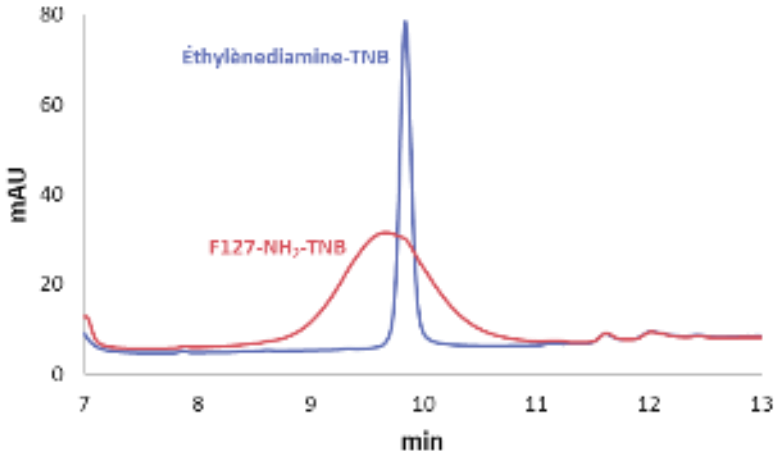


Figure 28 : Chromatogramme CLHP-UV du dosage des amines terminales du F127-NH_2. En rose, les amines terminales du Pluronic modifié après réaction avec le TNBS. En violet, l'éthylènediamine après réaction avec le TNBS.

Nous avons évalué que cet ajout d'environ 50% de fonctions amines suffirait à apporter une surface positive aux futures nanomicelles développées, améliorant leur adhésion avec la fibre capillaire, sans diminuer leur stabilité en suspension. Nous n'avons donc procédé ni à une optimisation de la synthèse ni à une purification poussée du polymère modifié.

4.2. Préparation de nanomicelles par méthode d'émulsion-évaporation de solvant

La technique dite d'émulsion-évaporation de solvant assistée par ultrasons a été utilisée pour préparer des nanomicelles de PF127-NH_2 chargées en rouge de Nile. On rappelle ici que la formation de nanomicelles de PF127 dépend de deux facteurs : la concentration de polymères utilisée lors du processus de formulation et la température. En effet, c'est seulement au-dessus d'une certaine concentration appelée concentration micellaire critique (CMC) et d'une certaine température micellaire critique (CMT) que les copolymères s'auto-assembleront en milieu aqueux sous forme de micelles très stables. Gyulai *et al*. ont décrit une modification de PF127 similaire à celle rapportée dans ce chapitre. Il a notamment été montré que la modification chimique du PF127 n'altérait pas significativement la polarité et la propriété d'association des molécules dans un environnement aqueux. Ainsi, les valeurs de CMC étaient similaires pour le PF127 commercial et pour son dérivé aminé : respectivement 3,3 et 2,4 g/L (25°C) (Gyulai et al., 2016).

Lors de cette étude, un premier lot de nanomicelles à base de polymères modifiés (PF127-NH_2) a été réalisé avec pour concentration théorique : 20 g/L (soit 2%), donc bien au-dessus de la CMC à 25°C. D'autres lots de nanomicelles ont été réalisé avec cette fois une concentration plus élevée de polymères PF127-NH_2 lors de la formulation (50 g/L, soit 5%) et une concentration initiale en rouge de Nile plus faible (Tableau 6). Dans l'optique d'étudier l'impact de la charge du polymère sur la fixation du rouge de Nile sur la fibre capillaire, une suspension « contrôle » a été réalisée en utilisant cette fois du polymère commercial PF127 (5%).

Tableau 6: Caractéristiques des lots de nanomicelles de polymères préparés

	Diamètre Hydrodynamique (25°C)	PdI (25°C)	Concentration en rouge de Nile
Nanomicelles PF127-NH_2 (2%) chargées en rouge de Nile	29,07 ± 0,84 nm	0,223 ± 0,011	6,66 µg/mL
Nanomicelles PF127-NH_2 (5%) chargées en rouge de Nile	30,4 ± 2,53 nm	0,267 ± 0,010	0,71 µg/mL
Nanomicelles PF127 (5%) chargées en rouge de Nile	30,83 ± 0,7 nm	0,243 ± 0,007	0,55 µg/mL

La taille des nanomicelles en solution aqueuse issue de l'analyse DLS révèle une distribution quasi gaussienne des micelles avec un diamètre moyen d'environ 30 nm, valeur proche de celles retrouvées dans la littérature pour une concentration équivalente en polymères (Singla et al., 2019). Les suspensions aqueuses de nanomicelles présentent de faibles valeurs de PdI (< 0.3) indiquant des populations de distribution de taille plutôt étroite. La charge théorique en rouge de Nile d'une micelle individuelle est proche de 0,03 % m/m pour le lot à 2% de PF127-NH_2 et à 0,001 % m/m pour les lots à 5% de PF127-NH_2. Dans la suite du document, les nanomicelles de poloxamères chargées en rouge de Nile seront abrégées par NanoNR.

4.3. Imagerie confocale de fluorescence pour évaluer l'intérêt des nanosystèmes pour une application capillaire

Des fibres de cheveux blancs asiatiques ont été utilisées car la teneur élevée en mélanine dans les cheveux naturellement pigmentés entraîne l'absorption de la lumière laser et l'autofluorescence subséquente de l'échantillon et/ou sa photodégradation. Par conséquent, les analyses de spectroscopie optique sont limitées aux fibres capillaires naturelles sans pigment ou peu pigmentées. Malgré une variabilité significative de la forme des cheveux humains selon l'ethnicité, la composition chimique des protéines capillaires est uniforme dans tous les groupes ethniques (Tobin, 2006).

Le rouge de Nile (abrégé NR pour *Nile red*) est utilisé en tant que marqueur lipophile fluorescent pour étudier l'interaction des nanosystèmes à base de PF127 avec les fibres capillaires. Dans un premier temps, des nanomicelles de PF127-NH_2 (2%) chargées en rouge de Nile ont été préparées sous forme d'une suspension aqueuse (abrégée NanoNR). Une solution contrôle de rouge de Nile libre dans de l'éthanol (abrégé NR éthanol) a également été préparée afin d'évaluer l'intérêt de la forme encapsulée du rouge de Nile pour une application capillaire. Ces deux échantillons (NR encapsulé en suspension aqueuse ou NR libre en solution éthanolique) ont été préparés de sorte à avoir les mêmes concentrations en rouge de Nile (6,66 µg/mL). Les cheveux blancs ont été incubés 10 minutes dans l'un de ces deux échantillons, puis séchés à l'air libre. Une fois secs, une zone de la surface de chaque cheveu a été analysée sous l'objectif x50 du microspectromètre confocal de fluorescence décrit plus haut. Les données spectrales de fluorescence ont été traitées à l'aide du logiciel LabSpec. L'intensité moyenne de fluorescence du NR des cheveux traités est montrée sur la Figure 29 : elle est de 310 ± 127 u.a. pour NR éthanol et de 1970 ± 317 u.a. pour NanoNR. Cette première expérience a pu mettre en avant l'intérêt d'encapsuler le rouge de Nile dans des nanosystèmes PF127-NH_2 afin d'augmenter la quantité du colorant interagissant avec le cheveu.

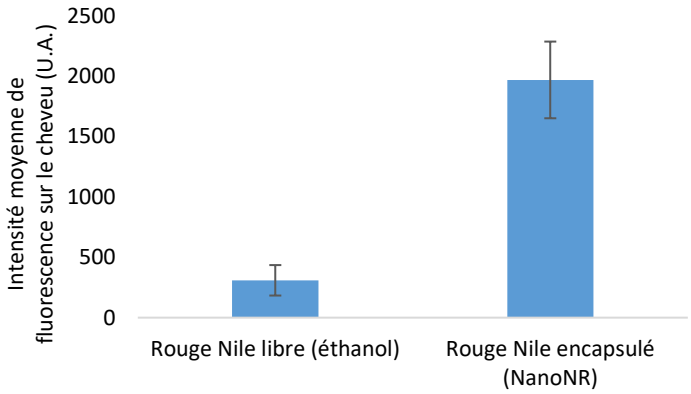


Figure 29: Intensité moyenne de fluorescence du rouge de Nile (NR) sur des cheveux blancs (n = 3) incubés 10 minutes dans une solution éthanol de NR (abrégée NR éthanol) ou dans la suspension de nanomicelles PF127-NH_2 (2%) (abrégée NanoNR).

Le rouge de Nile a notamment été choisi car son profil de fluorescence (intensité et forme du spectre) varie en fonction de son environnement moléculaire (Bastiat et al., 2013). En effet, les spectres d'émission de certaines substances fluorescentes contenant des substituants polaires sur les cycles aromatiques sont connus pour leur sensibilité à la polarité du milieu. Le rouge de Nile en fait partie. Lors d'une augmentation de la polarité du solvant, les spectres d'excitation et d'émission du NR subissent un décalage bathochrome (c'est-à-dire un décalage vers des plus grandes longueurs d'onde) et l'intensité d'émission diminue, jusqu'à son extinction une fois dans le milieu aqueux (Greenspan and Fowler, 1985; Sackett and Wolff, 1987). Cette propriété de solvatochromie nous permettra notamment d'évaluer l'environnement du NR et de déterminer, entre autres, son interaction potentielle avec la fibre capillaire.

La première étape consistait à évaluer le(s) profil(s) de fluorescence du NR dans les NanoNR (PF127-NH_2, 2%, 6,66 µg/mL), en suspension aqueuse et après leur séchage à température ambiante. La Figure 30 regroupe les différents profils de fluorescence du NR obtenus.

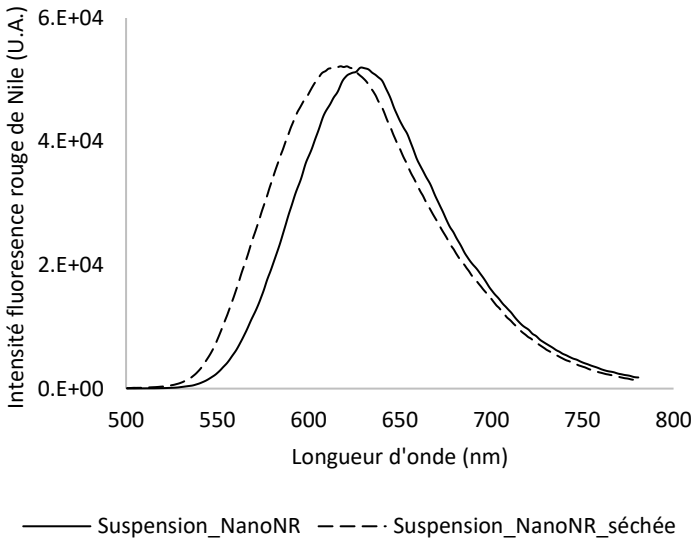


Figure 30 : Spectres caractéristiques d'émission de fluorescence des NanoNR dispersées en solution aqueuse (trait plein, émission max. à 629 nm) ou séchées à température ambiante (~ 20°C) (trait pointillé, émission max. à 617,5 nm).

En suspension aqueuse NanoNR, le profil de fluorescence est observé avec un maximum d'émission à 629 nm. Ainsi, le NR est bien encapsulé dans des nanomicelles, autrement sa fluorescence aurait été inhibée par le milieu aqueux. Après séchage de la suspension NanoNR à température ambiante, le maximum d'émission de fluorescence est décalé à 617,5 nm. Cet effet hypsochrome pourrait indiquer que le séchage induit la réorganisation des nanomicelles et favorise la diminution de la polarité de l'environnement du NR se trouvant plus proche du cœur hydrophobe des nanomicelles.

La fluorescence du NR a ensuite été étudiée sur/dans des fibres capillaires traitées comme décrit plus haut : les 3 profils caractéristiques trouvés sur les fibres en fonction de la zone du cheveu analysée sont montrés sur la Figure 31.

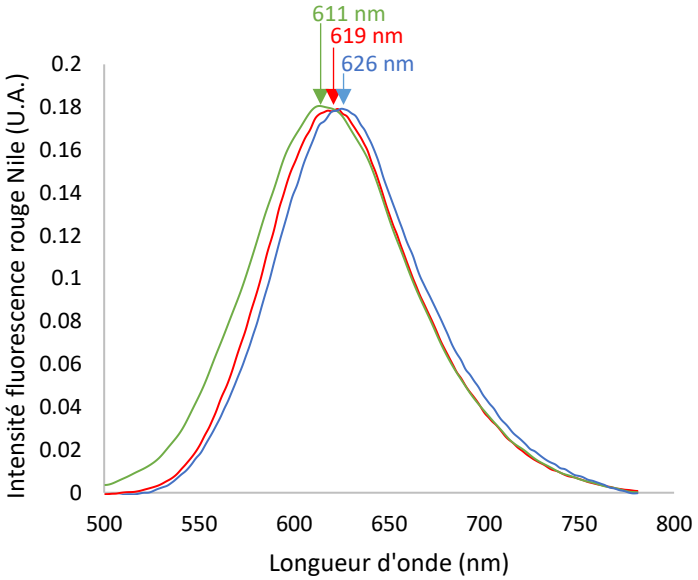


Figure 31: Spectres caractéristiques d'émission de fluorescence du rouge de Nile à partir de divers endroits sur/dans les fibres capillaires incubées pendant 10 min avec la nanosuspension NanoNR et séchées à l'air libre.

Le spectre bleu (émission maximale à 626 nm) correspondrait au NR encapsulé dans les nanomicelles initiales (entourées d'eau). Le spectre rouge (maximum d'émission à 619 nm) correspondrait au NR encapsulé dans les nanomicelles réorganisées après évaporation de l'eau environnante. Le spectre vert (émission maximale à 611 nm) correspondrait au NR dans un environnement encore moins polaire que celui dans les nanomicelles séchée à l'air libre. Des études ont déjà montré qu'un décalage du maximum d'émission de 630 à 611 nm est typiquement observé lorsque les molécules du NR se lient à des sites hydrophobes et apolaires à la surface d'une protéine (Sackett and Wolff, 1987; Sutter et al., 2007). Ce décalage hypsochrome et l'élargissement du spectre vert, par rapport au bleu et au rouge, sont alors probablement dus à l'interaction du NR avec les protéines capillaires. Cela supposerait une libération partielle du rouge de Nile du noyau hydrophobe des nanomicelles.

Après avoir réalisé un balayage des zones du cheveu à différentes profondeurs, chaque spectre de fluorescence est reconstitué avec une combinaison proportionnelle de ces 3 spectres caractéristiques (modèles d'environnement moléculaire) vert, rouge et bleu. Les coefficients de cette reconstitution (% de contribution) sont utilisés pour générer les cartographies de répartition de ces modèles, visualisées avec les couleurs correspondantes. La Figure 32 compile les résultats obtenus à la surface d'une fibre capillaire traitée avec la suspension de NanoNR et séchée à l'air libre.

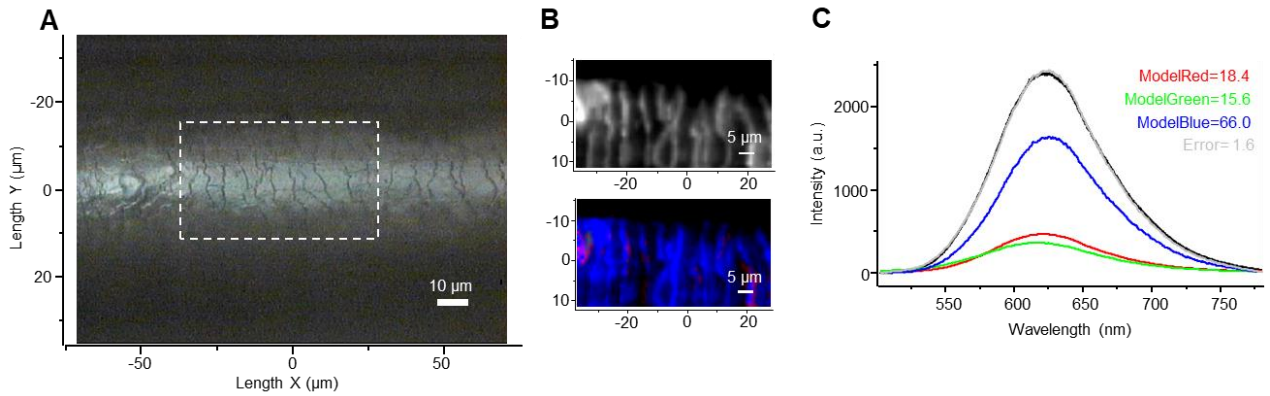


Figure 32: A. Image en lumière blanche (objectif x50) d'une zone sélectionnée (traits pointillés) à la surface d'une fibre capillaire incubée 10 mn dans la suspension de NanoNR et séchée à l'air libre. B. Cartes de fluorescence de la zone sélectionnée. En haut : intensité de fluorescence globale ; en bas : superposition de cartes de trois spectres caractéristiques (modèles rouge, vert et bleu montrés dans la fenêtre C). C. Spectre moyen de la zone reconstitué avec une combinaison des trois spectres modèles : les coefficients de la reconstitution (% de contribution) sont montrés en haut à gauche du spectre.

Sur l'image en lumière blanche, des écailles des cheveux sont clairement observées. Ils se distinguent encore mieux avec les résultats de fluorescence : la forte intensité dans les creux indique une accumulation de NR. Concernant les contributions des trois spectres modèles, il semble qu'à la surface du cheveu l'environnement du NR soit le plus polaire parmi ceux décrits : 66 % de contribution du modèle bleu par rapport aux modèles vert et rouge qui sont respectivement de 16 et 18 %. Ainsi, à la surface du cheveu, le profil de fluorescence est proche de celui observé dans la suspension ce qui signifie que les NanoNR déposées sur la fibre capillaire sont encore entourés d'eau (séchage incomplet, résidus de molécules d'eau).

Les fibres capillaires ont ensuite été balayées dans le plan d'une section optique située 5 micromètres sous la surface (Figure 33).

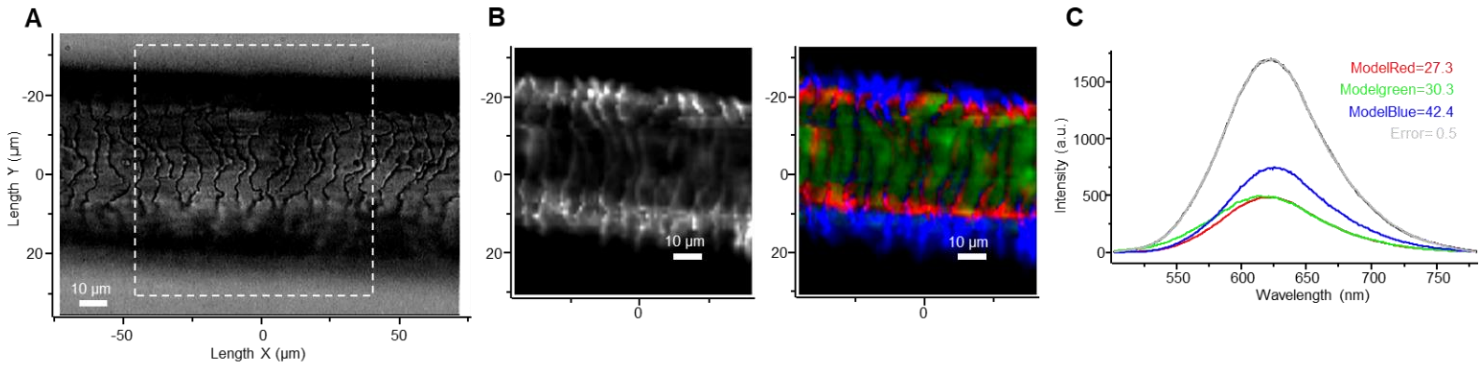


Figure 33: A. Image en lumière blanche (objectif x50) d'une zone sélectionnée (trait pointillé) sur une fibre capillaire incubée 10 mn dans la suspension de NanoNR et séchée à l'air libre. B. Cartographie spectrale de fluorescence d'une coupe optique du cheveu située à 5 micromètres sous la surface de la fibre. Gauche : intensité globale de fluorescence - droite : superposition de cartes des trois spectres caractéristiques (modèles rouge, vert et bleu montrés dans la fenêtre C). C. Spectre moyen de la zone reconstituée avec une combinaison des trois spectres modèles : les coefficients de la reconstitution (% de contribution) sont montrés en haut à gauche du spectre.

On distingue encore les écailles des cheveux. A la surface de la fibre (zones bleues) le signal issu des creux est plus intense, tandis que dans les zones plus profondes (vertes et rouges) la fluorescence est moins intense (les creux sont plus foncés). Lorsque le NR pénètre dans les cheveux, l'émission maximale de fluorescence se décale vers la gauche, donc l'environnement du NR change : d'abord il devient moins polaire (augmentation de la contribution du profil rouge), puis dans les zones vertes, en plus de l'hydrophobie, des interactions moléculaires avec la matrice sont supposées.

Le choix du NR comme molécule « colorante » modèle, couplé à l'utilisation de la technique de fluorescence, nous permet de conclure plusieurs choses :

1. La suspension de NR permet un dépôt de colorant plutôt homogène tout le long du cheveu.
2. En surface, le NR est encore sous sa forme encapsulée dans les NanoNR mais plus on pénètre dans la fibre et plus il est sujet à se libérer/dissocier de son nanovecteur et à interagir avec la fibre capillaire.

Il reste néanmoins une question importante : la modification chimique du PF127 est-elle réellement nécessaire ? Pour cela, le prochain objectif a été de comparer les intensités moyennes de fluorescence du cheveu après incubation avec un lot dit commercial (à base de PF127) et d'un lot dit modifié (à base de PF127-NH_2). Les polymères ne possédant pas les mêmes propriétés physico-chimiques, il n'a pas été possible de produire deux lots comparables de nanomicelles, notamment la concentration de NR encapsulé, lorsque les concentrations de polymères étaient de 2% m/v lors de l'étape de formulation. Par conséquent, nous avons augmenté les quantités de polymères à 5% m/v et diminué celles en NR. Les deux lots obtenus étaient alors comparables (Tableau 6) ; les tailles des nanomicelles étaient similaires (environ 30 nm) ainsi que la quantité du NR encapsulé (environ 10 µg/mL).

La fluorescence du NR en suspension a été mesurée (Figure 34). On obtient une fluorescence plus importante dans les suspensions dites modifiées (+20%), ce qu'il faudra prendre en compte lors de l'analyse quantitative des résultats de fluorescence sur le cheveu. Le profil du spectre n'est pas changé.

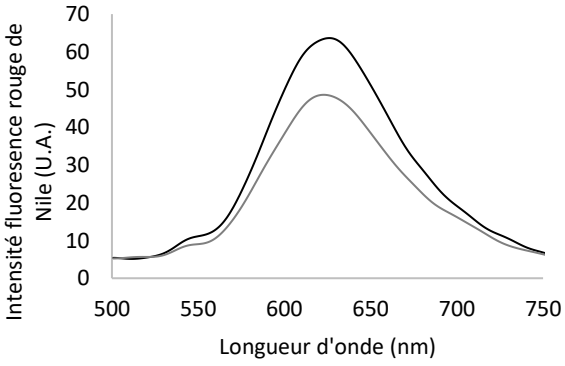


Figure 34 : Spectres d'émission de fluorescence caractéristiques du rouge de Nile chargé au sein de nanomicelles de polymères commerciaux (PF127, en gris) ou modifiés (PF127-NH_2, en noir) dispersées en solution aqueuse.

Comme précédemment, les cheveux blancs sont incubés 10 mn avec la suspension NanoNR, soit dite commerciale ou celle dite modifiée (5% en polymères lors de la formulation). Après fixation sur des lames en verre, les cheveux sont séchés à l'air libre. En prenant comme repère la moelle (medulla) du cheveux, Il est possible, à l'aide du microspectromètre confocal de se placer soit à la surface du cheveu (Figure 35A), soit au cœur du cheveu (Figure 35B).

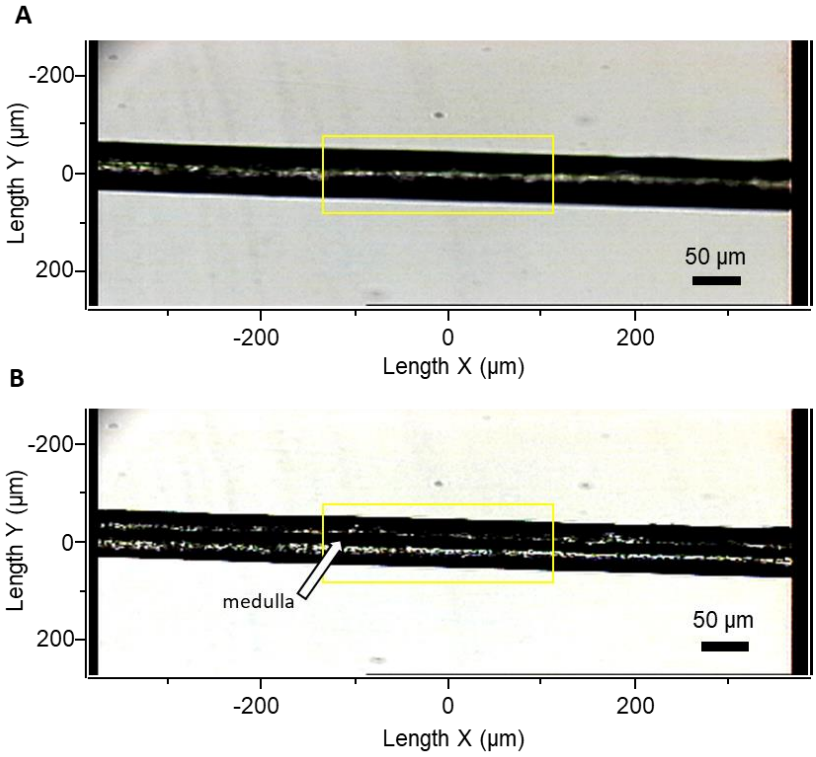


Figure 35: Image en lumière blanche (objectif x10) d'une zone sélectionnée (trait jaune) sur une fibre capillaire incubée 10 mn dans la suspension de nanomicelles modifiées (PF127-NH_2) et séchée à l'air libre. A. Image en lumière blanche de la surface de la fibre capillaire (contours de la fibre nets, surface au milieu claire). B. Image en lumière blanche du cœur de la fibre capillaire (repère : la medulla noire aux bords nets).

On réalise alors des cartographies de fluorescence, à la surface mais aussi au cœur du cheveu. Pour chaque type de nanosuspensions testées, plusieurs zones (en jaune dans la Figure 35 précédente) sont analysées sur chaque fibre. L'intensité moyenne de fluorescence a été mesurée pour chaque zone et compilée dans la Figure 36. On peut remarquer une tendance se dessiner. En effet, on obtient une intensité de fluorescence plus élevée avec les nanomicelles NanoNR modifiées, que ce soit à la surface ou au cœur du cheveu. En effet, pour les nanomicelles modifiées, l'intensité moyenne de fluorescence est de 262 ± 116 u.a. dans le cœur du cheveu et de 200 ± 103,5 u.a. à la surface. Pour les nanomicelles commerciales, l'intensité moyenne de fluorescence est de 108 ± 75 u.a. dans le cœur du cheveu et de 68 ± 51 u.a. à la surface. A la surface du cheveu, l'intensité de fluorescence est environ 3 fois plus intense lorsque des nanomicelles modifiées avec des fonctions amines ont été utilisées. Au cœur du cheveu, l'intensité de fluorescence est environ 2,4 fois plus intense lorsque des nanomicelles modifiées ont été utilisées. Il ne faut cependant pas oublier que les suspensions de départ ne fluoresçaient pas de manière strictement équivalente ; +20% pour les suspensions

modifiées. Mais même en prenant en compte cette différence en divisant par 1,2 les valeurs d'intensité obtenues avec les NanoNR modifiées, on peut conclure que ces nanomicelles modifiées favorisent la fixation du NR sur le cheveu.

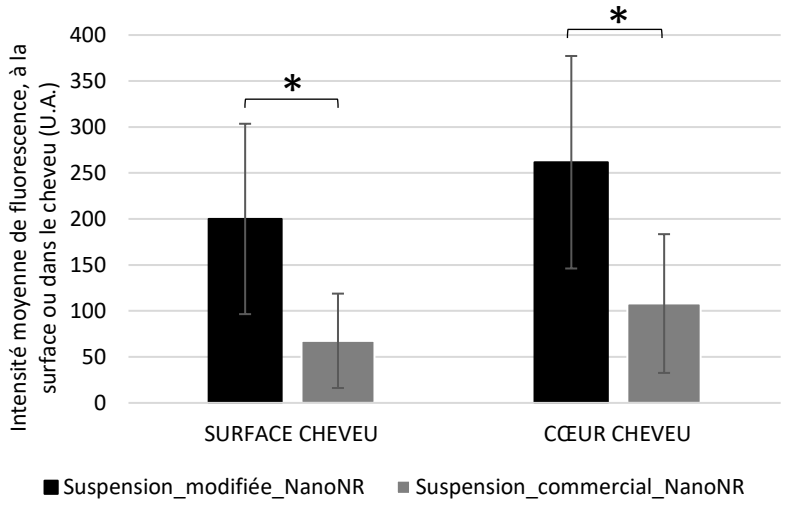


*Figure 36: Intensité moyenne de fluorescence du rouge de Nile (n > 5), à la surface ou au cœur de fibres capillaires incubées 10 mn dans la suspension de nanomicelles dites modifiées (PF127-NH_2, en noir) ou commerciales (PF127, en gris) et séchées à l'air libre. *p < 0.05 (test de Student)*

Il a ensuite été question de rincer les fibres capillaires (2 mn dans de l'eau ultrapure après les 10 mn d'incubation) afin d'étudier si la modification, et donc la charge positive des nanomicelles modifiées, avait un impact face à l'action mécanique de l'eau, susceptible de « décrocher » le traitement du cheveu. Les résultats sont compilés dans la Figure 37. Bien que la même tendance décrite précédemment semble se dessiner, on remarque que les résultats obtenus après rinçage ne diffèrent pas de manière significative entre les deux types de suspensions.

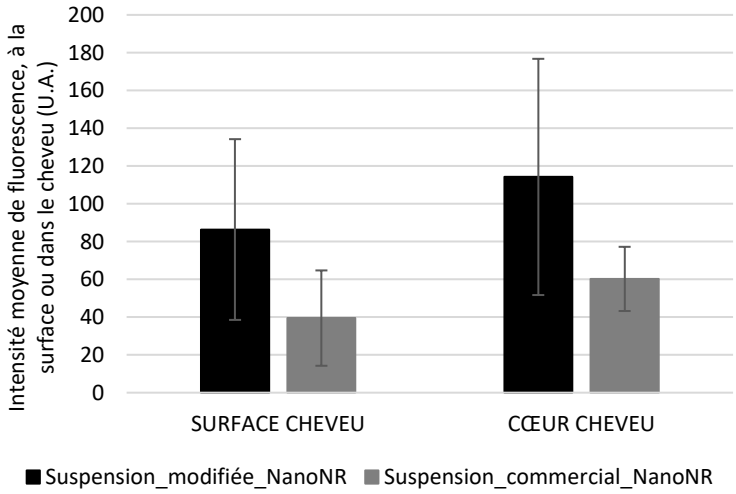


Figure 37: Intensité moyenne de fluorescence du rouge de Nile (n > 5), à la surface ou au cœur de fibres capillaires incubées 10 mn dans la suspension de nanomicelles dites modifiées (PF127-NH_2, en noir) ou commerciales (PF127, en gris), puis rincées 2 mn à l'eau et séchées à l'air libre.

Que ce soit à la surface ou dans le cœur du cheveu, le rinçage à fait chuter l'intensité moyenne de fluorescence d'environ 57% pour les cheveux traités avec les nanomicelles modifiées et de 43% pour les cheveux traités avec les nanomicelles commerciales. L'ajout d'une surface positive aux nanomicelles (PF127-NH_2) ne semble donc pas améliorer la résistance du traitement face au rinçage.

5. Conclusion et Perspectives

Les résultats décrits dans ce chapitre ne sont encore que préliminaires mais nous permettent déjà de répondre à plusieurs questions :

1. ***La nanoencapsulation est-elle nécessaire ?***

   Comparé à une forme libre du rouge de Nile (dans l'éthanol), sa forme encapsulée dans les nanomicelles de polymères (PF127-NH_2) a montré de meilleurs résultats quant à l'accumulation du traitement sur/dans la fibre capillaire.

2. ***Le dépôt du colorant sera-t-il homogène tout le long de la fibre capillaire présents ?***

   La suspension NanoNR permet un dépôt de colorant plutôt homogène, que ce soit à la surface ou au cœur du cheveu. En surface, le traitement a tendance à s'accumuler dans le creux des écailles.

3. ***Sous quelle forme le rouge de Nile se trouve sur la fibre capillaire suite à l'application des NanoNR : encapsulé ou libéré ?***

   En surface du cheveu, le NR est encore sous sa forme encapsulée, mais il se libère des nanovecteurs, pénètre dans la fibre et interagit avec les poches hydrophobes de protéines telles que la kératine.

4. ***La modification chimique de surface des nanomicelles est-elle pertinente ?***

   L'ajout d'une surface positive sur la nanomicelles permet une plus grande accumulation du traitement sur et dans la fibre capillaire. Cependant, ceci ne permettra pas d'éviter le « décrochage » du traitement suite au rinçage à l'eau.

La microscopectroscopie et imagerie spectrale à fluorescence nous a permis de détecter la présence et la localisation d'une molécule fluorescente dans la fibre capillaire. Depuis la première publication par Minsky en 1957, la technique d'imagerie confocale de fluorescence est largement utilisée pour l'analyse des cheveux car elle permet d'obtenir des images de grande résolution. Ces images sont comme des coupes optiques et peuvent être obtenues à différents niveaux dans l'épaisseur du cheveu, sans avoir besoin d'utiliser un microtome et donc de détruire l'échantillon. Une avancée technologique importante par rapport à la microscopie classique, la technique d'imagerie confocale spectrale (ICS) de fluorescence procure les

informations supplémentaires sur l'environnement/état moléculaire des fluorophores. Ici, l'ICS de fluorescence, notamment grâce au choix du fluorophore solvatochrome NR, nous a permis de distinguer le colorant selon ses formes encapsulé/libre/lié aux kératines. Cependant, il serait intéressant d'utiliser d'autres techniques telles que la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) afin d'évaluer clairement l'interaction du colorant avec la kératine, comme ont pu récemment le faire Tang *et al.* (Tang et al., 2021).

Une autre perspective intéressante serait de comparer l'utilisation de la suspension de nanomicelles PF127 avec un processus de coloration plus classique ; c'est-à-dire gonflement des écailles (traitement alcalin) suivi de l'application du colorant (NR ou autre) et de la fermeture des écailles (traitement acide).

Dans ces travaux de thèse, la molécule modèle rouge de Nile a été utilisée. Certaines molécules colorantes du marché présentent des propriétés fluorescentes telles que l'indigo, l'indirubine, les bétalaïnes, etc (Gandía-Herrero et al., 2010; Ju et al., 2019). Par conséquent, la technique ICS de fluorescence pourra être utilisée de la même manière qu'elle l'a été ici afin d'étudier l'interaction et la pénétration des molécules (encapsulées ou non) avec la fibre capillaire entière. Cependant, pour faciliter le suivi de la molécule d'intérêt, l'étude devra se réaliser sur cheveux blancs.

Discussion générale de la thèse

Initialement, le projet MISTIC visait à proposer des réponses à deux défis rencontrés dans l'industrie cosmétique : 1) concevoir une nouvelle génération de produits cosmétiques personnalisés permettant une libération stimulée d'actifs cosmétiques, et 2) développer des approches analytiques capables d'évaluer la pertinence et l'efficacité de ces nouvelles formes cosmétiques. Mais le secteur des cosmétiques évolue rapidement et aujourd'hui, bien que l'innovation reste une des motivations principales des services de recherche et développement, il y a également l'impact environnemental des produits cosmétiques qui rentre en jeu.

La majorité des consommateurs considère le prix et la performance comme les facteurs les plus importants lors du choix des cosmétiques. Mais aujourd'hui, les consommateurs ont un intérêt croissant pour des cosmétiques écoresponsables (Lin et al., 2018). Les cosmétiques « verts » englobent plusieurs aspects tels que la préservation de l'environnement, la minimisation de la pollution, l'utilisation responsable des ressources non renouvelables, le bien-être animal et la préservation des espèces (McEachern and McClean, 2002; Shamdasani et al., 1993). Le terme « vert » sous-entend également que les cosmétiques contiennent des ingrédients naturels provenant de plantes ou de fruits (idéalement des ingrédients locaux), et qu'ils contiennent un minimum d'ingrédients d'origine synthétique (Csorba and Boglea, 2011). L'utilisation de cosmétiques verts consiste à prendre soin de soi et à traiter l'environnement avec respect. D'une manière générale, les entreprises commercialisant les produits cosmétiques sont encouragées à contribuer aux enjeux du développement durable. Cette responsabilité sociétale des entreprises (RSE) est définie par la commission européenne comme l'intégration volontaire par les entreprises de préoccupations sociales et environnementales à leurs activités commerciales et leurs relations avec les parties prenantes.

La performance des cosmétiques est incontestablement la force motrice des changements rapides sur le marché, provoquant le développement de formulations ou de présentations toujours nouvelles. Bien que le terme « nano » effraie encore la majorité des consommateurs car il s'agit d'une technologie assez nouvelle, sur lequel nous n'avons pas encore suffisamment de recul, que ce soit écologique ou biologique ; l'utilisation de nanosystèmes donne un nouvel élan aux approches conventionnelles. Ces innovations nécessitent l'utilisation de diverses, voir mêmes nouvelles, méthodes de caractérisation afin de valider leur intérêt. En prenant en compte l'engouement pour le développement de produits cosmétiques « verts », il est question ici de discuter de l'impact écologique des méthodes de synthèse, formulation ou caractérisation choisies tout au long de cette thèse. Dans un même temps, nous allons discuter de la performance des autres méthodes référencées ou des ingrédients proposés dans la littérature.

1. Rendre la synthèse organique des polymères plus éco-responsable

En cosmétique, la première solution pour rendre une formule cosmétique plus verte est d'utiliser des ingrédients naturels (ou issus de co-produits), en évitant les ingrédients issus de la chimie de synthèse. Cependant, lorsqu'il est question de développer des nanosystèmes stimuli-sensibles, la synthèse ou a minima l'hémisynthèse sont incontournables. Concernant le stimulus « pH », il existe des polymères naturels (ou dérivés) sensibles au pH, tels que le chitosan, l'acide hyaluronique, l'alginate ou encore la kératine (Jung et al., 2017; Kim et al., 2018; Shi et al., 2019; Villanueva et al., 2019). Mais lorsqu'il s'agit d'explorer d'autres stimuli tels que le potentiel redox, la chimie de synthèse semble aujourd'hui inévitable afin d'incorporer des fonctions stimuli-sensibles. On rappelle tout de même que l'obtention de polymères naturels nécessite leur extraction, dont la méthode peut être discutable d'un point de vue environnemental.

Concernant les synthèses des polymères décrites dans cette thèse, il sera donc question d'évaluer leur impact écologique et de proposer des pistes pour les rendre le plus « vert » possible. Les principaux objectifs de la chimie verte sont les suivants : concevoir des réactions avec de meilleurs rendements, utiliser des matériaux et des sources d'énergie renouvelables, utiliser des solvants ou des réactifs plus sûrs ou plus respectueux de l'environnement, réduire la génération de sous-produits/déchets (Jahangirian et al., 2017). Les 12 principes de la chimie verte ont été développés par Paul Anastas et John Warner (Anastas and Warner, 2000) et sont récapitulés ci-dessous :

1) La prévention de la pollution en évitant la production de résidus.
2) L'économie d'atomes et d'étapes
3) La conception de méthodes de synthèse moins dangereuses grâce à l'utilisation de conditions douces et la préparation de produits peu ou pas toxiques pour l'homme et l'environnement.
4) La conception de produits chimiques moins toxiques.
5) Réduction des solvants polluants.
6) La limitation des dépenses énergétiques. Les méthodes de synthèse doivent être, dans la mesure du possible, conduites à température et pression ambiantes.
7) L'utilisation de ressources renouvelables à la place des produits fossiles.
8) La réduction du nombre de dérivés pouvant générer des déchets.
9) L'utilisation d'agents catalytiques (en incluant de nouveaux catalyseurs chimiques, enzymatiques et/ou microbiologiques).
10) La conception des produits/substances non persistantes en vue de leur dégradation finale dans des conditions naturelles ou forcées de manière à minimiser l'incidence sur l'environnement.
11) La mise au point des méthodologies d'analyses en temps réel pour prévenir la pollution.
12) Le développement d'une chimie fondamentalement plus sûre pour prévenir les accidents, explosions, incendies et émissions de composés dangereux.

1.1. Choix des polymères

Lorsque l'on évalue le caractère vert d'une synthèse, il faut prendre en compte l'origine des ingrédients choisis. Concernant la synthèse du mPEG-SS-PLA, le mPEG n'a pas été synthétisé par nos soins mais acheté. Le PEG n'est pas inflammable, n'est pas volatil et est considéré par la FDA comme un produit sûr. Mais qu'en est-il de sa fabrication ? Les PEGs sont synthétisés par réaction de l'oxyde d'éthylène avec de l'eau, de l'éthylène glycol ou des oligomères de l'éthylène glycol. Cette synthèse présente plusieurs inconvénients : l'oxyde d'éthylène est hautement toxique, la synthèse nécessite d'être réalisée sous haute pression et à très forte température. Ajouté à cela, le PEG n'est pas considéré comme biodégradable (Duis et al., 2021; Huang et al., 2005). N'ayant pas encore trouvé d'alternatives satisfaisantes à l'utilisation du PEG ou à une synthèse plus écoresponsable de ce dernier, le PEG reste largement utilisé dans le domaine biomédical.
Concernant le PLA, il a été synthétisé par nos soins car i) la stratégie de synthèse « l'exigeait » et ii) cela nous permettait de contrôler les longueurs de chaînes PLA. Dans notre stratégie de synthèse, le PLA a été obtenu par ouverture du lactide. Dans le cadre du développement de la chimie verte, il est alors important de rappeler que le lactide est d'origine naturelle et renouvelable. En effet, le lactide est issu de l'acide lactique qui peut être obtenu à partir de la fermentation du dextrose par des bactéries ; le dextrose étant dérivé de l'amidon végétal. Ainsi, le polymère PLA est un polymère fabriqué à partir de sources renouvelables (Sin et al., 2013). Ajouté à cela, le PLA est non toxique et biodégradable. C'est d'ailleurs pour cela qu'il a de nombreuses applications dans les domaines biomédicaux, notamment la suture, le matériel de fixation osseuse et les systèmes d'administration de médicaments (Mehta et al., 2005; Zhao et al., 2004). Il est en effet décomposé par réaction avec l'eau ou sous l'action d'enzymes.

1.2. Choix des solvants

Concernant le choix des solvants lors des synthèses, on peut tout d'abord se référencer à la Pharmacopée Européenne (édition 10.5) qui classe les solvants résiduels (donc ceux potentiellement issus de la synthèse) selon leur risque toxicologique pour l'homme :

- Solvants résiduels de classe 1 : à éviter. Ce sont les solvants cancérogènes (ou soupçonnés de l'être) chez les humains et qui présentent un risque pour l'environnement.
- Solvant résiduels de classe 2 : à limiter. Ce sont les solvants soupçonnés d'avoir d'autres effets toxiques importants, mais réversibles.
- Solvants résiduels de classe 3 : à faible potentiel toxique.

Durant cette thèse, lors de la synthèse du polymère mPEG-SS-PLA ou celle du PF127-NH_2, aucun solvant de la classe 1 n'a été utilisé. Mais de la classe 2 oui ; tels que le dichlorométhane, le méthanol, le toluène ou encore le tétrahydrofurane. Dans la littérature, que ce soit les synthèses décrites pour obtenir le copolymère

sensible à la réduction mPEG-SS-PLA (Fuoco et al., 2017; Song et al., 2011), ou celles décrites pour ajouter des fonctions amines sur le polymère PF127 (Gyulai et al., 2016), le même type de solvants est utilisé (classe 2). Afin de rendre les synthèses plus « vertes », des solvants de la classe 3 pourraient être testés pour remplacer ceux actuellement utilisés.

Les solvants eutectiques profonds naturels (NaDES) pourraient remplacer les solvants organiques courants qui présentent une toxicité et une volatilité élevée (Gómez et al., 2019; Paiva et al., 2014). Un solvant NADES est défini comme une combinaison de deux ou trois substances naturelles, renouvelables, biodégradables et peu coûteuses qui sont capables de s'auto-associer, souvent par le biais d'interactions spécifiques, pour former un mélange eutectique. Les NaDES ont été utilisés dans un large éventail d'applications, notamment la séparation et l'extraction de composés cibles à partir de produits naturels (Kua and Gan, 2019; Mehariya et al., 2021; Wils et al., 2021). L'utilisation de tels solvants n'est encore qu'à ses prémisses dans le domaine de la synthèse et/ou modification organique de petites molécules (Delaye et al., 2018) ou de polymères (Cecone et al., 2020; Gómez et al., 2019). Pour le moment, la polymérisation du lactide avec des NaDES n'a pas été explorée.

1.3. Choix des procédés utilisés

Deux principales méthodes de synthèse sont utilisées pour obtenir le PLA : la polycondensation ou la polymérisation par ouverture de cycle (ROP en anglais). La ROP du lactide est le processus le plus avantageux pour produire du PLA de haut poids moléculaires (Södergård and Stolt, 2010). Ce processus nécessite un catalyseur. Différents types de catalyseurs existent : les catalyseurs métalliques, organiques et à base d'enzymes. Les catalyseurs à base de métaux sont les plus courants mais les plus toxiques, que ce soit pour l'homme ou l'environnement. Malheureusement, bien que des catalyseurs organiques et à base d'enzymes aient été essayés, ils sont moins efficaces (faible taux de conversion et temps de réaction longs) que les catalyseurs métalliques (Dubey et al., 2017; Kobayashi, 2015).

Par conséquent, bien que la méthode ROP convienne pour une production à grande échelle du PLA, elle présente plusieurs inconvénients : elle est coûteuse de par les étapes de purification du monomère, fait intervenir des solvants inflammables et la plupart des composés d'étain utilisés comme catalyseurs sont toxiques (Hamad et al., 2018). Les catalyseurs métalliques étant difficilement remplaçables, des méthodes alternatives doivent être développées pour améliorer le rendement de la réaction tout en diminuant la quantité de catalyseurs métalliques. L'irradiation par micro-ondes semble une approche prometteuse pour faciliter la synthèse du PLA (Hoogenboom and Schubert, 2007). Par exemple, Nikolic et al. ont mentionné que la ROP conventionnel du lactide prend plus de 30h à 120°C tandis que l'utilisation de micro-ondes rend le même processus de polymérisation beaucoup plus rapide et économe en énergie, avec un temps de réaction d'environ 30 min à 100°C (Nikolic et al., 2010). De la même façon, Singla et al. ont synthétisé du PLA de masse molaire élevée en seulement 20 min sous irradiation micro-ondes par rapport à plusieurs heures

en utilisant un chauffage conventionnel (Singla et al., 2012). Le taux de conversion peut être influencé par divers paramètres, notamment le temps d'irradiation, la température de réaction, la nature du catalyseur ou le choix du solvant. Récemment, Thauvin et al. ont testé l'ensemble de ces paramètres pour optimiser la synthèse de copolymères mPEG-PLA (Thauvin et al., 2021). Ils ont notamment comparé le catalyseur métallique $Sn(Oct)_2$ et le catalyseur organique DBU. L'utilisation du DBU comme catalyseur dans le chloroforme avec un temps d'irradiation de 5 min et une température de 75°C représentait le meilleur protocole. Au vu de ce récent article, la polymérisation du lactide assistée par micro-ondes semble une approche prometteuse permettant de s'affranchir des catalyseurs métalliques. Il serait alors intéressant d'explorer cette approche dans le cadre de la synthèse du mPEG-SS-PLA afin de réduire, ou même d'éviter, l'utilisation du catalyseur métallique toxique $Sn(Oct)_2$. Il faudra bien entendu s'assurer que l'utilisation des micro-ondes ne rompt pas le pont disulfure.

2. Formulation

2.1. Choix du procédé de formulation des nanosystèmes

Dans le cas d'un développement de nanosystèmes, la chimie verte rentre en compte lors de la synthèse des polymères mais également lors du choix du procédé utilisé pour fabriquer les NS polymères. Parmi le grand nombre d'articles qui traitent du développement de NS, peu d'auteurs ont tenté d'examiner un ou plusieurs de ces principes de chimie verte.

Lorsque les polymères utilisés pour développer des NS sont amphiphiles, des nanomicelles se forment théoriquement de manière spontanée dans l'eau lorsque les concentrations (et dans certains cas températures) sont adéquates (on parle de CMC et CMT, respectivement). Mais parfois, la formulation des NS nécessite d'autres méthodes, classées certes moins vertes, mais permettant d'obtenir des systèmes plus reproductibles, stables et petits.

Dans cette thèse, la technique de nanoprécipitation a été utilisée pour produire les nanosystèmes sensibles à la réduction. Ce procédé est considéré comme « vert » car il ne nécessite pas d'appareillages lourds (et donc un impact écologique moindre). Le seul point à améliorer avec cette technique est le choix du solvant (en se référant à la pharmacopée citée ci-dessus), qui dépendra de la solubilité des polymères impliquées dans la formulation des nanosystèmes. Dans notre cas, l'acétone a été le solvant choisi afin de solubiliser chaque mélange de polymères, peu importe les concentrations testées. Il s'agit d'un solvant à faible potentiel toxique (classe 3).

Concernant le développement de nanosystèmes de poloxamères, la technique dite d'émulsion-évaporation de solvant a été choisie. Cette technique est considérée comme verte car elle consomme peu d'énergie (Lupacchini et al., 2017). Dans ces travaux de thèse, le procédé de formulation de nanomicelles

polymères (PF127) a été rendue encore plus « vert » de par l'utilisation d'un solvant organique vert non toxique, le carbonate de diméthyle (DMC) (Munnier et al., 2020; Pyo et al., 2017).

Si nous devions comparer ces deux méthodes, la nanoprécipitation est plus économique que l'émulsion-évaporation de solvant assistée par ultrasons car la consommation d'énergie de l'agitation magnétique est moindre par rapport aux ultrasons. De plus, l'utilisation des ultrasons est plus difficilement envisageable dans l'idée d'une potentielle transposition industrielle.

2.2. Choix des composants de la formule cosmétique

Dans la partie 3, nous avons incorporé des nanosystèmes polymères dans des films cosmétiques à base de PVA. D'une manière générale, deux types de films cosmétiques peuvent être distingués : les films qui se dissolvent dans l'eau et les films insolubles. Les matériaux constituant le film rejoindront donc soit le flux des eaux usées soit les déchets solides. Dans une démarche éco-responsable, il est alors nécessaire d'utiliser des composés biodégradables, limitant l'impact des déchets. L'idéal étant de choisir des polymères également biocompatibles et biosourcés.

Dans les études de faisabilité réalisées au cours de ce travail, nous avons choisi de travailler avec un polymère modèle couramment utilisé mais peu biodégradable, le PVA, qui peut être une source de pollution de la nappe phréatique. Il existe des bactéries en mesure de le dégrader, mais celles-ci ne sont pas communes dans l'environnement et sont souvent strictement présentes dans les milieux contaminés au PVA (Chiellini et al., 2003). Par conséquent, des alternatives plus naturelles et biodégradables doivent être envisagées. Parmi les polymères biosourcés déjà disponibles sur le marché, le poly(hydroxyalcanoate) (PHA), obtenu à partir de bactéries, est entièrement renouvelable, éco-responsable et compatible pour une application cutanée. Les travaux menés par Coltelli et al. décrivent la conception, la préparation et la caractérisation de films à base de PHA et d'amidon (Coltelli et al., 2018). Les résultats se sont montrés encourageants quant à l'utilisation de ces polymères pour produire des masques de beauté biosourcés et biodégradables. De par sa nature hydrophobe, l'incorporation directe de l'actif lipophile Délipidol® dans un film de PHA pourrait être envisagée, évitant ainsi le procédé d'encapsulation.
Il existe également le Glycopatch® qui est un polysaccharide anionique obtenu par fermentation bactérienne, à partir de sorbitol d'origine végétale et d'extrait autolytique de levure. Sous la forme d'une solution visqueuse à 2,3% dans l'eau, cet ingrédient est commercialisé par notre partenaire industriel SOLABIA et est conçu pour formuler des patchs. Ce polysaccharide pourrait être envisagé pour formuler des patchs dans lesquels seraient incorporés des nanosystèmes.
Dans un avenir proche, les avancées de notre partenaire académique, l'équipe ICOA d'Orléans, qui synthétise des oligomères et polymères bio-sourcés, devraient nous permettre de travailler prochainement sur des systèmes éco-responsables et innovants.

3. Caractérisation des nanosystèmes et/ou formules – vers une analyse éco-responsable

Aujourd'hui, de plus en plus d'actifs/d'ingrédients d'origine naturelle sont exploitées pour le domaine des cosmétiques et notamment des extraits de plantes (Gianeti et al., 2013) , des sous-produits d'origine végétale (Barbulova et al., 2015) ou encore des actifs obtenus par synthèse enzymatique comme ceux proposés par notre partenaire industriel Solabia. Comme pour tout produit commercialisé, il est nécessaire d'analyser la matière première et le produit fini. Cette analyse peut être plus ou moins complexe en fonction du type d'ingrédient utilisé.

Avant de choisir la technique analytique appropriée à l'analyse, il faut définir ses attentes, que ce soit au niveau du coût et du temps de l'analyse, de la facilité d'utilisation, de la précision fournie, de la limite de détection, du type d'information obtenu, etc. Aujourd'hui, il est également important d'évaluer l'impact de la méthode choisie sur l'homme et sur l'environnement. En effet, l'omniprésence de la chimie analytique dans la recherche et l'industrie entraîne une augmentation considérable de la consommation de produits chimiques toxiques et de la production de déchets dangereux. Pour ces raisons, de nombreux efforts sont réalisés par la communauté analytique pour adhérer, comme les chimistes, à des pratiques plus écoresponsables. Différentes stratégies complémentaires sont ainsi développées depuis quelques années pour rendre la chimie analytique plus respectueuse de l'environnement, donnant naissance à la chimie analytique verte. Les fondements de la chimie analytique verte se sont développés au fil des années, à partir des travaux d'Anastas (Anastas, 1999). Tout comme la chimie verte, 12 principes ont été formulés concernant la chimie analytique verte (Gałuszka et al., 2013). De façon globale, les procédures analytiques peuvent être rendues vertes par l'élimination ou la réduction de l'usage des substances chimiques dangereux (solvants, réactifs, conservateurs, modificateurs de pH), la minimisation de la consommation d'énergie, la bonne gestion des déchets et le renforcement de la sécurité des opérateurs. Si cette démarche « verte » est suivie, cela ajouterait un avantage économique en raison de la diminution des consommations de réactifs et d'énergie ainsi que des volumes de déchets à traiter.

Le processus de développement de méthodes vertes commence depuis l'étape de préparation d'échantillons jusqu'à la détermination finale. Afin de pouvoir évaluer le caractère vert d'une méthode, différents outils ont été développés. Le plus ancien de ces outils est le « National Environmental Methods Index » (NEMI). L'inconvénient majeur de cet outil, est qu'il est qualitatif et qu'en plus, il ne tient pas compte de certains paramètres importants de la chimie analytique verte comme la consommation d'énergie. Un autre outil plus quantitatif existe comme l'« eco-scale » analytique qui est une approche basée sur la soustraction de points de pénalités d'un score initial de 100 points, en considérant la quantité consommée et la dangerosité des réactifs utilisés, la consommation d'énergie, le risque professionnel et la quantité de déchets générée. Le « Green Analytical Procedure Index » (GAPI) est un outil récent permettant d'évaluer et

quantifier, de façon plus approfondie, l'impact environnemental de chaque étape d'une procédure analytique (Płotka-Wasylka, 2018). Enfin, le « *Analytical Greenness Calculator* » est l'outil le plus récent (Pena-Pereira et al., 2020). Tous ces outils ont une limite commune : ils ne traitent pas le critère vert et les autres critères cruciaux de la même manière, et n'expriment donc pas la qualité globale de la méthode.

D'un point de vue de la chimie analytique verte, les méthodes analytiques peuvent être divisées en 2 groupes. Le premier groupe concerne les méthodes directes qui sont intrinsèquement vertes car ne nécessitant pas de préparation des échantillons, et ne génèrent donc pas d'effluents/déchets. C'est le cas des techniques d'analyses fondées sur l'optique (spectroscopie Raman, IR et proche infrarouge) (Moros et al., 2010). Le second groupe est constitué des méthodes qui nécessitent des réactifs et une étape de préparation d'échantillons. C'est le cas des techniques séparatives comme la chromatographie liquide haute performance (CLHP) qui est l'une des techniques les plus consommatrices de solvants organiques, souvent toxiques, et de consommables.

Durant la thèse, la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman (IMCR) a été utilisée pour évaluer la distribution et la teneur (analyse semi-quantitative) d'un actif hydrophobe encapsulé et dispersé dans un film hydrophile à base de PVA. Cette technique n'a pas nécessité de préparation d'échantillons ; il n'a pas été nécessaire d'extraire les composés d'intérêts et donc d'utiliser des solvants potentiellement toxiques pour l'homme et/ou l'environnement. A noter que, dans la littérature, peu d'études se concentrent sur la détermination de la distribution et de la teneur des actifs dispersés dans des films cosmétiques. Dans la récente étude publiée par Gehrcke et al., la teneur en ACI nanoencapsulé dispersé dans un film a été quantifiée par extraction du composé (utilisation du méthanol) puis analyse par la méthode CLHP (Gehrcke et al., 2021). Bien que le résultat obtenu avec la technique IMCR soit semi-quantitatif et dépende de la réponse Raman de la molécule analysée, cette technique permet i) d'éviter l'utilisation de solvants organiques, ii) d'utiliser peu de consommables ; seulement des lames en verre, réutilisables, pour disposer les films et iii) d'éviter la destruction de l'échantillon (film) qui pourra alors être analysé par des méthodes complémentaires, à conditions que la longueur d'onde et la puissance laser ne l'endommage pas. Cette technique d'analyse fondée sur l'optique profite également des progrès considérables qui ont été réalisés dans le domaine de l'instrumentation, ce qui se traduit par des instruments plus fiables, plus polyvalents et dans certains cas transportables, voire portables.

Conclusion générale de la thèse

Depuis quelques années, le marché des cosmétiques ne cesse de croître, d'évoluer, et devient de plus en plus concurrentiel. Les formulations poussent toujours plus loin les limites de la chimie et de la galénique pour découvrir, chaque jour, de nouvelles présentations. C'est pourquoi les produits cosmétiques deviennent plus spécifiques, plus efficaces et plus ciblés. Ces améliorations/innovations nécessitent l'utilisation de diverses, voir mêmes nouvelles, méthodes de caractérisation des systèmes.

Au cours de ce travail de recherche, mené sur trois années, deux axes majeurs ont été abordés à savoir : 1. le développement d'un système polymère stimuli-sensible pour une application cutanée et 2. l'application de la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman ou de fluorescence pour l'étude de nanosystèmes polymères.

Dans le cadre du premier axe, trois stratégies de synthèse ont été étudiées afin de développer un système sensible à une élévation du niveau réducteur du milieu. L'une des trois stratégies a permis la synthèse de mélanges de polymères : mPEG-SS-PLA/PLA. L'impact des caractéristiques du mélange (concentrations, longueurs de chaînes PLA, ratios des polymères) sur la sensibilité des nanosystèmes a été investigué. Il a notamment été mis en évidence qu'il n'était pas nécessaire d'utiliser 100% de polymères intelligents pour développer des nanosystèmes stimuli-sensibles, ce qui permet de limiter l'impact écologique et économique de la production de ces nanosystèmes. Dans cette partie, il était important et indispensable d'avoir à l'esprit les réalités sociétales et économiques que représentait le développement d'un tel système. En effet, la nanotechnologie étant un domaine de recherche relativement nouveau et émergent, la montée des préoccupations sociétales est inévitable. Les consommateurs doivent comprendre que les risques pour la santé associés aux nanosystèmes dépendent du type de NS, de la voie et du degré d'exposition. Concernant l'aspect économique, plusieurs questions coexistent. Comment passer des découvertes de laboratoire à des produits commerciaux ? C'est-à-dire comment fabriquer des nanosystèmes stimuli-sensibles de manière pratique, évolutive, à faible coût et avec un bon contrôle des dimensions. En fin de compte, le processus de fabrication ne peut pas coûter plus cher que la valeur du système en cours de développement.

Dans le cadre du 2ème axe, des nanosystèmes polymères ont été envisagées pour deux types d'application ; une application cutanée et une application capillaire. Concernant l'application cutanée, le but était d'incorporer des NS polymères chargés en un actif lipophile dans des films PVA de type peel-off. L'analyse chimique des films par la technique d'imagerie par microspectrocopie confocale Raman (IMCR) a mis en évidence la distribution homogène de l'actif dans les films avec une haute résolution spatiale. Le couplage de l'imagerie hyperspectrale avec une méthode statistique semi-quantitative, de type NCLS (*Non Negatively Least Squares*), nous a permis de tracer des profils reliant la contribution du signal de l'actif avec la quantité initialement incorporée. Cette méthode pourrait être facilement mise en œuvre comme un outil

analytique pour le dosage de molécules d'intérêt dans des formulations complexes, aussi bien en recherche pour l'optimisation des formulations innovantes que dans l'environnement industriel.

Concernant l'application capillaire des nanosystèmes, la technique d'imagerie confocale de fluorescence a permis de mettre en évidence l'intérêt de la nanoencapsulation d'une molécule modèle, le rouge de Nile, pour une potentielle application capillaire. Cette étude n'étant qu'à ses prémices ; il est difficile d'extrapoler ces résultats aux molécules colorantes commerciales. Leur incorporation dans les nanosystèmes polymères est donc la prochaine étape.

Que ce soit la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman ou de fluorescence, elles sont catégorisées ici comme « techniques de chimie analytique vertes » car elles n'ont pas nécessité de préparation d'échantillons, ni d'utilisation de solvants organiques.

Bibliographie

Abrego, G., Alvarado, H., Souto, E.B., Guevara, B., Bellowa, L.H., Garduño, M.L., Garcia, M.L., Calpena, A.C., 2016. Biopharmaceutical profile of hydrogels containing pranoprofen-loaded PLGA nanoparticles for skin administration: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. International Journal of Pharmaceutics 501, 350–361. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.071

Aditya, A., Chattopadhyay, S., Jha, D., Gautam, H.K., Maiti, S., Ganguli, M., 2018. Zinc Oxide Nanoparticles Dispersed in Ionic Liquids Show High Antimicrobial Efficacy to Skin-Specific Bacteria. ACS Appl. Mater. Interfaces 10, 15401–15411. https://doi.org/10.1021/acsami.8b01463

Ahmadi, M., Adibhesami, M., 2017. The Effect of Silver Nanoparticles on Wounds Contaminated with Pseudomonas aeruginosa in Mice: An Experimental Study. Iran J Pharm Res 16, 661–669.

Ahn, H.J., Lee, W.-S., 2002. An ultrastuctural study of hair fiber damage and restoration following treatment with permanent hair dye. Int J Dermatol 41, 88–92. https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2002.01375.x

Alqahtani, M.S., Alqahtani, A., Kazi, M., Ahmad, M.Z., Alahmari, A., Alsenaidy, M.A., Syed, R., 2020. Wound-healing potential of curcumin loaded lignin nanoparticles. Journal of Drug Delivery Science and Technology 60, 102020. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102020

Alvarez-Lorenzo, C., Sosnik, A., Concheiro, A., 2011. PEO-PPO Block Copolymers for Passive Micellar Targeting and Overcoming Multidrug Resistance in Cancer Therapy. CDT 12, 1112–1130. https://doi.org/10.2174/138945011795906615

Anastas, P.T., 1999. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. Critical Reviews in Analytical Chemistry 29, 167–175. https://doi.org/10.1080/10408349891199356

Anastas, P.T., Warner, J.C., 2000. Green chemistry: theory and practice, First publ. new as paperback. ed. Oxford University Press, Oxford.

Andreani, T., Dias-Ferreira, J., Fangueiro, J.F., Souza, A.L.R., Kiill, C.P., Gremião, M.P.D., García, M.L., Silva, A.M., Souto, E.B., 2020. Formulating octyl methoxycinnamate in hybrid lipid-silica nanoparticles: An innovative approach for UV skin protection. Heliyon 6, e03831. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03831

Barbulova, A., Colucci, G., Apone, F., 2015. New Trends in Cosmetics: By-Products of Plant Origin and Their Potential Use as Cosmetic Active Ingredients. Cosmetics 2, 82–92. https://doi.org/10.3390/cosmetics2020082

Bessar, H., Venditti, I., Benassi, L., Vaschieri, C., Azzoni, P., Pellacani, G., Magnoni, C., Botti, E., Casagrande, V., Federici, M., Costanzo, A., Fontana, L., Testa, G., Mostafa, F.F., Ibrahim, S.A., Russo, M.V., Fratoddi, I., 2016. Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 141, 141–147. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.021

Bianchi, S., Bernardi, S., Continenza, M.A., Vincenti, E., Antonouli, S., Torge, D., Macchiarelli, G., 2020. Scanning Electron Microscopy Approach for Evaluation of Hair Dyed with Lawsonia inermis Powder: in vitro Study. Int. J. Morphol. 38, 96–100. https://doi.org/10.4067/S0717-95022020000100096

Bodratti, A., Alexandridis, P., 2018. Formulation of Poloxamers for Drug Delivery. JFB 9, 11. https://doi.org/10.3390/jfb9010011

Boll, M.S., Doty, K.C., Wickenheiser, R., Lednev, I.K., 2017. Differentiation of hair using ATR FT-IR spectroscopy: A statistical classification of dyed and non-dyed hairs. Forensic Chemistry 6, 1–9. https://doi.org/10.1016/j.forc.2017.08.001

Cecone, C., Hoti, G., Krabicová, I., Appleton, S.L., Caldera, F., Bracco, P., Zanetti, M., Trotta, F., 2020. Sustainable synthesis of cyclodextrin-based polymers by exploiting natural deep eutectic solvents. Green Chem. 22, 5806–5814. https://doi.org/10.1039/D0GC02247K

Chen, J., Wei, N., Lopez-Garcia, M., Ambrose, D., Lee, J., Annelin, C., Peterson, T., 2017. Development and evaluation of resveratrol, Vitamin E, and epigallocatechin gallate loaded lipid nanoparticles for skin care applications. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 117, 286–291. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.04.008

Chen, W., Shi, Y., Feng, H., Du, M., Zhang, J.Z., Hu, J., Yang, D., 2012. Preparation of Copolymer Paclitaxel Covalently Linked via a Disulfide Bond and Its Application on Controlled Drug Delivery. J. Phys. Chem. B 116, 9231–9237. https://doi.org/10.1021/jp303260f

Chiper, M., Hervé Aubert, K., Augé, A., Fouquenet, J.-F., Soucé, M., Chourpa, I., 2013. Colloidal stability and thermo-responsive properties of iron oxide nanoparticles coated with polymers: advantages of Pluronic ® F68–PEG mixture. Nanotechnology 24, 395605. https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/39/395605

Chung, Y.-L., Olsson, J.V., Li, R.J., Frank, C.W., Waymouth, R.M., Billington, S.L., Sattely, E.S., 2013. A Renewable Lignin–Lactide Copolymer and Application in Biobased Composites. ACS Sustainable Chem. Eng. 1, 1231–1238. https://doi.org/10.1021/sc4000835

Contardi, M., Heredia-Guerrero, J.A., Perotto, G., Valentini, P., Pompa, P.P., Spanò, R., Goldoni, L., Bertorelli, R., Athanassiou, A., Bayer, I.S., 2017. Transparent ciprofloxacin-povidone antibiotic films and nanofiber mats as potential skin and wound care dressings. European Journal of Pharmaceutical Sciences 104, 133–144. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.03.044

Contri, R.V., Kulkamp-Guerreiro, I.C., da Silva, S.J., Frank, L.A., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2016. Nanoencapsulation of Rose-Hip Oil Prevents Oil Oxidation and Allows Obtainment of Gel and Film Topical Formulations. AAPS PharmSciTech 17, 863–871. https://doi.org/10.1208/s12249-015-0379-9

Cruz, C., Costa, C., Gomes, A., Matamá, T., Cavaco-Paulo, A., 2016. Human Hair and the Impact of Cosmetic Procedures: A Review on Cleansing and Shape-Modulating Cosmetics. Cosmetics 3, 26. https://doi.org/10.3390/cosmetics3030026

Csorba, L.M., Boglea, V.A., 2011. Sustainable cosmetics: A major instrument in protecting the consumer's interest. Regional and Business Studies 3, 167–176.

Dario, M.F., Viana, A.S., Augusto, O., Linares, E., Gama, R.M., Baby, A.R., Velasco, M.V.R., 2020. Dyed hair photoprotection efficacy of a quercetin-loaded cationic nanoemulsion. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 204, 111788. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111788

Delaye, P.-O., Pénichon, M., Boudesocque-Delaye, L., Enguehard-Gueiffier, C., Gueiffier, A., 2018. Natural Deep Eutectic Solvents as Sustainable Solvents for Suzuki-–Miyaura Cross-Coupling Reactions Applied to Imidazo-Fused Heterocycles. SynOpen 02, 0306–0311. https://doi.org/10.1055/s-0037-1610400

Dharmaratne, N.U., Pothupitiya, J.U., Kiesewetter, M.K., 2019. The mechanistic duality of (thio)urea organocatalysts for ring-opening polymerization. Org. Biomol. Chem. 17, 3305–3313. https://doi.org/10.1039/C8OB03174F

Dijkstra, P.J., Du, H., Feijen, J., 2011. Single site catalysts for stereoselective ring-opening polymerization of lactides. Polym. Chem. 2, 520–527. https://doi.org/10.1039/C0PY00204F

Dong, Y., Feng, S.-S., 2006. Nanoparticles of poly(D,L-lactide)/methoxy poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) blends for controlled release of paclitaxel. J. Biomed. Mater. Res. 78A, 12–19. https://doi.org/10.1002/jbm.a.30684

Dove, A.P., Pratt, R.C., Lohmeijer, B.G.G., Waymouth, R.M., Hedrick, J.L., 2005. Thiourea-Based Bifunctional Organocatalysis: Supramolecular Recognition for Living Polymerization. J. Am. Chem. Soc. 127, 13798–13799. https://doi.org/10.1021/ja0543346

Dubey, S.P., Thakur, V.K., Krishnaswamy, S., Abhyankar, H.A., Marchante, V., Brighton, J.L., 2017. Progress in environmental-friendly polymer nanocomposite material from PLA: Synthesis, processing and applications. Vacuum 146, 655–663. https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.07.009

Duis, K., Junker, T., Coors, A., 2021. Environmental fate and effects of water-soluble synthetic organic polymers used in cosmetic products. Environ Sci Eur 33, 21. https://doi.org/10.1186/s12302-021-00466-2

El-Naggar, M.E., Al-Joufi, F., Anwar, M., Attia, M.F., El-Bana, M.A., 2019. Curcumin-loaded PLA-PEG copolymer nanoparticles for treatment of liver inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 177, 389–398. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.02.024

Fornaguera, C., Solans, C., 2018. Analytical Methods to Characterize and Purify Polymeric Nanoparticles. International Journal of Polymer Science 2018, 1–10. https://doi.org/10.1155/2018/6387826

Frederiksen, K., Guy, R.H., Petersson, K., 2016. The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. Expert Opinion on Drug Delivery 13, 349–360. https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1124412

Fuoco, T., Pappalardo, D., Finne-Wistrand, A., 2017. Redox-Responsive Disulfide Cross-Linked PLA–PEG Nanoparticles. Macromolecules 50, 7052–7061. https://doi.org/10.1021/acs.macromol.7b01318

Gabriel, D., Mugnier, T., Courthion, H., Kranidioti, K., Karagianni, N., Denis, M.C., Lapteva, M., Kalia, Y., Möller, M., Gurny, R., 2016. Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. Journal of Controlled Release 242, 16–24. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.09.007

Gałuszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J., 2013. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. TrAC Trends in Analytical Chemistry 50, 78–84. https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010

Gandía-Herrero, F., Escribano, J., García-Carmona, F., 2010. Structural implications on color, fluorescence, and antiradical activity in betalains. Planta 232, 449–460. https://doi.org/10.1007/s00425-010-1191-0

Garvie-Cook, H., Frederiksen, K., Petersson, K., Guy, R.H., Gordeev, S., 2015. Characterization of Topical Film-Forming Systems Using Atomic Force Microscopy and Raman Microspectroscopy. Mol. Pharmaceutics 12, 751–757. https://doi.org/10.1021/mp500582j

Gavazzoni Dias, M.F., 2015. Hair cosmetics: An overview. Int J Trichol 7, 2–15. https://doi.org/10.4103/0974-7753.153450

Gehrcke, M., de Bastos Brum, T., da Rosa, L.S., Ilha, B.D., Soares, F.Z.M., Cruz, L., 2021. Incorporation of nanocapsules into gellan gum films: A strategy to improve the stability and prolong the cutaneous release of silibinin. Materials Science and Engineering: C 119, 111624. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111624

Gianeti, M.D., Mercurio, D.G., Maia Campos, P.M.B.G., 2013. The use of green tea extract in cosmetic formulations: not only an antioxidant active ingredient: The use of green tea extract in cosmetics. Dermatol Ther 26, 267–271. https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2013.01552.x

Giovino, C., Ayensu, I., Tetteh, J., Boateng, J.S., 2013. An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 112, 9–15. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.07.019

Gómez, A., Biswas, A., Tadini, C., Furtado, R., Alves, C., Cheng, H., 2019. Use of Natural Deep Eutectic Solvents for Polymerization and Polymer Reactions. J. Braz. Chem. Soc. 30, 717–726. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190001

Goyal, K., Konar, A., Kumar, B.S.H., Koul, V., 2018. Lactoferrin-conjugated pH and redox-sensitive polymersomes based on PEG-S-S-PLA-PCL-OH boost delivery of bacosides to the brain. Nanoscale 10, 17781–17798. https://doi.org/10.1039/C8NR03828G

Greenspan, P., Fowler, S., 1985. Spectrofluorometric studies of the lipid probe, nile red. The Journal of Lipid Research.

Grillo, I., Morfin, I., Prévost, S., 2018. Structural Characterization of Pluronic Micelles Swollen with Perfume Molecules. Langmuir 34, 13395–13408. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b03050

Gupta, Sanjeev, Gupta, Sunita, Jindal, N., Jindal, A., Bansal, R., 2013. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. Indian Dermatol Online J 4, 267–272. https://doi.org/10.4103/2229-5178.120635

Guterres, S.S., Alves, M.P., Pohlmann, A.R., 2007. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. Drug Target Insights 2, 147–157. https://doi.org/10.1177/117739280700200002

Gyulai, G., Magyar, A., Rohonczy, J., Orosz, J., Yamasaki, M., Bősze, S., Kiss, E., 2016. Preparation and characterization of cationic pluronic for surface modification and functionalization of polymeric drug delivery nanoparticles. Express Polymer Letters 10, 216–226. https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2016.20

Hamad, K., Kaseem, M., Ayyoob, M., Joo, J., Deri, F., 2018. Polylactic acid blends: The future of green, light and tough. Progress in Polymer Science 85, 83–127. https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2018.07.001

Han, H.S., Thambi, T., Choi, K.Y., Son, S., Ko, H., Lee, M.C., Jo, D.-G., Chae, Y.S., Kang, Y.M., Lee, J.Y., Park, J.H., 2015a. Bioreducible Shell-Cross-Linked Hyaluronic Acid Nanoparticles for Tumor-Targeted Drug Delivery. Biomacromolecules 16, 447–456. https://doi.org/10.1021/bm5017755

Haveli, S.D., Walter, P., Patriarche, G., Ayache, J., Castaing, J., Van Elslande, E., Tsoucaris, G., Wang, P.-A., Kagan, H.B., 2012. Hair Fiber as a Nanoreactor in Controlled Synthesis of Fluorescent Gold Nanoparticles. Nano Lett. 12, 6212–6217. https://doi.org/10.1021/nl303107w

Hoogenboom, R., Schubert, U.S., 2007. Microwave-Assisted Polymer Synthesis: Recent Developments in a Rapidly Expanding Field of Research. Macromol. Rapid Commun. 28, 368–386. https://doi.org/10.1002/marc.200600749

Huang, Y.-L., Li, Q.-B., Deng, X., Lu, Y.-H., Liao, X.-K., Hong, M.-Y., Wang, Y., 2005. Aerobic and anaerobic biodegradation of polyethylene glycols using sludge microbes. Process Biochemistry 40, 207–211. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.12.004

Jahangirian, H., Ghasemian lemraski, E., Webster, T.J., Rafiee-Moghaddam, R., Abdollahi, Y., 2017. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. IJN Volume 12, 2957–2978. https://doi.org/10.2147/IJN.S127683

Jia, L., Li, Z., Zhang, D., Zhang, Q., Shen, J., Guo, H., Tian, X., Liu, G., Zheng, D., Qi, L., 2013. Redox-responsive catiomer based on PEG-ss-chitosan oligosaccharide-ss-polyethylenimine copolymer for effective gene delivery. Polym. Chem. 4, 156–165. https://doi.org/10.1039/C2PY20781H

Jones, D.P., Carlson, J.L., Mody, V.C., Cai, J., Lynn, M.J., Sternberg, P., 2000. Redox state of glutathione in human plasma. Free Radical Biology and Medicine 28, 625–635. https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00275-0

Joshi, H., Hegde, A.R., Shetty, P.K., Gollavilli, H., Managuli, R.S., Kalthur, G., Mutalik, S., 2018. Sunscreen creams containing naringenin nanoparticles: Formulation development and in vitro and in vivo evaluations. Photodermatol Photoimmunol Photomed 34, 69–81. https://doi.org/10.1111/phpp.12335

Ju, Z., Sun, J., Liu, Y., 2019. Molecular Structures and Spectral Properties of Natural Indigo and Indirubin: Experimental and DFT Studies. Molecules 24, 3831. https://doi.org/10.3390/molecules24213831

Juan Escobar-Chavez, J., Merino, V. (Eds.), 2012. The Skin: A Valuable Route for Administration of Drugs, in: Current Technologies To Increase The Transdermal Delivery Of Drugs. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, pp. 1–22. https://doi.org/10.2174/978160805191511001010001

Jung, Y., Park, W., Park, H., Lee, D.-K., Na, K., 2017. Thermo-sensitive injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. Carbohydrate Polymers 156, 403–408. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.068

Kahraman, E., Neşetoğlu, N., Güngör, S., Ünal, D.Ş., Özsoy, Y., 2018. The combination of nanomicelles with terpenes for enhancement of skin drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 551, 133–140. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.08.053

Kahraman, E., ÿzhan, G., ÿzsoy, Y., Güngör, S., 2016. Polymeric micellar nanocarriers of benzoyl peroxide as potential follicular targeting approach for acne treatment. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 146, 692–699. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.07.029

Kaliyadan, F., Gosai, B., Al Melhim, W., Feroze, K., Qureshi, H., Ibrahim, S., Kuruvilla, J., 2016. Scanning electron microscopy study of hair shaft damage secondary to cosmetic treatments of the hair. Int J Trichol 8, 94–98. https://doi.org/10.4103/0974-7753.188035

Karki, S., Kim, H., Na, S.-J., Shin, D., Jo, K., Lee, J., 2016. Thin films as an emerging platform for drug delivery. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 11, 559–574. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004

Kathe, K., Kathpalia, H., 2017. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences 12, 487–497. https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004

Kaul, S., Gulati, N., Verma, D., Mukherjee, S., Nagaich, U., 2018. Role of Nanotechnology in Cosmeceuticals: A Review of Recent Advances. Journal of Pharmaceutics 2018, 1–19. https://doi.org/10.1155/2018/3420204

Kesente, M., Kavetsou, E., Roussaki, M., Blidi, S., Loupassaki, S., Chanioti, S., Siamandoura, P., Stamatogianni, C., Philippou, E., Papaspyrides, C., Vouyiouka, S., Detsi, A., 2017. Encapsulation of Olive Leaves Extracts in Biodegradable PLA Nanoparticles for Use in Cosmetic Formulation. Bioengineering 4, 75. https://doi.org/10.3390/bioengineering4030075

Kim, A.R., Lee, S.L., Park, S.N., 2018. Properties and in vitro drug release of pH- and temperature-sensitive double cross-linked interpenetrating polymer network hydrogels based on hyaluronic acid/poly (N-isopropylacrylamide) for transdermal delivery of luteolin. International Journal of Biological Macromolecules 118, 731–740. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.061

Kobayashi, S., 2015. Enzymatic ring-opening polymerization and polycondensation for the green synthesis of polyesters. Polym. Adv. Technol. 26, 677–686. https://doi.org/10.1002/pat.3564

Koch, S.L., Tridico, S.R., Bernard, B.A., Shriver, M.D., Jablonski, N.G., 2020. The biology of human hair: A multidisciplinary review. Am J Hum Biol 32. https://doi.org/10.1002/ajhb.23316

Kua, Y.L., Gan, S., 2019. Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) as a Greener Alternative for the Extraction of Hydrophilic (Polar) and Lipophilic (Non-Polar) Phytonutrients. KEM 797, 20–28. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.797.20

Kuppusamy, P., Li, H., Ilangovan, G., Cardounel, A.J., Zweier, J.L., Yamada, K., Krishna, M.C., Mitchell, J.B., 2002. Noninvasive imaging of tumor redox status and its modification by tissue glutathione levels. Cancer Res. 62, 307–312.

Kwan, Y.H., 2014. Handbook of cosmeceutical excipients and their safeties, Woodhead publishing series in biomedicine. Elsevier/Woodhead Publishing, Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, Amsterdam ; Boston.

Lademann, J., Knorr, F., Richter, H., Jung, S., Meinke, M.C., Rühl, E., Alexiev, U., Calderon, M., Patzelt, A., 2015. Hair follicles as a target structure for nanoparticles. Journal of Innovative Optical Health Sciences 08, 1530004. https://doi.org/10.1142/S1793545815300049

Lademann, J., Richter, H., Teichmann, A., Otberg, N., Blume-Peytavi, U., Luengo, J., Weiß, B., Schaefer, U.F., Lehr, C.-M., Wepf, R., 2007. Nanoparticles – An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 66, 159–164. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.10.019

Lalloz, A., Bolzinger, A., Briançon, S., Faivre, J., Rabanel, J., Garcia Ac, A., Hildgen, P., Banquy, G., 2019. Subtle and unexpected role of PEG in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nano-formulations into intact and impaired skin. Int J Pharm 563, 79–90. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.02.039

Laredj-Bourezg, F., Bolzinger, M.-A., Pelletier, J., Valour, J.-P., Rovère, M.-R., Smatti, B., Chevalier, Y., 2015. Skin delivery by block copolymer nanoparticles (block copolymer micelles). International Journal of Pharmaceutics 496, 1034–1046. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.11.031

Lee, H.-Y., Jeong, Y.-I., Kim, D.-H., Choi, K.-C., 2013. Permanent hair dye-incorporated hyaluronic acid nanoparticles. Journal of Microencapsulation 30, 189–197. https://doi.org/10.3109/02652048.2012.714412

Lekki, J., Stachura, Z., Dąbroś, W., Stachura, J., Menzel, F., Reinert, T., Butz, T., Pallon, J., Gontier, E., Ynsa, M.D., Moretto, P., Kertesz, Z., Szikszai, Z., Kiss, A.Z., 2007. On the follicular pathway of percutaneous uptake of nanoparticles: Ion microscopy and autoradiography studies. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms 260, 174–177. https://doi.org/10.1016/j.nimb.2007.02.021

Li, X.-Q., Wen, H.-Y., Dong, H.-Q., Xue, W.-M., Pauletti, G.M., Cai, X.-J., Xia, W.-J., Shi, D., Li, Y.-Y., 2011. Self-assembling nanomicelles of a novel camptothecin prodrug engineered with a redox-responsive release mechanism. Chem. Commun. 47, 8647–8649. https://doi.org/10.1039/c1cc12495a

Lin, Y., Yang, S., Hanifah, H., Iqbal, Q., 2018. An Exploratory Study of Consumer Attitudes Toward Green Cosmetics in the UK Market. Administrative Sciences 8, 71. https://doi.org/10.3390/admsci8040071

Liu, Benxing, Tan, L., He, C., Liu, Bingya, Zhu, Z., Gong, B., Shen, Y.-M., 2019. Redox-responsive micelles self-assembled from multi-block copolymer for co-delivery of siRNA and hydrophobic anticancer drug. Polym. Bull. 76, 4237–4257. https://doi.org/10.1007/s00289-018-2600-y

Liu, Y., Zhu, Y.-H., Mao, C.-Q., Dou, S., Shen, S., Tan, Z.-B., Wang, J., 2014. Triple negative breast cancer therapy with CDK1 siRNA delivered by cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles. Journal of Controlled Release 192, 114–121. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.001

Lohmeijer, B.G.G., Pratt, R.C., Leibfarth, F., Logan, J.W., Long, D.A., Dove, A.P., Nederberg, F., Choi, J., Wade, C., Waymouth, R.M., Hedrick, J.L., 2006. Guanidine and Amidine Organocatalysts for Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. Macromolecules 39, 8574–8583. https://doi.org/10.1021/ma0619381

Luo, C., Sun, J., Liu, D., Sun, B., Miao, L., Musetti, S., Li, J., Han, X., Du, Y., Li, L., Huang, L., He, Z., 2016a. Self-Assembled Redox Dual-Responsive Prodrug-Nanosystem Formed by Single Thioether-Bridged Paclitaxel-Fatty Acid Conjugate for Cancer Chemotherapy. Nano Lett. 16, 5401–5408. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.6b01632

Luo, C., Sun, J., Sun, B., Liu, D., Miao, L., Goodwin, T.J., Huang, L., He, Z., 2016b. Facile Fabrication of Tumor Redox-Sensitive Nanoassemblies of Small-Molecule Oleate Prodrug as Potent Chemotherapeutic Nanomedicine. Small 12, 6353–6362. https://doi.org/10.1002/smll.201601597

Magalhães, T.M., Guerra, R.C., San Gil, R.A. da S., Valente, A.P., Simão, R.A., Soares, B.G., Mendes, T. de C., Pyrrho, A. dos S., Sousa, V.P. de, Rodrigues-Furtado, V.L., 2017. PAMAM dendrimer hydrogel film—biocompatible material to an efficient dermal delivery of drugs. J Nanopart Res 19, 277. https://doi.org/10.1007/s11051-017-3965-9

Martínez Rivas, C.J., Tarhini, M., Badri, W., Miladi, K., Greige-Gerges, H., Nazari, Q.A., Galindo Rodríguez, S.A., Román, R.Á., Fessi, H., Elaissari, A., 2017. Nanoprecipitation process: From encapsulation to drug delivery. International Journal of Pharmaceutics 532, 66–81. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.08.064

Marzi, J., Brauchle, E., Carvajal Berrio, D.A., Lee Layland, S., Schenke-Layland, K., 2017. 3.7 Raman Spectroscopy, in: Comprehensive Biomaterials II. Elsevier, pp. 108–127. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.09323-1

Matos, B.N., Reis, T.A., Gratieri, T., Gelfuso, G.M., 2015. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. International Journal of Biological Macromolecules 75, 225–229. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.036

McAuley, W.J., Caserta, F., 2015. Film-Forming and Heated Systems, in: Novel Delivery Systems for Transdermal and Intradermal Drug Delivery. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 97–124. https://doi.org/10.1002/9781118734506.ch5

McEachern, M.G., McClean, P., 2002. Organic purchasing motivations and attitudes: are they ethical? International Journal of Consumer Studies 26, 85–92. https://doi.org/10.1046/j.1470-6431.2002.00199.x

Mehariya, S., Fratini, F., Lavecchia, R., Zuorro, A., 2021. Green extraction of value-added compounds form microalgae: A short review on natural deep eutectic solvents (NaDES) and related pre-treatments. Journal of Environmental Chemical Engineering 9, 105989. https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105989

Mehta, R., Kumar, V., Bhunia, H., Upadhyay, S.N., 2005. Synthesis of Poly(Lactic Acid): A Review. Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews 45, 325–349. https://doi.org/10.1080/15321790500304148

Mélissopoulos, A., Levacher, C., Robert, L., Ballotti, R., 2012. La peau structure et physiologie. Lavoisier, Paris.

Mishra, M., 2017. Concise encyclopedia of biomedical polymers and polymeric biomaterials (Volume I - II).

Montagna, W., Parakkal, P.F., 1974. The structure and function of skin, 3d ed. ed. Academic Press, New York.

Moros, J., Garrigues, S., Guardia, M. de la, 2010. Vibrational spectroscopy provides a green tool for multi-component analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 29, 578–591. https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.12.012

Mostafa, E.S., Maher, A., Mostafa, D.A., Gad, S.S., Nawwar, M.A.M., Swilam, N., 2021. A Unique Acylated Flavonol Glycoside from Prunus persica (L.) var. Florida Prince: A New Solid Lipid Nanoparticle Cosmeceutical Formulation for Skincare. Antioxidants 10, 436. https://doi.org/10.3390/antiox10030436

Mu, L., Sprando, R.L., 2010. Application of Nanotechnology in Cosmetics. Pharm Res 27, 1746–1749. https://doi.org/10.1007/s11095-010-0139-1

Munnier, E., Al Assaad, A., David, S., Mahut, F., Vayer, M., Van Gheluwe, L., Yvergnaux, F., Sinturel, C., Soucé, M., Chourpa, I., Bonnier, F., 2020. Homogeneous distribution of fatty ester-based active cosmetic ingredients in hydrophilic thin films by means of nanodispersion. Int J Cosmet Sci 42, 512–519. https://doi.org/10.1111/ics.12652

Nafisi, S., Maibach, H.I., 2018. Skin penetration of nanoparticles, in: Emerging Nanotechnologies in Immunology. Elsevier, pp. 47–88. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8

Nagaich, U., Gulati, N., 2016. Nanostructured lipid carriers (NLC) based controlled release topical gel of clobetasol propionate: design and in vivo characterization. Drug Deliv. and Transl. Res. 6, 289–298. https://doi.org/10.1007/s13346-016-0291-1

Niamlang, P., Tongrain, T., Ekabutr, P., Chuysinuan, P., Supaphol, P., 2017. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) films containing tetracycline hydrochloride-loaded quaternized chitosan nanoparticles. Journal of Drug Delivery Science and Technology 38, 36–44. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.12.006

Nikolic, L., Ristic, I., Adnadjevic, B., Nikolic, V., Jovanovic, J., Stankovic, M., 2010. Novel Microwave-Assisted Synthesis of Poly(D,L-lactide): The Influence of Monomer/Initiator Molar Ratio on the Product Properties. Sensors 10, 5063–5073. https://doi.org/10.3390/s100505063

Niu, J., Yuan, M., Chen, C., Wang, L., Tang, Z., Fan, Y., Liu, X., Ma, Y.J., Gan, Y., 2020. Berberine-Loaded Thiolated Pluronic F127 Polymeric Micelles for Improving Skin Permeation and Retention. IJN Volume 15, 9987–10005. https://doi.org/10.2147/IJN.S270336

Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R.L., Duarte, A.R.C., 2014. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. ACS Sustainable Chem. Eng. 2, 1063–1071. https://doi.org/10.1021/sc500096j

Parmar, A., Singh, K., Bahadur, A., Marangoni, G., Bahadur, P., 2011. Interaction and solubilization of some phenolic antioxidants in Pluronic® micelles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 86, 319–326. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.04.015

Patel, S., Srivastava, S., Singh, M.R., Singh, D., 2018. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. International Journal of Biological Macromolecules 107, 1888–1897. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.056

Patzelt, A., Lademann, J., 2013. Drug delivery to hair follicles. Expert Opinion on Drug Delivery 10, 787–797. https://doi.org/10.1517/17425247.2013.776038

Pavani, C., Severino, D., Villa dos Santos, N., Chiarelli-Neto, O., Baptista, M.S., 2018. Spectroscopy as a tool to evaluate hair damage and protection. Int J Cosmet Sci 40, 596–603. https://doi.org/10.1111/ics.12503

Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., Tobiszewski, M., 2020. AGREE—Analytical GREEnness Metric Approach and Software. Anal. Chem. 92, 10076–10082. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887

Płotka-Wasylka, J., 2018. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. Talanta 181, 204–209. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.013

Potts, R., 1997. Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption. Arch Dermatol 133, 924. https://doi.org/10.1001/archderm.1997.03890430146031

Prasertpol, T., Tiyaboonchai, W., 2020. Nanostructured lipid carriers: A novel hair protective product preventing hair damage and discoloration from UV radiation and thermal treatment. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 204, 111769. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111769

Pudney, P.D.A., Bonnist, E.Y.M., Mutch, K.J., Nicholls, R., Rieley, H., Stanfield, S., 2013. Confocal Raman Spectroscopy of Whole Hairs. Appl Spectrosc 67, 1408–1416. https://doi.org/10.1366/13-07086

Pyo, S.-M., Müller, R.H., Keck, C.M., 2017. Encapsulation by nanostructured lipid carriers, in: Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries. Elsevier, pp. 114–137. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00004-5

Rao, N.V., Ko, H., Lee, J., Park, J.H., 2018. Recent Progress and Advances in Stimuli-Responsive Polymers for Cancer Therapy. Front Bioeng Biotechnol 6, 110. https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00110

Reis, S., Gomes, M.J., Martins, S., Ferreira, D., Segundo, M.A., 2014. Lipid nanoparticles for topical and transdermal application for alopecia treatment: development, physicochemical characterization, and in vitro release and penetration studies. IJN 9, 1231–1242. https://doi.org/10.2147/IJN.S45561

Robbins, C.R., 2012. Chemical and physical behavior of human hair. Springer, Berlin; New York.

Roso, A., Brinet, R., 2004. Rheology and Texture Analysis Used Together to Improve Raw Material Choices. Cosmetics and Toiletries 119, 53–60.

Sackett, D.L., Wolff, J., 1987. Nile red as a polarity-sensitive fluorescent probe of hydrophobic protein surfaces. Analytical Biochemistry 167, 228–234. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90157-6

Salvioni, L., Morelli, L., Ochoa, E., Labra, M., Fiandra, L., Palugan, L., Prosperi, D., Colombo, M., 2021. The emerging role of nanotechnology in skincare. Advances in Colloid and Interface Science 293, 102437. https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102437

Santos, A.C., Panchal, A., Rahman, N., Pereira-Silva, M., Pereira, I., Veiga, F., Lvov, Y., 2019. Evolution of Hair Treatment and Care: Prospects of Nanotube-Based Formulations. Nanomaterials 9, 903. https://doi.org/10.3390/nano9060903

Sasatsu, M., Onishi, H., Machida, Y., 2006. In vitro and in vivo characterization of nanoparticles made of MeO-PEG amine/PLA block copolymer and PLA. International Journal of Pharmaceutics 317, 167–174. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.057

Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M., Shinoda, T., 1960. The spectrophotometric determination of amine, amino acid and peptid with 2,4,6-Trinitrobenzene 1-sulfonic acid. J Biochem (Tokyo) 47, 654–660.

Schmidt, U., Hild, S., Ibach, W., Hollricher, O., 2005. Characterization of Thin Polymer Films on the Nanometer Scale with Confocal Raman AFM. Macromol. Symp. 230, 133–143. https://doi.org/10.1002/masy.200551152

Schneider, S.L., Lim, H.W., 2019. A review of inorganic UV filters zinc oxide and titanium dioxide. Photodermatol Photoimmunol Photomed 35, 442–446. https://doi.org/10.1111/phpp.12439

Shamdasani, P., Ong Chon-Lin, G., Richmond, D., 1993. Exploring Green Consumers In An Oriental Culture: Role Of Personal And Marketing Mix Factors. Advances in Consumer Research 20.

Shi, M., Zhang, H., Song, T., Liu, X., Gao, Y., Zhou, J., Li, Y., 2019. Sustainable Dual Release of Antibiotic and Growth Factor from pH-Responsive Uniform Alginate Composite Microparticles to Enhance Wound Healing. ACS Appl. Mater. Interfaces 11, 22730–22744. https://doi.org/10.1021/acsami.9b04750

Siddique, M.I., Katas, H., Amin, M.C.I.M., Ng, S.-F., Zulfakar, M.H., Jamil, A., 2016. In-vivo dermal pharmacokinetics, efficacy, and safety of skin targeting nanoparticles for corticosteroid treatment of atopic dermatitis. International Journal of Pharmaceutics 507, 72–82. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.005

Simón, L., Goodman, J.M., 2007. The Mechanism of TBD-Catalyzed Ring-Opening Polymerization of Cyclic Esters. J. Org. Chem. 72, 9656–9662. https://doi.org/10.1021/jo702088c

Sin, L.T., Rahmat, A.R., Rahman, W.A.W.A., 2013. Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications, First edition. ed, Plastics design library. Elsevier, WA, Amsterdam ; Boston.

Singla, P., Mehta, R., Berek, D., Upadhyay, S.N., 2012. Microwave Assisted Synthesis of Poly(lactic acid) and its Characterization using Size Exclusion Chromatography. Journal of Macromolecular Science, Part A 49, 963–970. https://doi.org/10.1080/10601325.2012.722858

Singla, P., Singh, O., Sharma, S., Betlem, K., Aswal, V.K., Peeters, M., Mahajan, R.K., 2019. Temperature-Dependent Solubilization of the Hydrophobic Antiepileptic Drug Lamotrigine in Different Pluronic Micelles—A Spectroscopic, Heat Transfer Method, Small-Angle Neutron Scattering, Dynamic Light Scattering, and in Vitro Release Study. ACS Omega 4, 11251–11262. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00939

Smewing, J., 2007. Texture analysis to select packaging and formulate hair care products. Cosmetics and Toiletries 122, 107–112.

Snyder, S.L., Sobocinski, P.Z., 1975. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. Analytical Biochemistry 64, 284–288. https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90431-5

Södergård, A., Stolt, M., 2010. Industrial Production of High Molecular Weight Poly(Lactic Acid), in: Auras, R., Lim, L.-T., Selke, S.E.M., Tsuji, H. (Eds.), Poly(Lactic Acid). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 27–41. https://doi.org/10.1002/9780470649848.ch3

Song, N., Liu, W., Tu, Q., Liu, R., Zhang, Y., Wang, J., 2011. Preparation and in vitro properties of redox-responsive polymeric nanoparticles for paclitaxel delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 87, 454–463. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.06.009

Sun, B., Luo, C., Yu, H., Zhang, X., Chen, Q., Yang, W., Wang, M., Kan, Q., Zhang, H., Wang, Y., He, Z., Sun, J., 2018. Disulfide Bond-Driven Oxidation- and Reduction-Responsive Prodrug Nanoassemblies for Cancer Therapy. Nano Lett. 18, 3643–3650. https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.8b00737

Sun, C., Li, X., Du, X., Wang, T., 2018. Redox-responsive micelles for triggered drug delivery and effective laryngopharyngeal cancer therapy. International Journal of Biological Macromolecules 112, 65–73. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.136

Sun, H., Zhang, Y., Zhong, Z., 2018. Reduction-sensitive polymeric nanomedicines: An emerging multifunctional platform for targeted cancer therapy. Advanced Drug Delivery Reviews 132, 16–32. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.05.007

Sun, P., Zhou, D., Gan, Z., 2011. Novel reduction-sensitive micelles for triggered intracellular drug release. Journal of Controlled Release 155, 96–103. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.11.005

Sun, X.-Y., Ren, W.-M., Liu, S.-J., Jia, Y.-B., Wang, Y.-M., Lu, X.-B., 2018. Tandem Lewis Pair Polymerization and Organocatalytic Ring-Opening Polymerization for Synthesizing Block and Brush Copolymers. Molecules 23, 468. https://doi.org/10.3390/molecules23020468

Sutter, M., Oliveira, S., Sanders, N.N., Lucas, B., van Hoek, A., Hink, M.A., Visser, A.J.W.G., De Smedt, S.C., Hennink, W.E., Jiskoot, W., 2007. Sensitive Spectroscopic Detection of Large and Denatured Protein Aggregates in Solution by Use of the Fluorescent Dye Nile Red. J Fluoresc 17, 181–192. https://doi.org/10.1007/s10895-007-0156-6

Takahashi, T., 2018. A highly resistant structure between the cuticle and the cortex of human hair. II. - CARB, a penetration barrier. International Journal of Cosmetic Science 41, 28–35. https://doi.org/10.1111/ics.12507

Tang, Y., Zhang, Z., Yang, S., Smith, G.J., Liu, L., 2021. Diatomite encapsulated AgNPs as novel hair dye cosmetics: Preparation, performance, and toxicity. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 200, 111599. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111599

Thauvin, C., Maudens, P., Allémann, E., 2021. Microwave-assisted synthesis of self-assembling bi-functionalizable amphiphilic diblock copolymers. Journal of Drug Delivery Science and Technology 61, 102255. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102255

Tinoco, A., Gonçalves, F., Costa, A.F., Freitas, D.S., Cavaco-Paulo, A., Ribeiro, A., 2021. Keratin:Zein particles as vehicles for fragrance release on hair. Industrial Crops and Products 159, 113067. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113067

Tobin, D.J., 2006. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. Chem. Soc. Rev. 35, 52–67. https://doi.org/10.1039/B505793K

Toll, R., Jacobi, U., Richter, H., Lademann, J., Schaefer, H., Blume-Peytavi, U., 2004. Penetration Profile of Microspheres in Follicular Targeting of Terminal Hair Follicles. Journal of Investigative Dermatology 123, 168–176. https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22717.x

Tong, R., Xia, H., Lu, X., 2013. Fast release behavior of block copolymer micelles under high intensity focused ultrasound/redox combined stimulus. J. Mater. Chem. B 1, 886–894. https://doi.org/10.1039/C2TB00222A

Tran, P.H.-L., Choe, J.-S., Tran, T.T.-D., Park, Y.M., Lee, B.-J., 2011. Design and Mechanism of On–Off Pulsed Drug Release Using Nonenteric Polymeric Systems via pH Modulation. AAPS PharmSciTech 12, 46–55. https://doi.org/10.1208/s12249-010-9562-1

Tran, T.T.D., Tran, P.H.L., 2019. Controlled Release Film Forming Systems in Drug Delivery: The Potential for Efficient Drug Delivery. Pharmaceutics 11, 290. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060290

Uchechi, O., Ogbonna, J.D.N., Attama, A.A., 2014. Nanoparticles for Dermal and Transdermal Drug Delivery, in: Sezer, A.D. (Ed.), Application of Nanotechnology in Drug Delivery. InTech. https://doi.org/10.5772/58672

Van Gheluwe, L., Chourpa, I., Gaigne, C., Munnier, E., 2021. Polymer-Based Smart Drug Delivery Systems for Skin Application and Demonstration of Stimuli-Responsiveness. Polymers 13, 1285. https://doi.org/10.3390/polym13081285

Velasco, M.V.R., Dias, T.C. de S., Freitas, A.Z. de, Júnior, N.D.V., Pinto, C.A.S. de O., Kaneko, T.M., Baby, A.R., 2009. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. Braz. J. Pharm. Sci. 45, 153–162. https://doi.org/10.1590/S1984-82502009000100019

Villanueva, M.E., Cuestas, M.L., Pérez, C.J., Campo Dall' Orto, V., Copello, G.J., 2019. Smart release of antimicrobial ZnO nanoplates from a pH-responsive keratin hydrogel. Journal of Colloid and Interface Science 536, 372–380. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.067

Voss, G.T., Gularte, M.S., de Oliveira, R.L., Luchese, C., Fajardo, A.R., Wilhelm, E.A., 2020. Biopolymeric films as delivery vehicles for controlled release of hydrocortisone: Promising devices to treat chronic skin diseases. Materials Science and Engineering: C 114, 111074. https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111074

Wang, R., Wang, Q., Li, L., 2003. Evaporation behaviour of water and its plasticizing effect in modified poly(vinyl alcohol) systems: Evaporation of water and plasticizing effect in modified PVA. Polym. Int. 52, 1820–1826. https://doi.org/10.1002/pi.1385

Wils, L., Leman-Loubière, C., Bellin, N., Clément-Larosière, B., Pinault, M., Chevalier, S., Enguehard-Gueiffier, C., Bodet, C., Boudesocque-Delaye, L., 2021. Natural deep eutectic solvent formulations for spirulina: Preparation, intensification, and skin impact. Algal Research 56, 102317. https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102317

Xiao, R.Z., Zeng, Z.W., Zhou, G.L., Wang, J.J., Li, F.Z., Wang, A.M., 2010. Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles. International Journal of Nanomedicine 5, 1057–1065. https://doi.org/10.2147/IJN.S14912

Xu, Z., Liu, S., Kang, Y., Wang, M., 2015. Glutathione-Responsive Polymeric Micelles Formed by a Biodegradable Amphiphilic Triblock Copolymer for Anticancer Drug Delivery and Controlled Release. ACS Biomater. Sci. Eng. 1, 585–592. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.5b00119

Xue, P., Liu, D., Wang, J., Zhang, N., Zhou, J., Li, L., Guo, W., Sun, M., Han, X., Wang, Y., 2016. Redox-Sensitive Citronellol–Cabazitaxel Conjugate: Maintained in Vitro Cytotoxicity and Self-Assembled as Multifunctional Nanomedicine. Bioconjugate Chemistry 27, 1360–1372. https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00155

Yang, W., Zhao, X., 2019. Glutathione-Induced Structural Transform of Double-Cross-Linked PEGylated Nanogel for Efficient Intracellular Anticancer Drug Delivery. Mol. Pharmaceutics 16, 2826–2837. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00467

Zaid Alkilani, A., Hamed, R., Al-Marabeh, S., Kamal, A., Abu-Huwaij, R., Hamad, I., 2018. Nanoemulsion-based film formulation for transdermal delivery of carvedilol. Journal of Drug Delivery Science and Technology 46, 122–128. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.05.015

Zalipsky, S., Qazen, M., Walker, J.A., Mullah, N., Quinn, Y.P., Huang, S.K., 1999. New Detachable Poly(ethylene glycol) Conjugates: Cysteine-Cleavable Lipopolymers Regenerating Natural Phospholipid, Diacyl Phosphatidylethanolamine. Bioconjugate Chem. 10, 703–707. https://doi.org/10.1021/bc990031n

Zhao, Y., Wang, Z., Wang, J., Mai, H., Yan, B., Yang, F., 2004. Direct synthesis of poly(D,L-lactic acid) by melt polycondensation and its application in drug delivery. J. Appl. Polym. Sci. 91, 2143–2150. https://doi.org/10.1002/app.13354

Zou, M., Barton, B., Geertz, G., Brüll, R., 2019. Accurate determination of the layer thickness of a multilayer polymer film by non-invasive multivariate confocal Raman microscopy. Analyst 144, 5600–5607. https://doi.org/10.1039/C9AN00664H

Annexe

International Journal of
Cosmetic Science

International Journal of Cosmetic Science, 2020, 1–8 doi: 10.1111/ics.12652

Homogeneous distribution of fatty ester-based active cosmetic ingredients in hydrophilic thin films by means of nanodispersion

Emilie Munnier*, Almar Al Assaad*, Stephanie David*, Frédéric Mahut†, Marylène Vayer†, Louise Van Gheluwe*, Florent Yvergnaux‡, Christophe Sinturel†, Martin Soucé*, Igor Chourpa* and Franck Bonnier*

*EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes (NMNS), Faculté de Pharmacie, Université de Tours, 31 avenue Monge 37200, Tours, France, †Interfaces, Confinement, Matériaux et Nanostructures (ICMN), CNRS-Université d'Orléans, UMR 7374, 1b, Rue de la Férollerie, C.S. 40059, Orléans Cedex 2 45071, France and ‡Bioeurope (Solabia group), Route d'Oulins, Anet 28 260, France

Received 15 May 2020, Revised 30 June 2020, Accepted 15 July 2020

Abstract

OBJECTIVE: Cosmetic films and patches are interesting forms to promote skin penetration of active ingredients as they ensure their long stay on the treated zone of the skin. Nevertheless, currently developed films and patches are most of all hydrophilic and are not adapted to the hydrophobic molecules. The aim of this study was to establish whether nanodispersion of fatty acid-based active cosmetic ingredients (ACI) could be a manner to introduce high concentrations of those ACI in hydrophilic films.

METHODS: Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters (PHE) constitute a commercialized lipolytic cosmetic ingredient obtained by enzymatic conjugation of tyrosol to long-chain fatty acids and to enhance its skin diffusion. Nanodispersions of PHE were prepared by a green emulsion-solvent evaporation process and dispersed in polyvinyl alcohol films. Raman imaging coupled to multivariate analysis was used to study the distribution of PHE in the films.

RESULTS: Nanodispersions of PHE combined with antioxidant vitamin E and stabilized by Pluronic® F127 were successfully prepared. The nanodispersions show a spherical shape and a hydrodynamic diameter close to 100 nm. Raman images analysis with multivariate approaches showed a very homogeneous distribution of PHE nanodispersions in the films compared to free PHE introduced as an ethanol solution.

CONCLUSION: Nanodispersions of hydrophobic fatty acid-based ingredients seem to be relevant method to introduce this type of ingredient in hydrophilic film matrix. The co-suspension with vitamin E limits their degradation in time.

Resumé

OBJECTIF: Les films et patchs cosmétiques sont des formes intéressantes pour augmenter la pénétration cutanée des actifs cosmétiques car ils assurent une exposition prolongée de la zone de peau traitée ce qui favorise la diffusion. Néanmoins, les films et patchs actuellement développés sont majoritairement de nature hydrophile et ne sont pas adaptés aux molécules hydrophobes. Le but de cette étude est d'établir si la nanodispersion d'actifs cosmétiques à base d'acides gras peut être un moyen d'introduire des concentrations élevées de ces actifs dans des films hydrophiles.

MÉTHODES: Les esters hydroxyphénéthyliques de l'huile de graines de grenade Punica granatum (PHE) sont commercialisés comme un agent lipolytique. Cet actif obtenu par conjugaison enzymatique du tyrosol à des acides gras à longue chaîne ce qui favorise sa pénétration cutanée. Des nanodispersions de PHE ont été préparées par un procédé d'émulsion- évaporation développé avec un solvant vert. Ces nanosystèmes sont ensuite dispersées dans des films d'alcool polyvinylique. L'imagerie Raman couplée à une méthode d'analyse statistique multivariée a été utilisée pour étudier la distribution des PHE dans les films.

RÉSULTATS: Des nanodispersions de PHE associées à de la vitamine E antioxydante et stabilisées par Pluronic® F127 ont été préparées avec succès. Les nanodispersions présentent une forme sphérique et un diamètre hydrodynamique proche de 100 nm. L'analyse d'images Raman au moyen d'une approche multivariée a montré une distribution très homogène des nanodispersions dans les films par rapport aux PHE libres introduits sous forme de solution éthanolique.

CONCLUSION: Les nanodispersions d'ingrédients hydrophobes à base d'acides gras semblent être une méthode pertinente pour introduire ce type d'ingrédient dans la matrice de film hydrophile. L'introduction de vitamine E dans les nanodispersion ralentit leur dégradation.

Correspondence: Emilie Munnier, Université de Tours, EA 6295 Nanomédicaments et Nanosondes (NMNS), Faculté de Pharmacie, 31 avenue Monge 37200 Tours, France. Tel.: +33 247367201; fax +33 247367199; e-mail: emilie.munnier@univ-tours.fr

Introduction

Fatty acids (FAs) are well known in the cosmetic industry as emollients or functional ingredients used to texturize products. Lately, covalently bonding active cosmetic ingredients (ACI) to FAs represents a more and more developed way to enhance skin penetration of small hydrophilic active cosmetic ingredients and increase their activity [1, 2]. Moreover, intrinsic properties of some FA, in particular that of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), confer to cosmetic products antimicrobial [3], antioxidant [4] or anti-ageing [5] activity. The low polarity of those esters promotes an easy introduction into the organic phase of emulsion-based products like creams or into products rich in surfactants like shower gels or shampoos. In contrast, introduction of high concentrations of FAs into water-based products like gels, lotions or films is limited.

Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl ester (PHE) is a commercialized active cosmetic ingredient obtained by enzymatic esterification of pomegranate oil by tyrosol. The major and most active molecule of PHE is tyrosyle punicate (Fig. 1). This ester

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

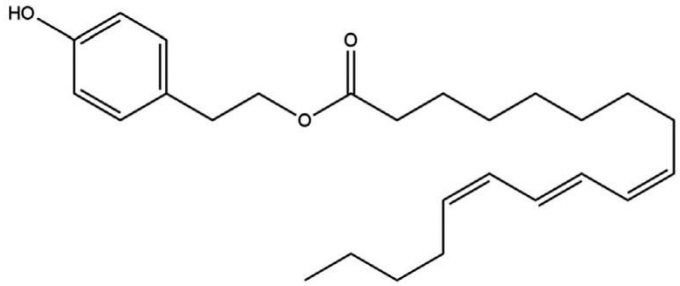


Figure 1 Chemical structure of the major constituent of PHE: tyrosyle punicate.

associates the lipolytic actions of tyrosol and punicic acid, a PUFA. The resulting cosmetic active ingredient is prone to oxidation in the presence of light, water and oxygen mainly because of the reactivity of the three conjugated double bonds of the punicic chain (Fig. 1) [1].

Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters have a melting temperature close to 30°C and are semi-solid at room temperature. PHE is soluble in oils and organic solvents. It has interesting skin penetration properties due to its amphiphilic structure. Nevertheless, it could take advantage of a longer diffusion time at the surface of the skin to increase its concentration in the deep layers, where it exerts its lipolytic action. This ACI could then benefit of film-forming formulation strategy. Indeed, a film formed in direct contact with the *stratum corneum* confers to molecules an extended diffusion time [6] and thus favours its penetration in the skin. As film-forming molecules, recent cosmetic products integrate predominantly water-soluble polymers, among which are polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone, or polysaccharides (alginate, pullulan, chitosan) [7, 8]. Therefore, it is very difficult to include large amounts of lipid-based active ingredients in these hydrophilic polymers. To address the issue of solubility, current strategy is to add to the preparation some water-miscible organic solvent, most commonly ethanol [9] or isopropanol [6, 10]. However, the organic solvents do not ensure a homogeneous distribution of the active molecules within the resulting film [11] although they can affect the skin integrity.

It has already been demonstrated that nanoencapsulation of lipophilic molecules can increase their concentration in a gel while keeping its pH, rheological or sensory properties unchanged [12, 13]. Moreover, nanosystems have also been used to disperse homogeneously an active molecule in films for transdermal or dermal delivery [6, 10, 14–17]. In the present study, a nanodispersion of Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl ester (PHE) was prepared by an ultrasound-mediated emulsion–evaporation method. A triblock copolymer surfactant, poly(ethylene oxide)–*block*-poly (propylene oxide)-*block*-poly(ethylene oxide) (PEO-b-PPO-b-PEO), was chosen to stabilize the nanodispersions as this family of polymers proved their ability to stabilize nanosystems and to increase skin penetration of active molecules [18–20]. A natural antioxidant molecule, α-tocopherol, was co-suspended in the aim of limiting the oxidation of PHE in aqueous environment. The nanodispersions were characterized in terms of size, ACI loading and skin penetration. They were included in a model film of polyvinyl alcohol, a usual film-forming agent in cosmetic products, like peel off masks or patches. The homogeneity of the distribution of PHE in dry films was explored by Raman imaging coupled to chemometrics.

Materials and methods

Chemicals

Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters (PHE) commercialized as Delipidol® was kindly provided by Solabia (Pantin, France). Pluronic® F127 was kindly provided by BASF (Levallois-Perret, France). Polyvinyl alcohol (Mw: 31 000–50 000 g/mol, 87–89% hydrolysed) (PVA), α-tocopherol and dimethyl carbonate (DMC) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Ultrapure water was obtained with a MilliQ system (Millipore, France).

Preparation of NanoPHE

Suspensions of NanoPHE were prepared by the emulsion/evaporation method assisted by ultrasounds [21]. The aqueous phase was prepared by dissolving 600 mg of Pluronic® F127 in 10.5 g of ultrapure water. The organic phase was prepared dissolving 1250 mg of PHE and 100 mg of α-tocopherol in 2.75 g DMC. The nanoemulsion was obtained by sonicating the latter mixture during 2 min in a glass rosette cell (20 kHz, amplitude 30%, Vibracell 75041 – Sonics). DMC was then evaporated at 25°C (25 mbar 30 min, LABOROTA 40001 – Heidolph) to obtain nanodispersion (NanoPHE). The volume of the preparation was adjusted to 20 ml with ultrapure water to ensure the reproducibility of the concentration.

Characterization of NanoPHE

Morphology

Samples were diluted in ultrapure water and deposited on a mica substrate by spin coating before analysis with atomic force microscopy (AFM, Nano-Observer – CSInstruments AFM, CSI, France). A FORT type tip (AppNano, k = 2.5 N/m; f = 60 KhZ) in a resonant AFM mode was preferred.

Size and surface charge

Average hydrodynamic particle diameter (HD) and polydispersity index (PdI) of NanoPHE were assessed at 25°C using a dynamic light scattering (DLS) instrument (NanoZS, Malvern Instruments,

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

UK). Each sample was diluted 1:10 in ultrapure water before measurements, with the detection angle of 173° and a laser wavelength of 633 nm. NanoPHE zeta potential was measured on the same dilution with the same equipment, with the detection angle at 13° and a 633 nm red laser. All measurements were carried out in triplicate.

PHE determination in NanoPHE suspensions

Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters were determined by high-performance liquid chromatography (for more details, see Supporting Information S1). The loading of NanoPHE was estimated by dividing the weight of PHE determined in the suspension by the sum of this weight and the theoretical weight of Pluronic® F127 in the suspension.

Preparation and characterization of PHE-loaded PVA films

Films were prepared with the film casting method. PVA/ PHE samples were prepared by mixing a water solution of PVA with a solution of PHE in ethanol (90:10). The mixture was stirred for 30 min. In a similar way, PVA/NanoPHE suspension was prepared by mixing a water solution of PVA with a colloidal suspension of NanoPHE in water. The resulting suspension was stirred for 30 min. For both preparations, the weight ratio between PHE and PVA was 1:10, and the final concentrations of PVA and PHE were 10 and 1% wt./wt., respectively. The films were prepared by depositing 300 µl of suspension or solution on a glass slide. Beforehand, a 0.5 cm-width channel was created with adhesive tape placed parallel of both side of the glass slide. The suspension was then evenly spread along the channel by using another glass slide, leaving a liquid film of constant thickness. Finally, samples were air-dried under a hood for at least 6 h in order to ensure compete evaporation of the solvent, leaving the dried film supported on the glass.

The thickness of each film was measured on three points to be certain of the reproducibility of the film casting. It was determined using a Micromar 40 EXL digital micrometer (Mahr Technology, France), by subtracting the substrate thickness to the thickness of the area where the film was deposited.

Raman imaging

Acquisition

Raman spectral images were acquired on 10- to 12-week-old films using an Alpha 300R microspectrometer (WITec, Ulm, Germany). Spectral data were collected using a 532 nm DPSS excitation laser source delivering 10 mW at the sample under a ×50 Epiplan HD objective (Zeiss, NA 0.5). The laser power was purposely turned down to avoid photodamaging of samples. Backscattered light was detected by dispersing Raman-shifted radiation onto a Deep Depletion CCD detector (1024 × 128 pixels) using a grating (600 lines/mm) resulting in a spectral resolution of ≈4 cm^{-1}. Raman maps were recorded with 1 µm steps in the x and y directions and each spectrum resulted from 2 accumulations of 5 s. For each condition, three films deposited on three independent slides were analysed in addition to the reference compounds (PHE, NanoPHE) and control PVA films containing no PHE.

Data handling

Data analysis was performed using MATLAB (MathWorks, USA). Before statistical analysis, Raman spectra were subjected to baseline correction (Lieber correction) followed by vector normalization. Non-negatively constrained least squares (NCLS) analysis is a an unmixing method for spectral data sets initially used to subtract contribution from interfering compound such as paraffin in Raman images collected from skin sections [22]. Recently, the method has been adapted to study ACI distribution in permeation studies in reconstructed human skin. Detailed method description can be found in recent work published by Miloudi *et al.* [23]. The analysis delivers a semi-quantitative estimation (spectral abundance) of the ACI into the Raman maps. In the present study, NCLS is applied to investigate difference in homogeneity of PHE distribution between the two types of polymeric films prepared, namely PVA/PHE and PVA/NanoPHE.

The fitting can be achieved using spectra collected from pure biomolecules. However, it has been demonstrated that distribution of ACI into a complex matrix can be more accurately obtained using reference spectra from blank samples, containing no ACI. Therefore, in the present study Raman images were collected from control PVA films containing no PHE to create a large set of reference spectra accounting for the polymeric matrix. In addition, a pure spectrum of PHE was also integrated during NCLS ultimately to be able to reconstruct abundance map.

Results and discussion

Preparation of nanodispersion of Punica granatum seed oil hydroxyphenethyl esters

The research community is now convinced of the interest of nanoformulation in health care and well-being [24–26] but is also aware of the urge to adhere to greener ingredients and processes. The use of ultrasound-based methods was recently considered green because it is low-energy consuming [27]. Here, ultrasound-assisted emulsion–evaporation was made even more sustainable by the use of a non-toxic green solvent, dimethyl carbonate (DMC), instead of traditionally used toxic solvents like methylene chloride [28] to compose the organic phase. To our knowledge, this is the first time that DMC was used to successfully produce nanosystems. Kim et al used DMC to prepare microparticles with mitigated results in terms of reproducibility [29]. The main obstacle evoked by these authors was the relative solubility of DMC in water and the difficulty to evaporate it completely. In the present study, the residual DMC in nanodispersions of PHE (NanoPHE) was assessed by gas chromatography. After 30 min of rotary evaporation, DMC constituted on average 0.1% wt./wt. of the suspension (for more details, see Supporting Information S2). The small size, then large surface/volume index of NanoPHE may have permitted an optimal elimination of the solvent during the evaporation phase.

Punicic acid, as every PUFA, can be easily oxidized in presence of water. Despite it was shown that the esterification of PUFAs could slow their oxidation [1], in aqueous nanodispersion, the risk of oxidation is high, because the surface of PHE contact with water is large. In order to reduce the risk of PHE oxidation, α-tocopherol (Vit E), a widely used lipophilic antioxidant, was added in DMC prior to nanoemulsification for an intimate mix with PHE. Vit E has already proven its ability to protect from oxidation co-encapsulated active molecules [30]. In our study, Vit E concentration was 0.5% wt/wt of the resulting NanoPHE suspension (for more details, see Supporting Information S1). The optimal formula described in the material and methods section leads to a water suspension of spherical nanosystems with a concentration in PHE of 10 % wt/wt.

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

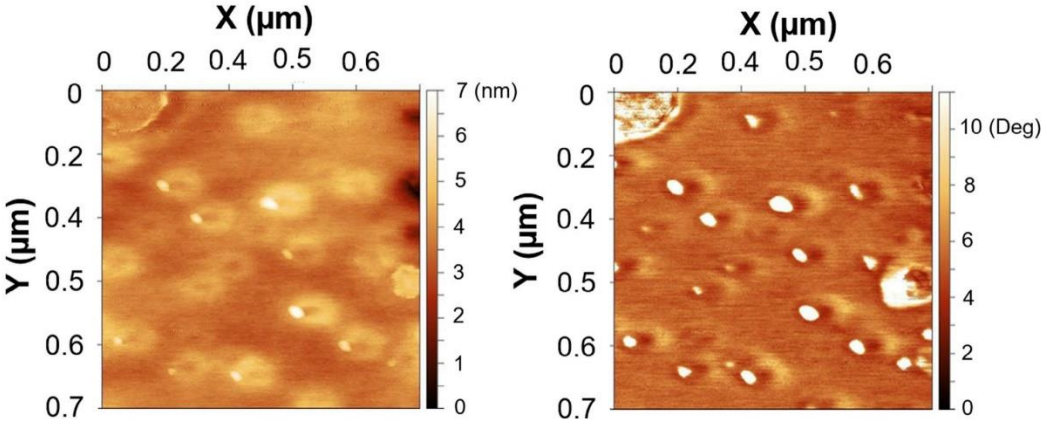


Figure 2 Morphology of NanoPHE as observed by atomic force microscopy. (a) Topography mode and (b) phase image.

Table 1 Physicochemical characteristics of NanoPHE, initially or after 3 months of shelf life at room temperature.

	Hydrodynamic diameter (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)
NanoPHE	105 ± 5	0.114 ± 0.010	−11.9 ± 2.5
NanoPHE,	111 ± 2	0.068 ± 0.017	−11.3 ± 2.8

The loading in PHE of an individual particle is close to 64% wt./wt. This high loading could be achieved because no dilution of PHE in a lipid or polymer matrix is necessary during the process developed. Figure 2 shows individual nanoparticles observed by AFM after deposition on a silicon wafer, exhibiting round particles with a diameter close to 100 nm and a donut shape (i.e. with a depression in the centre of the object). The non-spherical shape observed on the AFM images can be attributed to a sagging of the soft particles on the substrate during drying and/or to deformations induced by the AFM tip. Thus, it is not reflecting the actual shape of the particles in water.

NanoPHE samples typically displayed hydrodynamic diameter values of 105 nm ± 5 nm (Table 1). They could be introduced without destabilization in a water-based cosmetic product as their size was not significantly modified by dilution up to 1:1000 (111 ± 2 nm). Nanodispersions of punicic acid monoglycerides, a close compound, were previously prepared by Cao et al for nutrition application [31]. A similar process involving ultrasounds was employed producing nanoobjects with an average size around 6 nm. In the present study, objects with a D_H of ca 100 nm are more compatible with cosmetic applications.

For the initial NanoPhe, the polydispersity index was inferior to 0.15, showing samples were nearly monodisperse. After 1:1000 dilution, the suspensions were monodisperse, with the PdI values of 0.077. The zeta potential is slightly negative and reproducible (≈−11 mV). Electrostatic repulsion of the particles was not an issue as the colloidal stability was expected to be ensured by the steric hindrance of the PEO chains of Pluronic® F127 stabilizing the system [32]. Colloidal characteristics were stable after a shelf life of three months at room temperature (Table 1).

Dispersion of PHE in polyvinyl alcohol films

Films were prepared on a glass slide by air-drying a solution containing the film-forming agent PVA and commercial PHE dissolved in ethanol (10% V/V) or NanoPHE. There is naturally a large variability in thickness of films applied onto the skin by customers depending on their usage of products and amounts applied. Commonly it is however well spread across large skin surface resulting in thin films of few microns. Even if there is no consensus on the thickness of the residual film after air-drying of a cosmetic product on the skin, for the purpose of the study, 10 µm films were prepared on glass slides enabling reproducible samples preparation and analysis with Raman spectroscopy. The average thickness of the analysed areas was 9.6 ± 2.4 µm.

Raman imaging was performed on control films (containing no PHE), PHE-loaded films with no vitamin E supplementation and NanoPHE-loaded films to study the distribution of ingredients based on their spectral signatures. Each pixel of spectral images collected contained a combination of spectral features originating from the different ingredients. PHE was characterized by a specific Raman signature with main peaks located at 1635 cm^{-1} (ν C = C), 1253 cm^{-1} (δ C = CH) and 1157 cm^{-1} (ν C-C) (Fig. 3, spectrum A). In comparison, PVA spectrum (spectrum D in Fig. 3) did not display strong, sharp features, but only few broader bands corresponding to C-C stretching at 856 cm^{-1} and 920 cm^{-1}, C-H and O-H bending at 1360 cm^{-1} and 1440 cm^{-1}. Additional bands of PVA, that is C-O stretching, O-H banding and C-C stretching, can be found between 1000 and 1150 cm^{-1} without clear distinction due to overlapping of peaks [33]. As a result, PHE and PVA exhibit

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

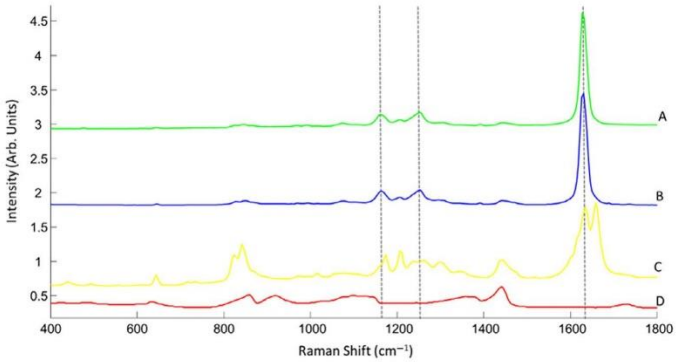


Figure 3 Raman spectra of main compounds: (a) PHE, (b) NanoPHE, (c) degraded PHE and (d) PVA control. Spectra offset for clarity. Dotted line highlights most relevant features of PHE.

strong contrast in band positions and intensities with reduced overlapping between features. Although NanoPHE are chemically complex structures containing Pluronic® F127 at the surface and a mixture of PHE/α-tocopherol into the core, the Raman spectrum of NanoPHE (spectrum B in Fig. 3) remained similar to that of pure PHE. This is explained by the particularly intense Raman response of PHE compared to Pluronic® F127 and enhanced by the low concentration α-tocopherol in nanodispersions. The molecular fingerprint delivered by Raman spectroscopy enables to witness spectral modifications in chemical structures. For instance, PHE can be subject to degradation by oxidation, which is characterized by specific spectral features (Fig. 3, spectrum C). The strong decrease in the main feature intensity at 1630 cm^{-1} in the degraded form of PHE leads to other weaker bands to appear more intense due to changes in band ratio. Despite change in scaling, it was observed that there was no difference in features at 644 cm^{-1}, 824 cm^{-1}, 842 cm^{-1}, 1444 cm^{-1} between the native PHE and the oxidized PHE (Fig. 3, spectra A and C, respectively). In contrast, the most obvious modifications in the Raman spectrum of degraded NanoPHE were the presence of a double peak at 1635–1660 cm^{-1}, but also a shift in the band at 1157 to 1174 cm^{-1} and a shoulder in the band at 1244 cm^{-1}.

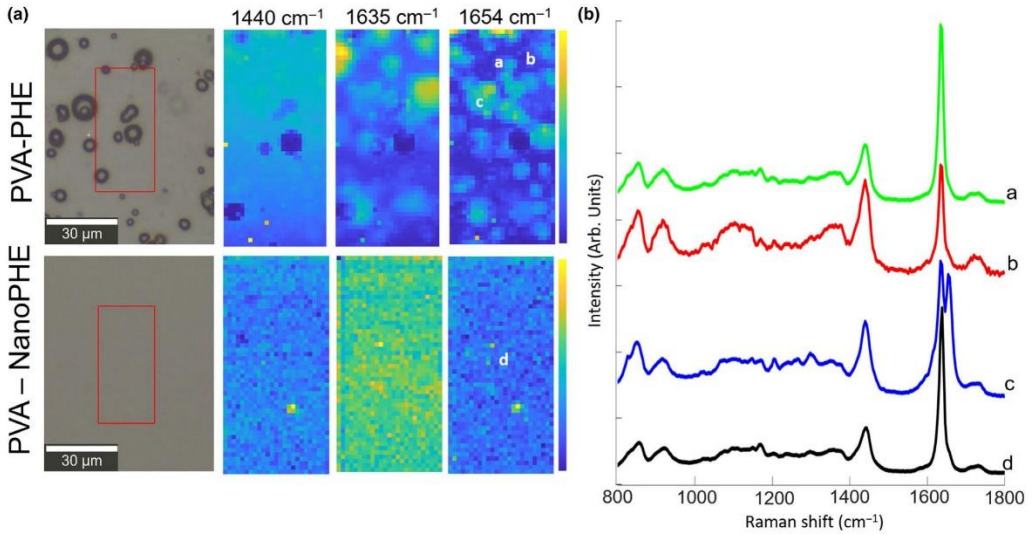


Figure 4 (a) White light images of the PVA PHE and PVA-NAnoPHE films with corresponding intensity maps at 1440, 1635 and 1654 cm^{-1}. (b) Raman spectra extracted from position labelled a, b, c and d on images. Spectra offset for clarity.

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

Figure 4 shows bright field images for PVA films with free PHE and NanoPHE. Although PVA films with free PHE display a number of spherical objects unevenly distributed across the field of view, PVA films with NanoPHE appear visually uniform. Raman band intensity maps at 1440 cm^{-1} (main PVA feature), 1635 cm^{-1} (main PHE feature) and 1654 cm^{-1} (found in degraded PHE) enable to observe different patterns in ingredients distribution. For PVA-PHE film, spectra exhibit different intensities in the PHE feature at 1635 cm^{-1} across the analysed area suggesting the ACI is unevenly distributed (Fig. 4B, spectra a and b). The comparison of intensity maps at 1635 and 1654 cm^{-1} adds further emphasis on the presence of areas with high accumulation of degraded PHE, whereas others display only native PHE (Fig. 4B, spectrum c). Distribution of PHE in PVA-NanoPHE appears more homogeneous and spectrum d in Fig. 4B presents the typical spectral signature observed across the scanned area. Images constructed from single bands provide an overview of the data but should be interpreted with caution. Raman microspectroscopy is sensitive to focal volume position on the surface of samples during recording that can lead to substantial changes in intensity between pixels possibly leading to false assumption. For instance intensity maps at 1440, 1635 and 1654 cm^{-1} in Fig. 4A exhibit dark blue spherical-like structures that could be incorrectly interpreted as absence of PVA and PHE, whereas they correspond to areas delivering less intense Raman spectra (data not shown). This could be simply explained by low samples density (air bubbles) or irregularity on the surface causing less efficient focusing thus an overall drop of intensity in those pixels.

In order to refine the data analysis and overcome such artefacts, NCLS coupled to preprocessing of Raman images was performed. It is a multivariate approach taking into account the whole spectrum rather than a single wavenumber. It is considered that Raman spectra in each pixel of the image result from the combined contribution of all constituents. Therefore, using a set of pure reference spectra, the algorithm estimates the contribution (or abundance) of each compound to the signal. It computes a simulated spectrum

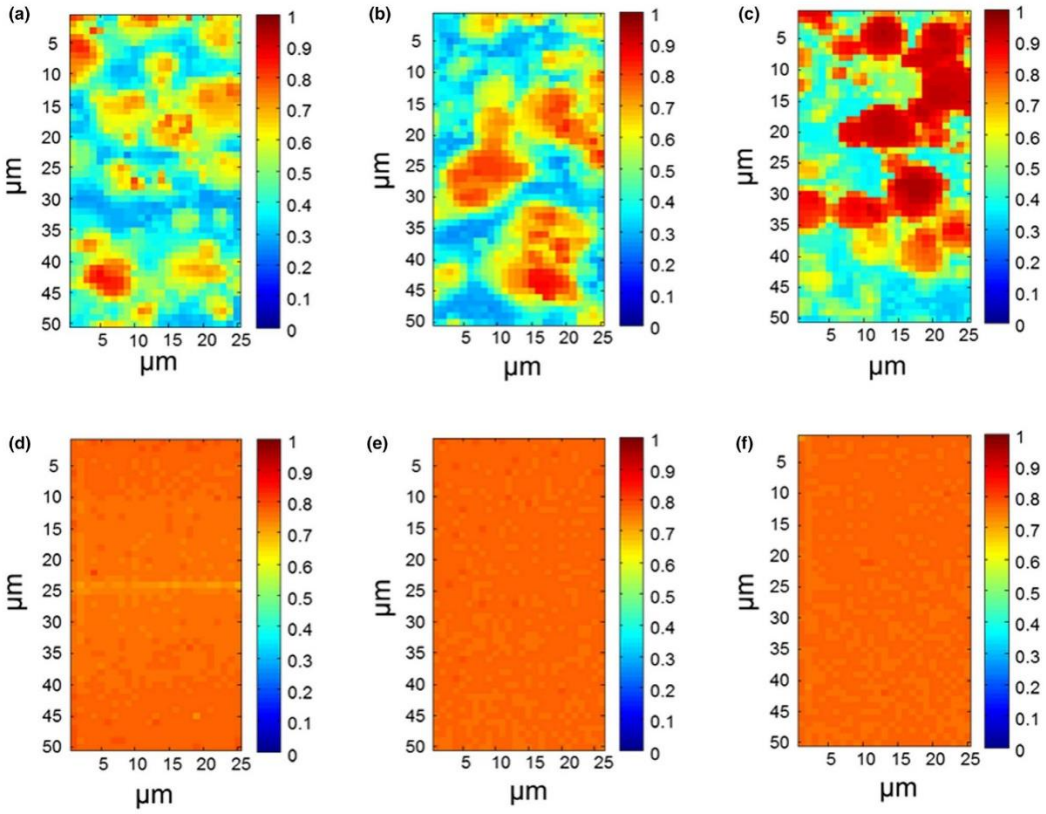


Figure 5 Reconstructed non-negatively constrained least squares (NCLS) maps showing the distribution of PHE in PVA films. PVA-PHE films (a), (b) and (c) compared to PVA – NanoPHE films (d), (e) and (f). Maps for each condition are provided from 3 different films. PHE is present at the same concentration in all the samples, and the colour scale bar indicates PHE relative spectral abundance.

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

from reference spectra provided adjusting their abundances until a result as close as possible to the experimental spectrum collected from the sample is reached. Presently, control films containing only PVA were used to generate reference spectra of polymers, whereas spectra collected from both forms of PHE (native and oxidized) were included in the model to estimate the overall PHE abundance. Ultimately, a semi-quantitative reconstructed false colour maps is obtained displaying the distribution of a given compound.

Figure 5 shows reconstructed chemical maps displaying total PHE contribution in three different PVA-PHE (Fig. 5a, b and c) and NanoPHE films (Fig. 5d, e and f). All reconstructed images are shown on the same scale between 0 and 1, with 1 equal to 100%, corresponding to pixels displaying a spectrum identical to one pure reference spectrum.

Free PHE integrated to PVA films via ethanol solution generated highly heterogeneous distributions with, on the same map, areas accounting for 10–20% of PHE beside concentrated droplets where values over 80% of PHE were reached. Once PHE was nanodispersed, the intensity maps appeared more constant across spectral images suggesting a higher degree of homogeneity in the PHE distribution. The algorithm is considering multiple bands positions and ratio during calculations of compounds abundance in each pixel consequently artefacts (blue spherical structures) observed previously in single wavenumbers intensity are not witnessed after NCLS. The approach is a rapid tool to appreciate PHE distribution while minimizing experimental and instrumental interferences naturally present in Raman data. The mean values of the intensities with respective standard deviation were calculated to be 0.533 ± 0.149 (Fig. 5a), 0.558 ± 0.177 (Fig. 5b) and 0.646 ± 0.203 (Fig. 5c) compared to 0.736 ± 0.01 (Fig. 5d), 0.734 ± 0.01 (Fig. 5e) and $0.724 + 0.005$ (Fig. 5f). The spectral signature collected differs greatly depending on the type of chemical bonds found in samples analysed. The ν C = C is particularly active vibrational mode in Raman spectra leading to a sharp and intense peak at 1635 cm^{-1}, whereas in the oxidized form, the features in this spectral range are significantly weaker.

Raman spectroscopy coupled to NCLS remains a semi-quantitative technique delivering spectral abundance of given compounds. Presently, the results reflect the contribution of PHE compared to PVA, therefore the reduced intensities of main features its oxidized form would also decrease its relative abundance. That explains the difference found in mean values calculated from NCLS. Moreover, Raman imaging was not proposed to determine absolute PHE concentrations but to study distribution into films. The means however highlight specific trends between both types of films analysed with triplicates performed on three different films delivering similar outcomes. In order to better interpret the information of reconstructed false colour maps the standard deviations is more relevant. Globally standard deviations from NanoPHE films are significantly lower compared to PVA-PHE films. For NanoPHE films, standard deviation of 0.149, 0.177 and 0.203, respectively, represent 27.9%, 31.7% and 31.4% of mean values, whereas for PVA-PHE films, 0.01, 0.01 and 0.005, respectively, represent 1.4%, 1.4% and 0.7%.

Commonly cosmetic or therapeutic films are characterized in terms of morphology, mechanical properties, qualitative chemical composition or total contents after destruction [6, 8]. Here is proposed an innovative non-destructive approach to evaluate the homogeneity of distribution of molecules of interest in thin films. Moreover, Raman spectroscopy combined to multivariate analysis enables to generate revealing graphical representations and estimated numerical values reflecting homogeneity and integrity of films analysed. This approach could be a very efficient tool to validate in a short time a cosmetic product formula by attesting of its homogeneity in ACI. It could be also used to study films quality on substrates more realistic than glass slides, like, for example, polymer-based skin models [34] or reconstructed skin models. Presently, this approach highlights two significant interests of NanoPHE. First, the distribution of PHE is more homogenous in the film when introduced as a nanodispersion than as an organic solution. Secondly, the analysis demonstrated that the co-dispersion of Vit E permitted to protect PHE from oxidation during the steps of preparation of the nanodispersion, film formulation and ultimately into dried films up to 3 months after their preparation.

Conclusion

In this preliminary study, nanodispersions of PUFA-esters combined with antioxidant vitamin E and stabilized with Pluronic® F127 were successfully prepared by a sustainable method. Their hydrodynamic diameter close to 100 nm is suitable for an introduction in a cosmetic or pharmaceutical product intended for skin care. The resulting aqueous suspensions showed a long-term colloidal stability (over 3 months) and were used to prepare homogeneous PHE-loaded hydrophilic films without the use of organic solvents. The analysis of nanocomposite films by Raman spectroscopy coupled to chemometrics demonstrated that NanoPHE enriched in Vit E protected the PHE from oxidation in air-dried films. The results presented here are promising for a perspective of applying the nanodispersion and film strategy not only to PHE but also to other long-chain PUFA-derived ACI.

Acknowledgements

We want to thank CSI for the technical assistance for the AFM measurements. We thank Région Centre-Val de Loire for the funding (MISTIC project ARD 2020 Cosmétosciences 2017-00118114 and Fonds Européen de Développement Régional).

References

1. Couturier, L. and Yvergnaux, F. Combined structural and biological activities for new polyunsaturated fatty derivatives obtained by biotechnological process. *Int. J. Cosmet. Sci.* **31**, 209–24 (2009).
2. Sun, Y., Zhou, D. and Shahidi, F. Antioxidant properties of tyrosol and hydroxytyrosol saturated fatty acid esters. *Food Chem.* **245**, 1262–8 (2018).
3. Boutin, R., Munnier, E., Renaudeau, N. *et al.* Spirulina platensis sustainable lipid extracts in alginate-based nanocarriers: An algal approach against biofilms. *Algal Res.* **37**, 160–168 (2019).
4. Richard, D., Kefi, K., Barbe, U., Bausero, P. and Visioli, F. Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacol. Res.* **57**, 451–5 (2008).
5. Liu, C., Hu, J., Sui, H., Zhao, Q., Zhang, X. and Wang, W. Enhanced skin permeation of glabridin using eutectic mixture-based nanoemulsion. *Drug Deliv. Transl. Res.* **7**, 325–32 (2017).
6. Tran, T.T.D. and Tran, P.H.L. Controlled Release Film Forming Systems in Drug Delivery : The Potential for Efficient. *Drug Deliv.* **11**, 1–16 (2019).

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

7. Kathe, K. and Kathpalia, H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **12**, 487–97 (2017).
8. Karki, S., Kim, H., Na, S.J., Shin, D., Jo, K. and Lee, J. Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian J. Pharm. Sci.* **11**, 559–74 (2016).
9. Al-Nemrawi, N.K. and Dave, R.H. Formulation and characterization of acetaminophen nanoparticles in orally disintegrating films. *Drug Deliv.* **23**, 540–9 (2016).
10. Zaid Alkilani, A., Hamed, R., Al-Marabeh, S., Kamal, A., Abu-Huwaij, R. and Hamad, I. Nanoemulsion-based film formulation for transdermal delivery of carvedilol. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **46**, 122–8 (2018).
11. Dammak, I., Sobral, P.J.A. Active gelatin films incorporated with eugenol nanoemulsions: effect of emulsifier type on films properties. *Int. J. Food Sci. Technol.* **54**, 1–11 (2019).
12. Nguyen, H.T., Munnier, E., Souce, M. *et al.* Novel alginate-based nanocarriers as a strategy to include high concentrations of hydrophobic compounds in hydrogels for topical application. *Nanotechnology* **26**, 255101 (2015).
13. Nguyen, H.T.P., Soucé, M., Perse, X. *et al.* Lipid-based submicron capsules as a strategy to include high concentrations of a hydrophobic lightening agent in a hydrogel. *Int. J. Cosmet. Sci.* **39**, 450–56 (2017).
14. Contri, R.V., Kulkamp-Guerreiro, I.C., da Silva, S.J., Frank, L.A., Pohlmann, A.R. and Guterres, S.S. Nanoencapsulation of rose-hip oil prevents oil oxidation and allows obtainment of gel and film topical formulations. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **17**, 863–71 (2016).
15. Brum, A.A.S., dos Santos, P.P., da Silva, M.M. *et al.* Lutein-loaded lipid-core nanocapsules: Physicochemical characterization and stability evaluation. *Colloids Surfac. A Physicochem. Eng. Asp.* **522**, 477–84 (2017).
16. Niamlang, P., Tongrain, T., Ekabutr, P., Chuysinuan, P. and Supaphol, P. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(vinyl alcohol) films containing tetracycline hydrochloride-loaded quaternized chitosan nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **38**, 36–44 (2017).
17. Lei, K., Wang, X., Li, X. and Wang, L. The innovative fabrication and applications of carvacrol nanoemulsions, carboxymethyl chitosan microgels and their composite films. *Colloids Surf. B Biointerf.* **175**, 688–96 (2019).
18. Tavano, L., Muzzalupo, R., Trombino, S., Cassano, R., Pingitore, A. and Picci, N. Effect of formulations variables on the in vitro percutaneous permeation of Sodium Diclofenac from new vesicular systems obtained from Pluronic triblock copolymers. *Colloids Surf. B Biointerf.* **79**, 227–34 (2010).
19. Kahraman, E., Özhan, G., Özsoy, Y. and Güngör, S. Polymeric micellar nanocarriers of benzoyl peroxide as potential follicular targeting approach for acne treatment. *Colloids Surf. B Biointerf.* **146**, 692–9 (2016).
20. Raval, A., Pillai, S.A., Bahadur, A. and Bahadur, P. Systematic characterization of Pluronic® micelles and their application for solubilization and in vitro release of some hydrophobic anticancer drugs. *J. Mol. Liq.* **230**, 473–81 (2017).
21. Tewes, F., Munnier, E., Antoon, B. *et al.* Comparative study of doxorubicin-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by single and double emulsion methods. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 488–492 (2007).
22. Tfayli, A., Gobinet, C., Vrabie, V., Huez, R., Manfait, M. and Piot, O. Digital dewaxing of Raman signals: discrimination between Nevi and Melanoma spectra obtained from paraffin-embedded skin biopsies. *Appl. Spectrosc.* **63**, 564–70 (2009).
23. Miloudi, L., Bonnier, F., Tfayli, A., Yvergnaux, F., Byrne, H.J., Chourpa, I. and Munnier, E. Confocal Raman spectroscopic imaging for in vitro monitoring of active ingredient penetration and distribution in reconstructed human epidermis model. *J. Biophotonics.* **11**, e201700221. (2017).
24. Roberts, M., Mohammed, Y., Pastore, M. *et al.* Topical and cutaneous delivery using nanosystems. *J. Control. Release* **247**, 86–105 (2017).
25. Mihranyan, A., Ferraz, N. and Strømme, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Prog. Mater. Sci.* **57**, 875–910 (2012).
26. Goyal, R., Macri, L.K., Kaplan, H.M. and Kohn, J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *J. Control. Release* **240**, 77–92 (2016).
27. Lupacchini, M., Mascitti, A., Giachi, G., Tonucci, L., d'Alessandro, N., Martinez, J. and Colacino, E. Sonochemistry in non-conventional, green solvents or solvent-free reactions. *Tetrahedron* **73**, 609–53 (2017).
28. Pyo, S.H., Park, J.H., Chang, T.S. and Hatti-Kaul, R. Dimethyl carbonate as a green chemical. *Current Opin. Green Sustain. Chem.* **5**, 61–6 (2017).
29. Kim, H., Kim, S. and Sah, H. Solvent hydrolysis rate determines critical quality attributes of PLGA microspheres prepared using non-volatile green solvent. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **29**, 35–56 (2018).
30. Zhang, F., Khan, M.A., Cheng, H. and Liang, L. Co-encapsulation of α-tocopherol and resveratrol within zein nanoparticles: Impact on antioxidant activity and stability. *J. Food Eng.* **247**, 9–18 (2019).
31. Cao, Y., Wang, L., He, M., Zhang, Y. and Wang, H. Nanodispersions of monoglycerides of punicic acid: a potential nutrient precursor with higher oxidative stability and cytotoxicity. *RSC Adv.* **4**, 43392–43398 (2014).
32. Chiper, M., Hervé Aubert, K., Augé, A., Fouquenet, J.F., Soucé, M. and Chourpa, I. Colloidal stability and thermo-responsive properties of iron oxide nanoparticles coated with polymers: Advantages of Pluronic® F68-PEG mixture. *Nanotechnology* **24**, 395605 (2013).
33. Yang, C.C., Chiu, S.J., Lee, K.T., Chien, W.C., Lin, C.T. and Huang, C.A. Study of poly(vinyl alcohol)/titanium oxide composite polymer membranes and their application on alkaline direct alcohol fuel cell. *J. Power Sources* **184**, 44–51 (2008).
34. Gore, E., Picard, C. and Savary, G. Biotribology Spreading behavior of cosmetic emulsions: Impact of the oil phase. *Biotribology* **16**, 17–24 (2018).

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Area of the main peak of NanoPHE water suspension in different conditions of storage: Dark grey: in absence of Vitamin E; Light grey: in presence of vitamin E.

Figure S2. Typical chromatogram obtained by gas chromatography after 30 min of evaporation. Peak A) Water, Peak B) Dimethyl carbonate, Peak C) Acetonitrile.

© 2020 Society of Cosmetic Scientists and the Société Française de Cosmétologie

Louise VAN GHELUWE

Développement et étude de systèmes d'encapsulation d'actifs cosmétiques

Résumé

L'encapsulation des actifs cosmétiques dans des nanosystèmes polymères pourrait permettre de répondre aux besoins des consommateurs qui recherchent des soins cosmétiques sûrs, efficaces et innovants. Cette thèse propose des réponses à deux défis rencontrés dans l'industrie cosmétique 1) concevoir une nouvelle génération de produits cosmétiques personnalisés permettant une libération stimulée d'actifs cosmétiques, et 2) développer des approches analytiques capables d'évaluer la pertinence et l'efficacité de ces nouvelles formes cosmétiques. La première partie de cette thèse concerne donc le développement d'un nanosystème polymère conçu pour répondre à une variation du potentiel redox des cellules de la peau, à l'origine de la libération de l'actif encapsulé. Pour cela, une synthèse organique en trois étapes a été mise au point afin de produire un mélange de polymères sensible à une élévation du potentiel réducteur du milieu. Ce mélange stimuli-sensible a ensuite été utilisé pour encapsuler un actif hydrophobe, le rétinol, par nanoprécipitation. Le caractère stimuli-sensible du nanosystème a été confirmé. Pour finir, l'impact des caractéristiques physico-chimiques du mélange polymères (taille des blocs polymères, ratio et concentrations) sur l'élaboration d'un nanosystème stimuli-sensible a été investigué. La seconde partie de ce travail est focalisé sur l'utilisation de techniques microspectroscopiques pour la caractérisation et l'objectivation de formules cosmétiques chargées en nanosystèmes polymères. Tout d'abord, des nanosystèmes polymères ont été incorporés dans un produit fini de type film et la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale Raman a été utilisée pour étudier la distribution de l'actif au sein du film. D'autre part, les performances de cette technique pour effectuer une analyse semi-quantitative de ces films chargés en actif encapsulé ont été explorées. Enfin, la technique d'imagerie par microspectroscopie confocale de fluorescence a été utilisée pour évaluer l'intérêt de l'utilisation de nanosystèmes polymères pour véhiculer des actifs ou colorants dans la fibre capillaire.

Mots clés : encapsulation, actifs cosmétiques, nanosystèmes polymères, libération stimulée, imagerie, microspectroscopie confocale Raman et de fluorescence.

Abstract

The encapsulation of cosmetic active ingredients in polymer nanosystems could meet the needs of consumers who are looking for safe, effective and innovative personal care. This PhD thesis proposes answers to two challenges encountered in the cosmetics industry 1) design a new generation of personalized cosmetic products allowing a triggered release of cosmetic active ingredients, and 2) develop analytical approaches capable of evaluating the relevance and the effectiveness of these new cosmetic forms. The first part of this PhD thesis concerns the development of a polymeric nanosystem designed to respond to a variation in the redox potential of skin cells, at the origin of the release of the encapsulated active ingredient. To achieve this, a three-step synthesis was developed and produced a blend of polymers sensitive to an increase in the reducing level of the medium. This stimuli-sensitive polymer blend was then used to encapsulate a hydrophobic active ingredient, retinol, by nanoprecipitation. The stimuli-sensitive nature of the nanosystem was confirmed. Finally, the impact of physico-chemical characteristics of the polymer blend (size of the polymer blocks, ratio and concentrations) on the development of an efficient stimuli-sensitive encapsulation system was investigated. The second part of this work is focused on the use of microspectroscopy techniques for the characterization and to demonstrate the efficacy of cosmetic products loaded with polymeric nanosystems. First, polymeric nanosystems were incorporated into an end film-like product and the confocal Raman microspectroscopy imaging technique was used to study the distribution of the active within the film. On the other hand, the performance of this technique to provide a semi-quantitative analysis of these films loaded with encapsulated active ingredient was explored. Finally, confocal fluorescence microspectroscopy imaging technique was used to evaluate the interest of using polymeric nanosystems to convey active agents or dyes in the hair fiber.

Key words: encapsulation, cosmetic active ingredients, polymeric nanosystems, triggered release, imaging, confocal fluorescence/Raman microspectroscopy