HAL open science

Évaluation et optimisation du potentiel thérapeutique d'un dendrimère anti-inflammatoire par sa formulation dans des vésicules catanioniques pour le traitement topique du psoriasis

Ranime Jebbawi

To cite this version:

Ranime Jebbawi. Évaluation et optimisation du potentiel thérapeutique d'un dendrimère anti-inflammatoire par sa formulation dans des vésicules catanioniques pour le traitement topique du psoriasis. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2021. Français. NNT : 2021TOU30054 . tel-03141650

HAL Id: tel-03141650

https://hal.science/tel-03141650v1

Submitted on 21 Sep 2023

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

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

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Ranime JEBBAWI

Le 12 février 2021

Évaluation et optimisation du potentiel thérapeutique d'un dendrimère anti-inflammatoire par sa formulation dans des vésicules catanioniques pour le traitement topique du psoriasis

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **PHYSIOPATHOLOGIE**

Unité de recherche :
INFINITY - Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires
IMRCP - Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Photochimiques

Thèse dirigée par
Rémy POUPOT et Muriel BLANZAT

Jury
Mme Sylviane MULLER, Rapporteure
Mme Sylviane LESIEUR, Rapporteure
Mme Marie-Christine CADIERGUES, Examinatrice
M. Hervé BACHELEZ, Examinateur
M. Rémy POUPOT, Directeur de thèse
Mme Muriel BLANZAT, Co-directrice de thèse

Remerciements

De nombreuses personnes ont pu par leurs connaissances, leurs conseils, leurs suggestions et même leurs sourires de créer en nous la rigueur et le succès.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du Jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse : le Professeur *Sylviane Muller* et le Docteur *Sylviane Lesieur* en tant que rapporteures, le Professeur *Marie-Christine Cadiergues* et le Professeur *Hervé Bachelez* en tant qu'examinateurs. Merci pour votre lecture attentive de ma thèse ainsi que pour vos remarques. Malheureusement, je n'ai pas pu vous rencontrer tous le jour de la soutenance à cause de la pandémie COVID-19 mais c'était toujours un honneur de discuter avec vous via Teams.

Je voudrais exprimer ma gratitude à mes directeurs de thèse, le Professeur *Rémy Poupot* et le Docteur *Muriel Blanzat*, pour la confiance qu'ils m'ont accordée, le soutien tout au long de ces trois ans et demi et les commentaires constructifs qui m'ont permis d'avancer. Grâce à votre rigueur scientifique, vous m'avez transmis l'enthousiasme pour la recherche. Ce travail n'aurait pas pu être ce qu'il est sans votre supervision, votre compétence, vos remarques et vos multiples conseils.

Un grand merci pour tous les membres de l'ANR TANDANSS dans laquelle s'inscrit la continuité de cette thèse. Merci à Docteur *Séverine Fruchon* pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils, son aide et son encouragement durant la thèse. Merci aux Docteur *Cédric-Olivier Turrin* et *Michel Simon* pour leurs encouragements, leurs remarques, et les discussions enrichissantes dans nos réunions mensuelles. Mes remerciements viennent également aux post-doctorants avec qui j'ai eu le plaisir de travailler dans ce projet : *Abdel, Hélène et Emily*. Merci pour votre amitié et aide autant sur le plan scientifique que sur le plan privé. Nous avons formé ensemble une très bonne équipe de travail dans ce très beau projet.

Un grand merci à tous les membres anciens et récents de l'équipe 5 d'Infinity (*Jean-Pierre Salles, Jérôme, Jean-Luc, Benjamin, Yannick, Nicolas, Michel, Sanaa, Fabienne, Isabelle, Stéphanie, Hugues, Zoubida* ...) et à tous les membres de l'équipe SMODD (*Stéphanie, Emile, Christophe, Jean-Christophe, Sophie, Chirine, Valérie, Alexandra, Magali* …) de m'avoir permis de profiter de bonnes conditions de travail. Je tiens à remercier également Charles-Louis, Lucie, les personnels de plateformes d'Histologie, *Talal*, *Florence*, *Annie* et *Samantha*, d'imagerie, *Sophie* et *Danièle*, de cytométrie, *Anne-Laure* et *Fatima*,

et de zootechnie de Purpan, *Rachel et Elisabeth*, pour leur aide à la réalisation des manips et à la résolution de tous problèmes techniques.

Merci aux Professeurs *Roland Liblaud, Nicolas Fazilleau* et Docteur *Christophe Mingotaud* de m'avoir accueilli au sein des Laboratoires que vous dirigez, Centre de Physiopathologie de Toulouse - Purpan (récemment nommé Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires) et laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivités Chimiques et Photochimiques.

Merci à tous les chercheurs, ingénieurs et thésards croisés durant ma thèse, *Souraya, Katy, Candide, Saber, Cécile, Yannick, Nissrine, Chloé, Thibault, Juliette, Claire, Laura, Hai Yen, Barbara, Aurélie, Nadiaa, Aline, Maxime, Baptiste, Vivien* et tous ceux que je pourrai oublier. À *Souraya, Katy et Candide*, merci pour les beaux moments inoubliables et les longues journées que nous avons passés ensemble au labo. Londres, Glasgow et Lyon seront mes prochaines destinations ;) À *Claire*, merci pour ton amitié, ton aide précieuse en physico-chimie et pour les longues heures passées en salle 156 pour préparer les peaux d'oreille de cochon.

À mes amis Libanais, *Souraya,* les deux *Fatima B, Ranine, Nissrine, Sara, Zahra, Magali, Ali, Yolla, Nadine* et … (la liste ne finit jamais), je vous remercie énormément d'avoir rendu mon séjour agréable dans la ville rose. *Souraya,* l'amie fidèle pour toujours, je suis très reconnaissante de t'avoir eu à mes côtés durant la thèse. À mes amis d'enfance avec qui je partage des moments de ma vie au fil du temps, *Rana, Hiba A, Fatima J, Israa, Hiba E et Nour*, merci pour votre énorme soutien malgré la distance.

Enfin, je tiens à remercier ma famille, en particulier mes parents, *Mohamad et Fattouma*, qui m'ont toujours aidé, soutenu et motivé. À mes sœurs, *Diana et Ghina*, mes frères, *Ali, Fadi* et *Rami*, ma belle-sœur, *Jana*, et mes beaux-frères, *Assem* et *Hassan*, sur qui je peux toujours compter. À mes nièces, *Lynn*, *Diana* et *Daniella*, et mes neveux, *Ali*, les deux *Mohamad*, *Hadi* et *Adam*, avec tout mon amour.

Résumé

Le psoriasis est une dermatose inflammatoire chronique. Les lésions psoriasiques sont caractérisées par une prolifération anormale des kératinocytes, une dilatation des vaisseaux sanguins dermiques et une infiltration de cellules inflammatoires dans la peau. Malgré l'efficacité des traitements anti-psoriasiques, leurs effets secondaires limitent leur utilisation à long terme. Plusieurs études réalisées dans nos équipes ont montré qu'un dendrimère de type Poly(PhosphorHydrazone) à terminaisons Azabisphosphonate, nommé ABP, présente des propriétés anti-inflammatoires in *vitro* et dans des modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques. L'objectif de notre étude est d'évaluer et d'optimiser le potentiel thérapeutique de l'ABP comme une nouvelle approche pour le traitement du psoriasis. Nous avons montré que l'administration cutanée de l'ABP dans un tampon physiologique, sans formulation particulière, réduit significativement l'inflammation induite par l'imiquimod chez les souris. Toutefois, l'efficacité thérapeutique du dendrimère ABP pour le traitement topique du psoriasis doit être améliorée. En effet, la structure complexe et les propriétés de barrière du *stratum corneum*, mais aussi les propriétés physico-chimiques du dendrimère ABP limitent sa pénétration cutanée et donc son efficacité thérapeutique par voie cutanée. Afin de maximiser ses effets thérapeutiques, nous avons donc formulé le dendrimère dans un système de vectorisation innovant, des vésicules catanioniques tricaténaires dérivées de sucre. Ces vésicules catanioniques, développées dans notre équipe, sont formées d'une bicouche de deux tensioactifs de charges opposées. Outre leur biocompatibilité, ces vésicules catanioniques ont déjà démontré leur capacité à promouvoir la pénétration cutanée d'actifs quand leur bicouche est à l'état fluide. Après l'optimisation de la formulation du dendrimère dans les vésicules catanioniques, nous avons obtenu des vésicules stables et capables d'encapsuler environ 80% du dendrimère. Nous avons également montré que l'insertion du dendrimère dans la membrane des vésicules la rend fluide à la température de la peau. Nos études *ex vivo,* sur différents modèles de peaux, ont montré que la formulation du dendrimère dans les vésicules catanioniques permet une pénétration cutanée profonde du dendrimère. Enfin, des études menées sur le modèle murin de psoriasis induit par l'imiquimod ont démontré l'apport de la formulation TriCat/ABP-A dans l'amélioration des lésions psoriasiques induites par l'IMQ. L'ensemble de nos résultats mettent en avant l'efficacité de la formulation dans l'administration du dendrimère dans les couches cutanées profondes pour le traitement du psoriasis.

Mots clés : Psoriasis, inflammation, formulation, dendrimère ABP, application cutanée, vésicules catanioniques, système d'administration cutanée, pénétration cutanée, modèle de psoriasis induit par l'imiquimod.

Abstract

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease. It is characterized by an abnormal proliferation of keratinocytes, dilation of dermal blood vessels and an infiltration of inflammatory cells into the skin. Although effective, the side effects of anti-psoriatic treatments limit their long-term use. A Poly(PhosphorHydrazone) dendrimer capped with AzaBisPhosphonate groups, called ABP, has previously been shown to have anti-inflammatory properties both *in vitro* and in animal models of chronic inflammatory diseases. The aim of our study is to assess and optimize the therapeutic potential of ABP dendrimer as a new approach for psoriasis therapy. We have shown that ABP dendrimer applied topically in physiological buffer, without specific formulation, significantly reduced the inflammation induced by imiquimod in mice. However, the therapeutic efficacy of the ABP dendrimer for the topical treatment of psoriasis should be improved. The barrier properties of the *stratum corneum* and physicochemical properties of the ABP dendrimer both contribute to limit its skin penetration and therefore its therapeutic efficacy by topical route. In order to maximize its therapeutic effects, we have formulated the dendrimer in an innovative delivery system, sugar-derived tricatenar catanionic vesicles. These catanionic vesicles, developed in our team, are formed from a bilayer of two opposite charges surfactants. In addition to their biocompatibility, these catanionic vesicles have previously demonstrated their ability to promote skin penetration of active ingredients when their bilayer is in fluid state. After optimization of dendrimer formulation in catanionic vesicles, we obtained stable vesicles capable of encapsulating approximately 80% of the dendrimer. We have also shown that the insertion of the dendrimer into the vesicular bilayer makes it fluid at skin temperature. Our studies *ex vivo* have successfully shown that the formulation of dendrimer in catanionic vesicles allows deep skin penetration of the dendrimer into the viable epidermis and dermis. Finally, we have demonstrated that TriCat / ABP-A formulation improves the efficacy of dendrimer *in* murine model of psoriasis induced by imiquimod. Altogether, our results highlight the potential of this innovative formulation to deliver dendrimer to the deeper skin layers for the treatment of psoriasis.

Keywords: psoriasis, inflammation, formulation, ABP dendrimer, topical application, catanionic vesicles, skin drug delivery system, skin penetration, imiquimod-induced psoriasis model.

Table de matière

Liste des figures **7**

Liste des tableaux **12**

Liste des abréviations **13**

Introduction générale **17**

Chapitre 1 : Introduction **22**

1. Définition et épidémiologie **23**

1.1. Classification clinique 23

1.2. Comorbidités associées au psoriasis 25

2. La peau, l'organe atteint **25**

3. Pathogenèse du psoriasis **30**

3.1. Histopathologie du psoriasis 30

3.1.1. Prolifération anormale des kératinocytes 30

3.1.2. Changements vasculaires 31

3.2. Inflammation cutanée et psoriasis 32

3.2.1. Rôle des cellules dendritiques 32

3.2.2. Rôle des lymphocytes T 34

3.2.3. Rôle des monocytes/macrophages 36

3.3. Le psoriasis, une maladie auto-immune ? 38

3.4. Facteurs génétiques impliqués dans le psoriasis 38

4. Traitements du psoriasis **40**

4.1. Thérapie topique (voie cutanée) 41

4.2. Photothérapie 45

4.3. Thérapie systémique 46

4.3.1. Thérapie conventionnelle 46

4.3.2. Thérapie biologique 47

5. Dendrimères **49**

5.1. Dendrimères : Systèmes d'administration cutanée de médicaments anti-inflammatoires 51

5.1.1. Les dendrimères de type PAMAM 52

5.1.2. Les dendrimères de type PPI 54

5.1.3. Les oléodendrimères 56

5.2. Dendrimères présentant des propriétés anti-inflammatoires.....56
5.2.1. Les dendrimères PAMAM et autres types de dendrimères 56
5.2.2. Le dendrimère phosphoré à surface AzaBisPhosphonate ABP 59
6. Modèles murins de psoriasis 71
7. Stratégies de promotion de la pénétration cutanée 79
7.1. Voies de pénétration cutanée 80
7.2. Caractéristiques physico-chimiques de la substance active 83
7.3. Stratégie d'administration cutanée de principes actifs 84
7.3.1. Les stratégies de promotion active 84
7.3.2. Les promoteurs chimiques de pénétration 86
7.3.3. Vectorisation des principes actifs pour une application cutanée 88
Chapitre 2 : Résultats..... 104
Partie I: Résultats publiés 104
Article: An Anti-Inflammatory Poly(PhosphorHydrazone) Dendrimer Capped with AzaBisPhosphonate Groups to Treat Psoriasis..... 105
Résumé 105
Partie II : Formulation du dendrimère ABP pour améliorer sa pénétration cutanée 108
Mise au point bibliographique sur les vésicules de TriCat : Système d'administration cutanée 108
Résultats : 111
1. Mise au point et optimisation de la stratégie de formulation d'ABP.....111
2. Efficacité d'encapsulation 116
3. Caractérisation physico-chimiques de la formulation TriCat/ABP-A.....119
3.1. Morphologie de la formulation TriCat/ABP-A 119
3.2. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A.....121
4. Caractérisation de la formulation TriCat/ABP-A-NIR.....124
4.1. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A-NIR.....124
4.2. Fluorescence de la formulation TriCat/ABP-A-NIR.....126
5. Fluidité de la membrane 127
Discussion et conclusion 130
Partie III : Étude de la pénétration cutanée de la formulation *ex vivo* 134
Choix du modèle d'étude de pénétration cutanée 134
Résultats : 136

1. Quantification de la rétention d'ABP-NIR dans la peau porcine 136
2. Évaluation de la profondeur de pénétration cutanée par microscopie confocale 138
2.1. Évaluation de la profondeur de pénétration sur peau porcine 138
2.2. Évaluation de la profondeur de pénétration sur peau humaine 140
2.3. Évaluation de la profondeur de pénétration sur peau murine psoriasique induite par l'IMQ.....141
Discussion et conclusion 146
Partie IV : Évaluation des propriétés anti-inflammatoires de la formulation *in vitro* 149
Résultats 150
1. Évaluation des propriétés anti-inflammatoires d'ABP-NIR 150
2. Internalisation du dendrimère par les monocytes humains 151
3. Activation anti-inflammatoire des monocytes humains 153
Discussion et conclusion 157
Partie V : Preuve d'efficacité thérapeutique de la formulation dans un modèle murin de psoriasis 158
Résultats 158
1. Évaluation de l'efficacité de la formulation *in vivo* 158
1.1. Effet de la formulation TriCat/ABP-A sur le phénotype psoriasique induit par l'IMQ 158
1.2. Effet de la formulation TriCat/ABP-A sur les altérations histologiques du psoriasis induites par l'IMQ…… 162
Discussion et conclusion 166
Conclusion générale 168
Chapitre 3 : Matériels et Méthodes..... 174
1. Formulation du dendrimère pour améliorer sa pénétration cutanée 175
1.1. Structures chimiques des dendrimères et de leurs analogues fluorescents 175
1.2. Préparation des solutions de dendrimères.....176
1.3. Formulations des dendrimères dans les vésicules catanioniques de TriCat 177
1.3.1. Mise au point de la stratégie de formulation d'ABP 177
1.3.2. Caractérisation de la formulation TriCat/ABP-A.....178
1.4. Caractérisations physico-chimiques de la formulation TriCat/ABP-A-NIR 181
1.4.1. Spectre d'absorbance et d'émission d'ABP-NIR 181
1.4.2. Formulation des vésicules de TriCat/ABP-A-NIR 183
1.4.3. Fluorescence de l'ABP-A-NIR libre et formulé dans les vésicules de TriCat 183

1.4.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation 184

2. Étude de la pénétration cutanée de la formulation *ex vivo* 184

2.1. Quantification de la rétention cutanée *ex vivo* 184

2.1.1. Étalonnage spectrofluorimétrique de l'ABP-NIR 184

2.1.2. Quantification de la rétention cutanée de l'ABP-NIR sur peau d'oreille de cochons 185

2.1.3. Analyses statistiques 187

2.2. Observation de la profondeur de pénétration cutanée par microscopie confocale sur différents modèles de peaux 187

3. Évaluation des propriétés anti-inflammatoires de la formulation *in vitro* 189

3.1. Purification des monocytes humains 189

3.2. Culture et analyse des monocytes humains 190

3.3. Internalisation du dendrimère par les monocytes humains 191

4. Preuve d'efficacité thérapeutique de la formulation dans un modèle murin de psoriasis 191

4.1. Préparation des solutions 191

4.2. Induction de psoriasis par l'imiquimod 192

4.3. Évaluation clinique de l'inflammation cutanée 192

4.4. Évaluation histologique de l'inflammation cutanée 192

4.5. Analyses statistiques 193

Références Bibliographiques 194

Liste des figures

Figure 1. Manifestations cliniques du psoriasis en plaque. 24
Figure 2. Schéma représentatif de différentes parties de la peau. 26
Figure 3. Représentation schématique des étapes de différenciation de kératinocytes de la couche basale à la couche cornée. 28
Figure 4. Les manifestations histologiques du psoriasis. 31
Figure 5. Modèle d'initiation de la maladie psoriasique 34
Figure 6. Interaction entre les cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité adaptative, et les kératinocytes, qui contribue au développement d'une inflammation chronique au niveau de la peau psoriasique 37
Figure 7. Étiologie du psoriasis. 40
Figure 8. Représentation graphique des actions génomique et non génomique des dermocorticoïdes (CC). 44
Figure 9. Représentation schématique de la structure d'un dendrimère de G3. 50
Figure 10. Principales stratégies de vectorisation de molécules médicamenteuses par les dendrimères. 51
Figure 11. Structure chimique du dendrimère G2-PAMAM portant des fonctions amine à la surface. 52
Figure 12. Schéma montrant le système DIT-PPI. 55
Figure 13. Structure des oléodendrimères. 56
Figure 14. Représentation schématique des chaines du dendrimère conjuguées aux nanoparticules d'argent (Ag-DNC) 58
Figure 15. Structure du dendrimère PEO polysulfaté de 2ème génération 59
Figure 16. Structure du dendrimère ABP. 60
Figure 17. Effets anti-inflammatoires du dendrimère ABP sur différents types de cellules immunitaires. 62
Figure 18. Inhibition de l'arthrite par le dendrimère ABP chez les souris IL-1RA KO. 64
Figure 19. Le dendrimère ABP inhibe la progression de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez les souris.. 65

Figure 20. Le dendrimère ABP réduit significativement l'inflammation oculaire induite chez le rat quand administré par voie intra-vitréenne en protocole préventif.....66
Figure 21. Structure du dendrimère ABP-NIR.....68
Figure 22. Conformation tridimensionnelle du dendrimère est dépendante de sa structure interne (cœur + branches) 69
Figure 23. La morphologie et la composition de la peau murine (a) et de la peau humaine (b). 72
Figure 24. Présentation phénotypique des modèles de souris transgéniques de psoriasis.. .75
Figure 25. Structure de l'IMQ. 75
Figure 26. Modèle de psoriasis induit par l'IMQ.. 76
Figure 27. Représentation histologique et phénotypique de la greffe d'une peau non lésionnelle d'un patient psoriasique chez des souris AGR129. 78
Figure 28. Augmentation du nombre de publications utilisant le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ depuis sa description initiale en 2009 jusqu'à 2016 79
Figure 29. Diagramme représentatif des trois voies de pénétration possibles à travers le stratum corneum.. 81
Figure 30. Mode d'action des CPE sur la matrice lipidique intercellulaire de la couche cornée.. 87
Figure 31. Schéma représentatif de différents types d'émulsions.....89
Figure 32. Représentation schématique montrant la différence entre la structure cristalline ordonnée de SLN et la matrice lipidique moins ordonnée de NLC. 94
Figure 33. Représentation de la structure d'une nanocapsule et d'un polymersome. 95
Figure 34. Schéma représentatif de la structure d'un liposome, d'un transfersome et d'un éthosome 98
Figure 35. Représentation schématique d'une vésicule catanionique formée par l'assemblage spontané de tensioactifs catanioniques bicaténaires. 101
Figure 36. Structure chimique du TriCat.....103
Figure 37. Synthèse du tensioactif catanionique tricaténaire (TriCat).....109
Figure 38. (A) Image de microscopie électronique à transmission et (B) distribution de taille obtenue par DLS pour les vésicules de TriCat dans l'eau. 110
Figure 39. Quantité de Texas Red (TxR) retenue dans la peau (rétention cutanée) et accumulée dans le récepteur (passage transcutané) après 22 heures de l'application de

Texas Red libre et encapsulé (TriCat/ Texas Red) à la surface de la peau à une température cutanée inférieure (à gauche) ou supérieure (à droite) à la $T_{transition}$ de la bicouche de TriCat 111
Figure 40. Diamètres hydrodynamiques moyens (nm) et intensité en DLS (kcps) des vésicules encapsulant le dendrimère. 115
Figure 41. Spectres d'émission de fluorescence de l'ABP-A-NIR encapsulés (courbe pointillé) et de l'ABP-A-NIR totales (courbe continu) après solubilisation dans le méthanol (λex: 632 nm). 118
Figure 42. (A) Image de MEB, (B) distribution de taille exprimée en intensité et (C) distribution de taille exprimée en nombre des vésicules de TriCat/ABP-A préparées dans l'eau.....120
Figure 43. Stabilité dans le temps de la formulation TriCat/ABP-A. 121
Figure 44. Potentiel Zêta de la formulation TriCat/ABP-A. 122
Figure 45. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A à -20°C. 123
Figure 46. Stabilité de la formulation au pH cutané et à la dilution dans l'eau. 124
Figure 47. Stabilité dans le temps de la formulation TriCat/ABP-A-NIR. 125
Figure 48. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A-NIR à -20°C. 126
Figure 49. Spectres d'intensité de fluorescence (λex: 632 nm) de l'ABP-A-NIR libre en solution aqueuse (courbe pointillé) et de l'ABP-A-NIR formulé dans les vésicules de TriCat (courbe continu). 127
Figure 50. Les thermogrammes obtenus par DSC de TriCat seul (A), de TriCat/ABP-A (méthode D) (rouge), de TriCat/ABP (méthode B) (vert) et de TriCat/ABP (méthode C) (bleu) à la concentration de 0,5 mM en dendrimère après 4 cycles thermiques.....128
Figure 51. Température de début de transition de phase et intensité du flux de chaleur normalisé à la quantité de matière (en valeur absolue) au cours de la transition des échantillons de TriCat/ABP-A en fonction de la [ABP-A].. 130
Figure 52. Aspect histologique comparable entre la peau d'oreille de cochon (A) et la peau humaine (B).....135
Figure 53. Schéma représentatif de la Cellule de Franz. 136
Figure 54. Pourcentage de dendrimère retenue dans la peau d'oreille de cochon (épiderme + derme) après 24 heures de l'application des solutions suivantes sur la surface de la peau : ABP-NIR (n=4), ABP-A-NIR (n=9) et formulation TriCat/ABP-A-NIR (n=15). 137

Figure 55. Observation de la profondeur de pénétration cutanée ex vivo sur peau porcine. 139
Figure 56. Observation de la profondeur de pénétration cutanée ex vivo sur peau humaine. 141
Figure 57. Observations macroscopiques et microscopiques de la peau du dos des souris Balb/c traitées quotidiennement par le xanthane, la vaseline ou l'imiquimod.. 143
Figure 58. Observation de la profondeur de pénétration cutanée ex vivo sur peau psoriasique murine induite par l'IMQ.....145
Figure 59. Comparaison de l'activité anti-inflammatoire d'ABP et d'ABP-NIR sur monocytes humains à 0,2 ,2 ou 20 µM par cytométrie en flux.. 151
Figure 60. Observation de l'internalisation du dendrimère par les monocytes humains par microscopie confocale. 152
Figure 61. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des monocytes humains in vitro par cytométrie en flux.....154
Figure 62. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des monocytes humains in vitro par cytométrie en flux.....156
Figure 63. Protocole d'application topique (voie cutanée) des dendrimères libre et formulé dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ chez les souris. 159
Figure 64. Les effets du dendrimère sous ses formes libre (ABP) et formulée dans les vésicules de TriCat (TriCat/ABP-A) sur le phénotype psoriasique induit par l'IMQ. 161
Figure 65. Observation macroscopique de la peau du dos des souris traitées quotidiennement avec le xanthane (groupe contrôle), IMQ + eau, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et IMQ + TriCat/ABP-A 13 mg/kg aux jours 4, 5, 6 et 7.....162
Figure 66. Observation des coupes de peau du dos des souris non traitées (blank) et traitées quotidiennement par le xanthane, IMQ, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et TriCat/ABP-A 13 mg/kg 164
Figure 67. Évaluation du score histologique de la peau du dos des souris après 7 jours de traitement quotidien par IMQ, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et TriCat/ABP-A 13 mg/kg. 165
Figure 68. Structures chimiques du dendrimère sous ses formes neutre (ABP : X=Na) et acide (ABP-A) 175

Figure 69. Structures chimiques de l'analogue fluorescent d'ABP (ABP-NIR) et de l'analogue fluorescent d'ABP-A (ABP-A-NIR).....176
Figure 70. Structure chimique du L-Hyd12 (A) et l'acide phosphinique (B). 177
Figure 71. Spectre d'absorbance (en bleu) et d'émission de fluorescence (en rouge) d'ABP-NIR dans l'eau. 182
Figure 72. Spectre d'émission de fluorescence d'ABP-A-NIR dans l'eau (pH=2,8) (en noir, λem=740 nm) et dans de PBS (pH=6,8) (en rouge, λem=800 nm) à la même concentration de 0,1 mM (λex=632 nm). 183
Figure 73. Droite d'étalonnage reliant l'intensité de fluorescence à la concentration en ABP-NIR dans du PBS 185
Figure 74. Étude de la pénétration cutanée sur des explants de peaux d'oreilles de cochons placés en cellule de Franz. 186
Figure 75. Protocole d'induction du psoriasis par l'IMQ chez les souris. 188
Figure 76. Monocytes humains analysés par cytométrie en flux à J0. 190

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples d'agents topiques utilisés dans le traitement du psoriasis par voie cutanée. 45

Tableau 2. Les agents biologiques utilisés pour le traitement du psoriasis. 48

Tableau 3. Récapitulatif des différentes méthodes de formulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat. 114

Tableau 4. Efficacité d'encapsulation (EE) de l'ABP dans les vésicules de TriCat préparées selon les méthodes B et C. 117

Tableau 5. Paramètres calorimétriques déterminés par DSC pour le TriCat seul (A) et pour le TriCat avec le dendrimère selon les méthodes de formulation B, C et D. 129

Liste des abréviations

8-MOP	8-méthoxypsoralène
ABC	AzaBisCarboxylate
ABP	AzaBisPhosphonate
ABP-A	AzaBisPhosphonique
ABP-NIR	ABP Near Infra-Red
Ag-DNC	Nanocomposite de dendrimère d'argent
AINS	Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien
AMP	Peptides et des protéines antimicrobiens
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AR	Amphiréguline
BDP	Dipropionate de Bétaméthasone
BSA	Body Surface Area
CMH	Complexes Majeur d'Histocompatibilité
CPE	Promoteurs chimiques de pénétration
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CRP	Protéine Réactive C
CryoMEB	Microscopie Electronique à Balayage avec Cryofracture
CSF-1	Colony-stimulating factor 1
CSF-1R	Colony-stimulating factor 1 receptor
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
CTAT	Cetyl trimethylammonium tosylate
Dendrimère AMP	Dendrimère AzaMonoPhosphonate
DETC	Cellules T dendritiques
DIT	Dithranol
DLQI	Dermatology Life Quality Index
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière
DMF	Fumarate de diméthyle
DMSO	Diméthylsulfoxide

DMT	Dose Maximale Tolérée
DSC	Calorimétrie Différentielle à Balayage
EA	Edge Activator
EE	Efficacité d'Encapsulation
EGF	Facteur de croissance épidermique
FAE	Esters de l'acide fumarique
FluoCat	Tensioactif catanionique fluorescent
FP	Protéine de fusion
G	Génération
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GR	Récepteurs glucocorticoïdes
GUV	Vésicules unilamellaires géantes
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPV	Papillomavirus humain
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interférons
IL	Interleukine
IL-17R	IL-17 receptor
IL-1RA	Interleukin-1 Receptor Antagonist
IL-2R	IL-2 receptor
IMQ	Imiquimod
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IT	Index Thérapeutique
K14-ARGE	Keratin 14- amphiregulin gene
K17	Kératine 17
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KO	Knock-Out
LCE3B	Late Cornified Envelope 3B
LCE3C	Late Cornified Envelope 3C
LFA-3	Lymphocyte function-associated antigen-3
L-Hyd12	1-N-dodécylamino-1-déoxylactitol

Log P	Coefficient de Partage Octanol/Eau
LPS	LipoPolySaccharide
LUV	Grandes vésicules unilamellaires
mAb	Anticorps monoclonaux bloquants
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
mDC	Cellules dendritiques myéloïdes
MLV	Vésicules multilamellaires
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MOG	Glycoprotéine Oligodendrocytaire de la Myéline
MTX	Méthotrexate
NF-Kb	Nuclear Factor-Kb
NLC	Nanoparticules lipidiques nanostructurées
NMF	Natural Moisturizing Factor
PAMAM	Poly(AMidoAMine)
PASI	Psoriasis Area and Severity Index
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
pDC	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PDE4	Phosphodiesterase-4
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDI	Indice de polydispersité
PEO	Poly(Ethylene Oxide)
PETIM	Poly(propylETherImine)
PKA	Protéine kinase A
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
PPH	Poly(PhosphorHydrazone)
PPI	Poly(PropyleneImine)
PR	Polyarthrite Rhumatoïde
PSORS	PSORiasis Susceptibility
PUVA	Psoralen UVA
RHE	Reconstituted Human Epidermis

RXR	Retinoic X Receptor
SDBS	Sodium DodecylBenzene Sulfonate
SDS	Sodium Dodecyl Sulfonate
siRNA	Small interfering RNA
SLN	Nanoparticules lipidiques solides
SNC	Système nerveux central
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
SUV	Petites vésicules unilamellaires
TCR	T-cell receptor
TGF-β	Transforming Growth Factor β
Th	Lymphocytes T helper
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	TNF Receptor
TriCat	Bis(α-hydroxydodécyl) phosphinate de 1-N-dodécylammonium-1-déoxylactitol
UV	Rayons Ultraviolets
VCAM-1	Vascular-Cell Adhesion Molecule 1
VDR	Récepteurs de la vitamine D
VDRE	Vitamin D Response Element
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vitamine D	1,25-dihydroxyvitamine D
Λem	Longueur d'onde d'émission
Λex	Longueur d'onde d'excitation

Introduction générale

Le **psoriasis** est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui affecte 2 à 3% de la population mondiale. Les lésions psoriasiques sont caractérisées par (a) une hyperprolifération et une différenciation anormale des kératinocytes, (b) une dilatation des vaisseaux sanguins dermiques, et (c) une infiltration de cellules inflammatoires dans la peau (lymphocytes T, cellules dendritiques, monocytes/macrophages et neutrophiles). À ce jour, on ne sait pas guérir le psoriasis. Les traitements utilisés consistent à atténuer les symptômes et apporter ainsi une meilleure qualité de vie aux patients. Parmi ces traitements, on retrouve des traitements locaux pour les formes légères de psoriasis (notamment les dermocorticoïdes), la photothérapie, et les traitements systémiques pour les formes les plus sévères (la ciclosporine, le méthotrexate, et les biothérapies : notamment anti-**IL17,** anti-**IL-23,** anti-**IL-12/-23** et anti-**TNF**). Malgré leur efficacité, les effets indésirables (atrophie cutanée, néphrotoxicité, hépatoxicité ou risque élevé d'infection et de lymphomes) et les coûts très élevés de certains d'entre eux (les biothérapies) limitent leur utilisation quotidienne à long terme chez les patients, en raison du caractère chronique du psoriasis. Le développement de nouvelles molécules est donc essentiel pour la prise en charge du psoriasis à long terme.

Notre laboratoire, en collaboration avec le Laboratoire de Chimie de Coordination, a montré qu'un dendrimère, de type Poly(PhosphorHydrazone) (PPH), à surface azabisphosphonate, appelé **ABP**, est un candidat-médicament pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques, la Polyarthrite Rhumatoïde et la Sclérose en Plaques, ou aigues, l'uvéite. Les propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices du dendrimère ABP sont dirigées vers différentes cellules immunitaires, notamment les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T, des cellules qui jouent un rôle important dans la physiopathologie de psoriasis. Le dendrimère ABP, en ciblant ces cellules inflammatoires *in vitro,* diminue significativement la production de cytokines pro-inflammatoires, notamment **TNF**, **IL-12** et **IL-23,** qui sont essentielles pour le développement du psoriasis, et induit la production d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire. Ceci montre la capacité du dendrimère ABP à agir sur plusieurs acteurs de l'inflammation impliqués dans le psoriasis. En plus de ses effets biologiques et thérapeutiques, le dendrimère ABP, qui a fait l'objet de plusieurs études depuis 2006, n'a pas montré d'effets néfastes, ni *in vitro*, ni *in vivo* dans des modèles animaux. Enfin, le dendrimère est une molécule de synthèse ce qui présente un intérêt économique

par rapport aux biothérapies actuelles. Tous ces avantages du dendrimère ABP pourraient lui permettre d'être une alternative innovante pour le traitement du psoriasis.

La physiopathogenèse du psoriasis est principalement localisée dans la peau. Une action directe sur la région cutanée affectée avec une exposition minimale à d'autres organes offre donc une réponse rapide, efficace et sécurisée par rapport à l'administration systémique. Le problème le plus souvent rencontré lors d'une administration par **voie cutanée** est la faible pénétration cutanée des médicaments en raison des propriétés de barrière du *stratum corneum* (couche cornée), la couche cutanée superficielle. Dans le cas du psoriasis, l'hyperkératose (épaississement de la couche cornée) renforce les difficultés de pénétration cutanée. Cela peut conduire à l'utilisation de doses plus élevées et des applications plus fréquentes qui peuvent, d'une part, affecter l'adhésion et l'observance du patient au traitement prescrit, et d'autre part, entraîner l'apparition d'irritations cutanées et d'autres effets secondaires. L'efficacité d'une administration par voie cutanée repose donc sur le système d'administration utilisé. Ce dernier consiste à augmenter l'absorption du médicament dans les couches profondes de la peau. Plusieurs stratégies sont adoptées pour franchir le ***stratum corneum*,** telles que l'utilisation de promoteurs chimiques de pénétration ou de méthodes physiques qui visent à traverser ou supprimer le *stratum corneum*. Cependant, ces stratégies sont susceptibles d'induire des perturbations plus ou moins irréversibles au niveau de la peau. La vectorisation de principes actifs constitue une alternative moins invasive et permet le passage de principes actifs à travers la barrière cutanée pour un accès direct aux couches profondes de la peau. Toutefois, la plupart de ces systèmes, notamment les liposomes, ont de nombreux inconvénients tels que l'utilisation de matières premières à prix élevé, l'utilisation de solvants organiques ou des méthodes de préparation complexes.

Nos travaux ont donc porté sur la mise au point d'une formulation du dendrimère ABP simple, inoffensive pour la peau, stable et assurant une pénétration cutanée de l'ABP adéquate pour améliorer son effet thérapeutique. Des **vésicules catanioniques** dérivées de sucre, développées dans notre laboratoire, sont particulièrement prometteuses pour une telle application. En effet, ces vésicules se forment spontanément en solution aqueuse, sans usage de solvants organiques, et sont composées de tensioactifs catanioniques tricaténaires dérivés de sucre, nommé **TriCat**, qui sont économiquement attractifs et biocompatibles

(contrairement aux tensioactifs catanioniques classiques). De plus, des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont montré un fort potentiel de ces vésicules catanioniques pour l'administration de molécules par voie cutanée grâce à leur membrane à l'état fluide désordonné aux températures d'utilisation (multiplie par un facteur 2 à 3 la rétention des actifs dans la peau).

Dans le but d'améliorer l'efficacité thérapeutique du dendrimère ABP par voie cutanée, nous avons donc élaboré une stratégie de formulation du dendrimère dans les vésicules catanioniques de TriCat afin d'améliorer sa pénétration dans les couches profondes de la peau. Nous avons ensuite étudié les caractéristiques physico-chimiques de cette formulation et nous avons évalué son efficacité *ex vivo* et *in vivo.*

Dans le **chapitre bibliographique** de ce manuscrit, je commencerai par décrire la structure de la peau et la physiopathogenèse du psoriasis qui nous permettra d'identifier les acteurs de l'inflammation au niveau desquels une molécule thérapeutique devrait agir pour être efficace. Je présenterai ensuite les stratégies thérapeutiques anti-psoriasiques actuellement utilisées qui nous permettront de mieux comprendre la nécessité de développer de nouvelles molécules thérapeutiques pour améliorer la prise en charge du psoriasis à long terme chez les patients. J'introduirai ensuite les dendrimères comme nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de maladies inflammatoires, en particulier le dendrimère ABP. Une mise au point sur les modèles murins de psoriasis nous permettra ensuite de choisir le modèle le plus pertinent pour l'évaluation du potentiel thérapeutique d'ABP *in vivo* dans un modèle animal. Je terminerai ce chapitre bibliographique par la présentation des différentes stratégies décrites dans la littérature pour améliorer la pénétration cutanée de médicaments.

Le **chapitre Résultats** se déclinera en cinq parties :

Dans la **première partie**, je présenterai l'étude évaluant l'efficacité du dendrimère ABP non formulé dans le traitement du psoriasis par voie cutanée, en utilisant le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ. Les résultats de cette première étude ont été publiés dans le journal *Biomolecules* en 2020.

La **deuxième partie** sera consacrée à la mise au point d'une formulation du dendrimère ABP dans les vésicules catanioniques de TriCat, efficace en termes d'encapsulation, de fluidité de la membrane des vésicules à la surface de la peau, et de stabilité au cours du temps.

Les études de pénétration cutanée menées sur différents modèles de peaux *ex vivo,* présentées dans la **troisième partie**, permettront de valider l'efficacité de la formulation dans l'administration cutanée du dendrimère.

Les propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices du dendrimère dans la peau, après administration à l'aide des vésicules, deviennent donc dépendantes des vésicules catanioniques le transportant. Pour cela, la **quatrième partie** permettra d'évaluer l'effet de la formulation sur les propriétés anti-inflammatoires du dendrimère *in vitro.*

Je terminerai dans la **cinquième partie** par la présentation des résultats permettant d'évaluer la capacité de la formulation à améliorer l'efficacité anti-psoriasique du dendrimère ABP dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ.

Une **conclusion générale** de notre travail permettra d'ouvrir de nouvelles **perspectives**.

Le **chapitre Matériels et Méthodes** sera présenté à la fin, afin de faciliter la lecture du manuscrit.

Chapitre 1 : Introduction

1. Définition et épidémiologie

Le psoriasis est une maladie inflammatoire chronique de la peau qui affecte 2 à 3% de la population mondiale [1] avec une prévalence plus élevée chez les adultes que chez les enfants. Il apparaît principalement chez les personnes entre 30 et 39 ans, ainsi qu'un pic plus tardif à 60 ans [2].

L'étiologie du psoriasis est encore assez méconnue, mais cette pathologie semble être déclenchée par des facteurs génétiques (antécédents familiaux) et environnementaux (stress, médicaments, microorganismes, tabac). Le psoriasis pourrait également être causé par des réactions auto-immunes survenant dans la peau [3].

1.1. Classification clinique

Le psoriasis peut se présenter sous plusieurs formes plus ou moins sévères. Les manifestations cliniques du psoriasis sont variables. Il existe cinq sous-types de psoriasis qui diffèrent par leur localisation et leur morphologie : vulgaris ou en plaque, en gouttes, pustuleux, inversé et érythrodermique.

Psoriasis en plaque

Le psoriasis en plaque est la forme la plus courante, qui représente 85 à 90 % de tous les cas psoriasiques [4]. Il se caractérise par la formation de larges plaques rouges épaisses prurigineuses, bien délimitées et recouvertes de squames. Les zones les plus fréquemment atteintes sont les genoux, les coudes, le cuir chevelu et la région lombo-sacrée (**Figure 1**), mais le psoriasis peut toucher aussi d'autres parties du corps, souvent avec une répartition symétrique [2].

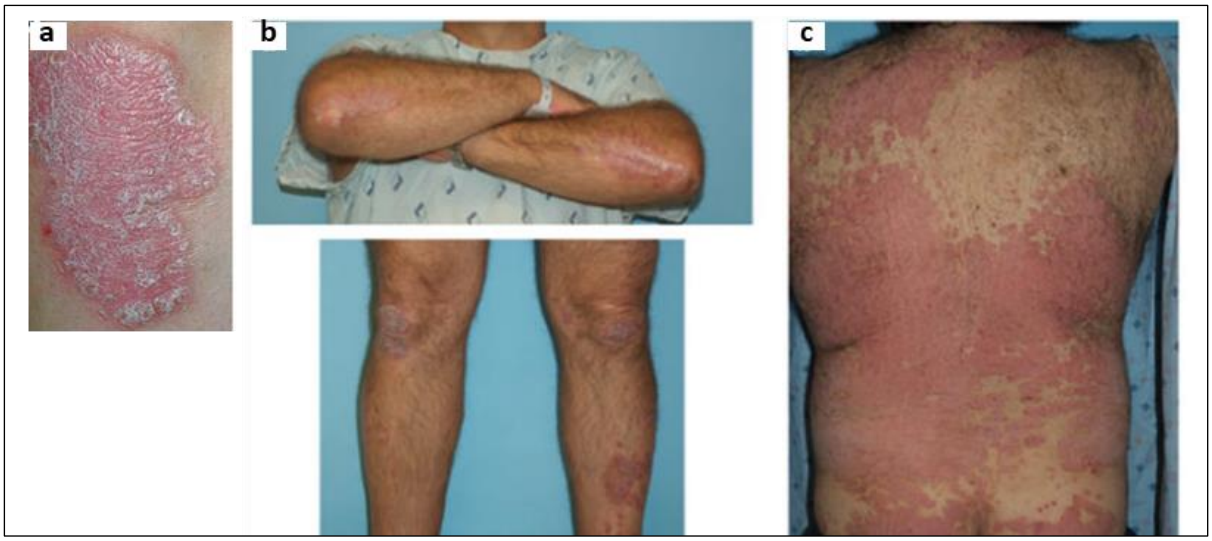


Figure 1. Manifestations cliniques du psoriasis en plaque. *Des plaques squameuses érythémateuses (a) avec des bordures bien définies sur les coudes et les genoux (b), et des lésions plus étendues sur le dos (c). Adaptée de [5].*

Psoriasis en gouttes

Le psoriasis en gouttes est une forme aigue du psoriasis caractérisée par l'apparition de petites plaques érythémateuses surtout au niveau du tronc, des bras et des cuisses. Il est déclenché le plus souvent par une infection bactérienne à streptocoque β-hémolytique, telle qu'une amygdalite ou une pharyngite, ou par une infection virale [4]. Parmi les patients atteints du psoriasis en gouttes, un tiers développe par la suite le psoriasis en plaque [6].

Psoriasis pustuleux

Le psoriasis pustuleux est une forme particulière du psoriasis se caractérisant par des pustules jaunâtres localisées sur la paume des mains et la plante des pieds (psoriasis pustuleux palmo-plantaire), aux extrémités des doigts et des orteils (Acrodermatite continue d'Hallopeau), ou généralisées et affectant toutes les parties du corps (psoriasis pustuleux généralisée) [7]. La forme généralisée du psoriasis pustuleux est grave, et est caractérisée par un début brutal avec une fièvre de 40°C et des signes d'inflammation systémique [4] .

Psoriasis inversé

Le psoriasis inversé, appelé également psoriasis des plis, se développe au niveau des plis de la peau, notamment les plis inter-fessiers, axillaires, inguinaux et sous-mammaires. En raison

de l'humidité des plis, le psoriasis inversé n'a pas la même forme que le psoriasis classique et notamment est dépourvu de squames [4].

Psoriasis érythrodermique

Le psoriasis érythrodermique est la forme la plus rare et la plus sévère du psoriasis. Elle se manifeste sous forme d'érythème couvrant plus de 75% de la surface corporelle [2]. Cette inflammation entraine des complications chez les patients, notamment de l'hypothermie, de l'hypoalbuminémie et une insuffisance cardiaque, nécessitant leur hospitalisation dans la majorité des cas [4]. Le plus souvent, c'est une complication d'un psoriasis préexistant.

1.2. Comorbidités associées au psoriasis

Le psoriasis n'est pas une affection uniquement cutanée, mais est considéré comme une maladie systémique affectant tous les organes du corps. Une augmentation de marqueurs d'inflammation tels que la protéine réactive C (CRP), les cellules immunitaires inflammatoires et les cytokines pro-inflammatoires, a été mise en évidence dans le sang de patients atteints de psoriasis [2].

En plus de la peau, le psoriasis peut affecter les articulations en provoquant une arthrite psoriasique, qui est développée chez 30% des patients psoriasiques [8]. L'inflammation psoriasique peut jouer un rôle dans la survenue de la maladie de Crohn (maladie inflammatoire auto-immune), de l'insuffisance rénale [9], du syndrome métabolique (diabète de type 2, hypertension artérielle, dyslipidémie et obésité) [10], de la dépression, et de cancers (lymphome et cancer épidermoïde) [4].

2. La peau, l'organe atteint

Le psoriasis est une pathologie affectant principalement la peau, le plus grand organe de l'organisme, qui représente 10% du poids corporel d'une personne moyenne. La peau constitue une barrière protectrice entre le corps et l'environnement extérieur. Cette barrière nous protège contre la pénétration de rayons ultraviolets (UV), de substances chimiques, d'allergènes et de micro-organismes. De plus, la peau intervient dans le maintien de

l'homéostasie de l'organisme, en régulant la température corporelle et l'hydratation de la peau [11].

La peau est constituée de trois parties qui diffèrent par leur composition et leur structure, de la plus profonde à la plus superficielle : l'**hypoderme**, le **derme** et l'**épiderme** (**Figure 2**).

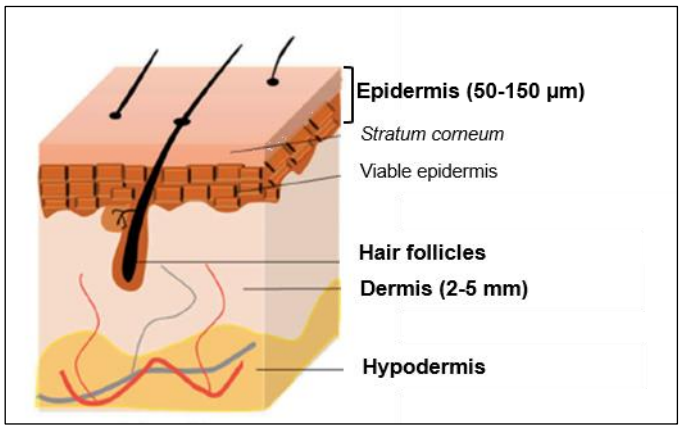


Figure 2. Schéma représentatif de différentes parties de la peau. *Adaptée de [12].*

L'hypoderme, également appelé tissu sous-cutané, est la couche la plus profonde de la peau. C'est un réseau d'adipocytes (cellules graisseuses), lié au derme par des fibres de collagène et d'élastine. L'hypoderme est constitué d'autres cellules que les adipocytes, telles que les fibroblastes et les macrophages. Il assure la vascularisation et l'innervation de la peau. Son rôle est important dans la protection contre les chocs physiques et dans la thermorégulation [11].

Le derme se situe entre l'hypoderme et l'épiderme, il a une épaisseur moyenne de 2 à 5 mm. Les fibroblastes sont les principales cellules dermiques responsables de la synthèse de composants de la matrice extracellulaire, notamment de collagène, d'élastine, de laminine, et de fibronectine. On trouve aussi des mélanocytes, qui synthétisent le pigment de mélanine qui protège la peau contre les rayons UV, et des cellules immunitaires telles que des cellules dendritiques, des macrophages, des mastocytes et des lymphocytes T qui jouent un rôle crucial dans la réponse inflammatoire [5]. Le derme contient aussi des vaisseaux sanguins et lymphatiques, des terminaisons nerveuses, et des annexes cutanées : les follicules pileux

associés aux glandes sébacées (follicules pilo-sébacés) et les glandes sudoripares. Le sébum secrété par les glandes sébacées lubrifie la peau et maintient le pH cutané autour de 5.
On distingue deux parties du derme : le derme papillaire et le derme réticulaire. Le derme papillaire, qui comprend les papilles dermiques, se situe dans la zone superficielle du derme, entre les crêtes épidermiques (expansions de l'épiderme dans le derme). Il est constitué d'un tissu conjonctif lâche qui est richement innervé et vascularisé assurant la nutrition de l'épiderme. Le derme réticulaire, un peu plus profond, est constitué d'un tissu conjonctif dense vascularisé, innervé et héberge les annexes cutanées [11].

L'épiderme est le compartiment externe de la peau qui est le plus affecté par le psoriasis. Il est séparé du derme par une jonction dermo-épidermique délimitant les crêtes épidermiques et les papilles dermiques.
L'épiderme est un épithélium pavimenteux, stratifié, et kératinisé, de 50 à 150 µm d'épaisseur en moyenne. Il est composé principalement de kératinocytes (90%) mais aussi d'autres populations cellulaires telles que les cellules de Langerhans, ayant un rôle dans la défense immunitaire, les cellules de Merkel, qui sont des cellules neuro-épithéliales ayant un rôle dans la perception tactile, et les mélanocytes.
L'épiderme est constitué de quatre couches superposées, de la plus profonde à la plus superficielle : la couche basale, la couche épineuse (*stratum spinosum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*) et la couche cornée (*stratum corneum*). Ces couches sont-elles mêmes réparties en deux parties : l'épiderme viable hydrophile (70% d'eau) constitué par les trois couches les plus profondes de l'épiderme, et la couche cornée, la moins hydrophile (15-20% d'eau), constituée par des cellules mortes anucléées. Ces différentes couches correspondent aux étapes de différenciation des kératinocytes tout au long de leur migration de la couche basale jusqu'à la zone de différenciation terminale, la couche cornée [11]. Ce processus de renouvellement épidermique est estimé à environ 21 jours [13] (**Figure 3**).

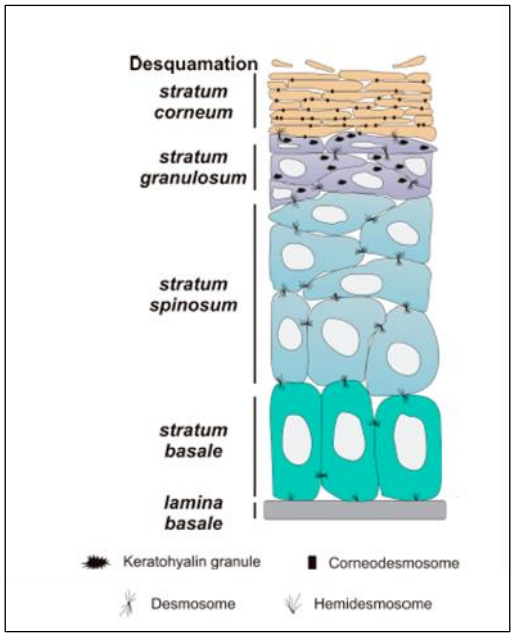


Figure 3. Représentation schématique des étapes de différenciation de kératinocytes de la couche basale à la couche cornée. *Adaptée de [14].*

La couche basale est la couche la plus profonde de l'épiderme. Elle est formée par une couche unique de kératinocytes cubiques qui sont attachés à la matrice extracellulaire de la membrane basale par des jonctions de type hémidesmosomes. Ces cellules se divisent d'une façon continue pour former de nouveaux kératinocytes qui migrent vers la surface et assurent par la suite le renouvellement de l'épiderme.

La couche épineuse, également appelée corps muqueux de Malpighi, est constituée de 8 à 10 couches de kératinocytes polygonaux au-dessus de la couche basale [15]. Les kératinocytes contiennent des filaments intermédiaires de kératine et sont interconnectés par l'intermédiaire des desmosomes (des jonctions intercellulaires).

Les kératinocytes continuent à se différencier dans **la couche granuleuse** (3 à 5 strates de kératinocytes) et deviennent plus aplatis. Les jonctions serrées entre les kératinocytes de la couche granuleuse participent à la fonction barrière de la peau [16]. De nombreux grains de kératohyaline et de kératinosomes (corps lamellaires d'Odland) apparaissent dans le cytoplasme de ces kératinocytes. Les grains de kératohyaline sont constitués principalement par la profilaggrine qui, sous l'influence d'enzymes, se transforme dans la couche cornée en monomères de filaggrine. Ensuite, la filaggrine s'associe aux filaments intermédiaires de kératines provoquant leur agrégation en macrofibrilles de kératines qui forment la matrice

intracornéocytaire, d'où le nom: **fil**ament-**aggr**egating prote**in** [17]. Les corps lamellaires d'Odland fusionnent avec la membrane à l'interface du *stratum granulosum* - *stratum corneum* et secrètent leur contenu lipidique dans les espaces intercornéocytaires. Ce mélange de lipides, formant le ciment intercornéocytaire, est constitué majoritairement de céramides, de cholestérol, et d'acides gras libres et d'autres lipides (sulfate de cholestérol, esters de cholestérol, glucosyl-céramides). Ces lipides s'organisent par la suite en multicouches parallèle aux parois cellulaires de cornéocytes. La nature hydrophobe de ces lipides ainsi que leur organisation en lamelles superposées rendent la couche cornée imperméable aux molécules non liposolubles et empêchent la perte d'eau. Les corps lamellaires secrètent aussi certaines protéines structurales, telles que la cornéodesmosine, qui favorise la cohésion des cornéocytes, et des protéases impliquées dans le processus de desquamation [11].

La couche cornée est la couche la plus externe de la peau. Elle est formée de 18 à 20 couches de cornéocytes. Les cornéocytes sont des cellules aplaties, qui ont perdu leur noyau et leurs organites cytoplasmiques au cours de la différenciation cellulaire (la kératinisation). Leur cytoplasme est rempli de filaments de kératine et de filaggrine. En superficie de la couche cornée, la filaggrine se dégrade en acides aminés libres qui vont faire partie des facteurs naturels d'hydratation ou Natural Moisturizing Factor (NMF) dans la matrice intracornéocytaire. Les NMF également composés de lactate, des minéraux, de l'urée (provenant de la sueur [18]), du glycérol (dérivé de la dégradation des triglycérides sébacés) et de l'acide hyaluronique (synthétisé par les kératinocytes), présentent des propriétés hygroscopiques, capable de retenir l'eau et de contribuer ainsi à l'hydratation de la couche cornée. Les cornéocytes présentent une enveloppe cornée rigide, qui remplace la membrane plasmique, composée de deux feuillets : protéique et lipidique. Le feuillet protéique se situe à la face interne de l'enveloppe, et est constitué majoritairement par l'involucrine et la loricrine. Le feuillet lipidique, constitué par des acylcéramides provenant de la sécrétion des corps lamellaires d'Odland, se situe sur la face externe. Ce feuillet lipidique se lie d'un côté au feuillet protéique, qui est lié aux filaments de kératine de la matrice intracornéocytaire, et de l'autre côté aux lipides intercornéocytaires. Il a été démontré que l'enveloppe cornée est essentielle pour former les feuillets lipidiques intercornéocytaires, et donc essentielle à la fonction barrière de la peau [11,13].

En superficie de la couche cornée, un processus de desquamation (élimination de cornéocytes en surface) a lieu. Ce phénomène est dû à la destruction de cornéodesmosomes (jonctions

liant les cornéocytes entre eux) par des sérines protéases issues des corps lamellaires d'Odland. Ainsi, les squames observées dans le psoriasis sont dues à une altération du processus de desquamation.

En résumé, **la couche cornée** est la couche principale qui assure la fonction barrière de l'épiderme. Elle est comparée à un système ''brique-mortier'', où les cornéocytes représentent les briques qui sont incluses dans une matrice lipidique extracellulaire, le mortier [19]. L'intégrité de cette barrière protectrice est assurée par un équilibre entre les stades de différenciation des kératinocytes et le processus de desquamation.

3. Pathogenèse du psoriasis

Le psoriasis se caractérise principalement par une altération de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes, associées à une infiltration de cellules immunitaires périphériques. La néovascularisation est également une caractéristique importante du psoriasis, à l'origine de l'érythème des plaques. L'interaction entre ces trois éléments (les kératinocytes, les cellules immunitaires et les cellules endothéliales vasculaires) contribue d'une manière interdépendante à l'établissement d'un contexte inflammatoire à la base de la pathogenèse du psoriasis.

3.1. Histopathologie du psoriasis

3.1.1. Prolifération anormale des kératinocytes

D'un point de vue histologique, une lésion cutanée chez un patient atteint de psoriasis est caractérisée par l'épaississement de l'épiderme (**acanthose**), et par l'allongement des crêtes épidermiques qui sont séparées par des papilles dermiques (**hyperpapillomatose**) [20]. Cette acanthose est due à un renouvellement excessivement rapide de l'épiderme, en seulement 3 à 4 jours au lieu de 3 semaines [21]. Cette hyperprolifération de l'épiderme est associée à un trouble de différenciation des kératinocytes qui aboutit à une **absence de la couche granuleuse** chez les patients, à un épaississement de la couche cornée (**hyperkératose**) et à une persistance anormale de noyaux dans les cornéocytes (**parakératose**). D'un point de vue

clinique, ces altérations cutanées se traduisent par l'apparition d'une plaque blanchâtre épaisse qui desquame.

À ces anomalies s'associe une infiltration de cellules inflammatoires, très précoce dans l'apparition d'une plaque. Cette infiltration cellulaire est d'abord constituée de polynucléaires neutrophiles (PNN), se réunissant souvent en micro-abcès sous la couche cornée (micro-abcès de Munro-Sabouraud). Lors de leur migration dans l'épiderme, les PNN entraînent des altérations majeures de la membrane basale de l'épiderme. Ces altérations contribuent au détachement des kératinocytes basaux et par conséquent à une activation permanente de leur prolifération [22]. Ces micro-abcès s'accompagnent d'un infiltrat immunitaire dans le derme constitué majoritairement par des cellules T activées, des cellules dendritiques et des macrophages [20]. Le rôle de cet infiltrat immunitaire sera détaillé davantage dans la deuxième partie de la pathogenèse du psoriasis.

La **figure 4** résume les changements histologiques de la peau psoriasique par rapport à la peau saine.

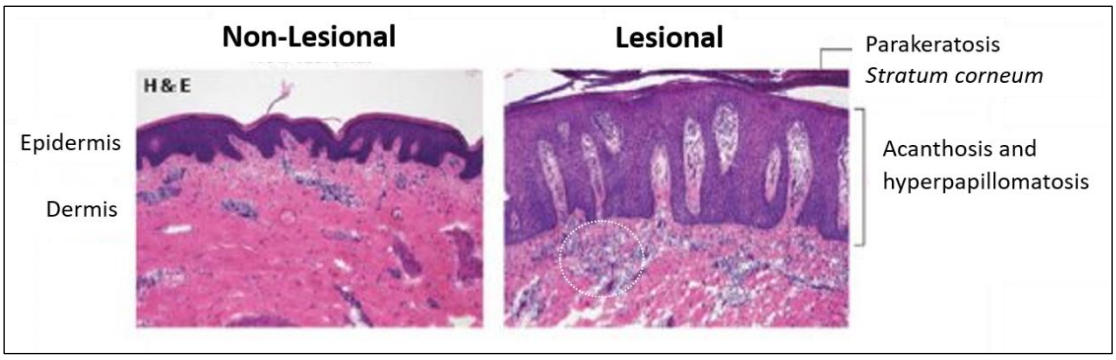


Figure 4. Les manifestations histologiques du psoriasis (Coloration Hémalun-Eosin, HE). *Les lésions psoriasiques se caractérisent par une acanthose, une hyperpapillomatose, une parakératose, et une infiltration de cellules immunitaires dans le derme (cercle en pointillé). Adaptée de [5].*

3.1.2. Changements vasculaires

L'hypervascularisation dans le derme constitue également une des caractéristiques histologiques du psoriasis. Cette hypervascularisation est responsable de l'érythème cutané observé dans les plaques de psoriasis. En effet, les kératinocytes produisent des facteurs mitogènes, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le PDGF (Platelet-Derived Growth

Factor), qui stimulent la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse [21,23]. Des taux significativement élevés de VEFG ont été détectés dans les plaques de psoriasis [23]. Les cellules endothéliales activées contribuent à la dilatation des vaisseaux sanguins dans le derme et favorisent la prolifération des kératinocytes, par la production du KGF (Keratinocyte Growth Factor) [24]. La vasodilatation facilite l'adhérence des leucocytes sur les cellules endothéliales qui se fait au travers des molécules d'adhésion fortement exprimées à la surface des cellules endothéliales : E-sélectine, ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) et VCAM-1 (Vascular-Cell Adhesion Molecule 1). Ainsi, l'extravasation des leucocytes (transmigration à travers l'endothélium) vers la peau enflammée est facilitée [24].

3.2. Inflammation cutanée et psoriasis

Le développement de la plaque psoriasique n'est pas limité uniquement à l'hyperprolifération des kératinocytes mais résulte aussi de l'interaction de ces derniers avec les cellules de l'immunité innée (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, PNN) et adaptative (lymphocytes T) [24]. Ces interactions se font au travers d'un réseau complexe de cytokines et de chimiokines et conduisent à un cercle vicieux que les traitements cherchent à inhiber à différents niveaux.

Le rôle inflammatoire des **cellules dendritiques**, des **lymphocytes T** et des **monocytes/macrophages** sera détaillé dans cette partie afin de mieux comprendre la physiopathologie du psoriasis et d'identifier les principales cibles thérapeutiques.

3.2.1. Rôle des cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) jouent un rôle dans l'initiation du psoriasis par leur présence à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Ce sont des cellules présentatrices de l'antigène capable d'activer les lymphocytes T naïfs. Il existe 3 types de cellules dendritiques susceptibles d'être impliquées dans le développement du psoriasis, caractérisées par des fonctions et des capacités migratoires différentes: les **cellules de Langerhans épidermiques**, les **cellules dendritiques plasmacytoïdes,** qui sont absentes dans la peau normale, et les **cellules dendritiques myéloïdes** [4].

Les **cellules de Langerhans** sont des cellules présentatrices d'antigène immatures, présentes dans l'épiderme, qui constituent une des premières défenses immunitaires. Elles ont pour rôle de capter les antigènes traversant l'épithélium cutané, puis de migrer vers les tissus lymphoïdes, pour les présenter aux lymphocytes T [4]. Cependant, cette migration de cellules épidermiques de Langerhans en réponse à des stimuli (cytokine et allergènes) est altérée chez les patients psoriasiques, ce qui suggère l'implication de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire cutané [25]**.** Cette absence de migration suggère également que les cellules de Langerhans retenues dans l'épiderme pourraient présenter localement des antigènes aux lymphocytes T et exacerber ainsi la réaction inflammatoire cutanée [25].

Les **cellules dendritiques plasmacytoïdes** (pDC) sont présentes dans le sang et dans les organes lymphoïdes, et se distinguent des cellules dendritiques myéloïdes par l'absence de l'expression du marqueur de surface CD11c [26]. Des stimuli externes (trauma, infections, médicaments, stress ou l'alcool) entrainent la formation de lésions au niveau de la barrière cutanée, et par conséquent la mort des kératinocytes. Cela libère des peptides et des protéines antimicrobiens (AMP) tels que la cathélicidine (LL-37), les β-défensines, et les protéines S100 (S100A7, S100A8, S100A9, S100A12, S100A15), qui sont surexprimés dans les lésions psoriasiques [27]. Le LL-37 lié à l'ADN des cellules endommagées stimule des récepteurs de type Toll-like (TLR)9 intracellulaires dans les pDC en provoquant leur activation et la production d'interférons (IFN) de type I (IFN-α, IFN-β) [28,29]. Le LL-37 se lie aussi à l'ARN des cellules endommagées, et ce complexe peut également activer les pDC via TLR7, et les cellules dendritiques myéloïdes via TLR7/8 [27]. L'IFN-α/β secrété par les pDC induit également une activation de cellules dendritiques myéloïdes. Ce modèle d'initiation de la maladie par TLR7/8, développé par Gilliet *et al*., est à la base du développement d'un modèle de psoriasis largement utilisé chez la souris qui repose sur l'utilisation d'un agoniste synthétique de TLR7/8, l'imiquimod (IMQ) [30] (**Figure 5**).

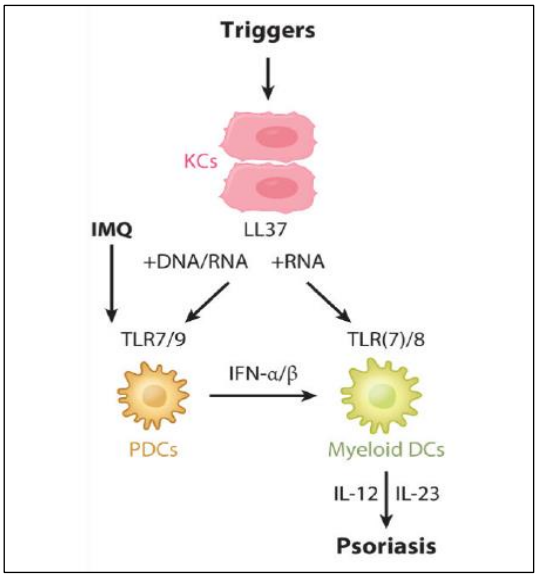


Figure 5. Modèle d'initiation de la maladie psoriasique [5]. *KCs: kératinocytes.*

Les cellules dendritiques myéloïdes (mDC), une fois activées, migrent vers les ganglions lymphatiques drainants où elles permettent la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes T effecteurs suite à l'induction de iNOS (inducible nitric oxide synthase) et à la production de cytokines inflammatoires, telles que l'IL-23, l'IL-12, et le TNF (Tumor Necrosis Factor, fait référence au seul TNF-α) [31].

3.2.2. Rôle des lymphocytes T

Les **lymphocytes T** jouent un rôle important dans la pathogenèse du psoriasis. Les deux types de lymphocytes T, les lymphocytes T auxiliaires $CD4^+$ (Th) et les lymphocytes T cytotoxiques $CD8^+$, font partie de l'infiltrat inflammatoire présent dans les lésions psoriasiques [32]. Ellis *et al.* ont fourni la première preuve de l'implication des lymphocytes T dans le psoriasis par l'évaluation de l'effet thérapeutique d'un agent immunosuppresseur (ciclosporine) [33]. De plus, l'agent DAB_{389}IL-2, une protéine de fusion également appelée ''denileukin diftitox'' ou (Ontak®), ciblant les cellules T, a amélioré des lésions psoriasiques chez les patients [34].

Les mDC activées permettent la polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ en lymphocytes T auxiliaires de type 17 (Th17) sous l'action du TGF-β (Transforming Growth Factor β) et de l'IL-6. Ensuite, cette polarisation est amplifiée et maintenue par l'IL-23 [26]. Dans les lésions psoriasiques, l'IL-23 est essentiellement secrétée par les cellules dendritiques et les

macrophages [35]. Une fois activés, les lymphocytes Th17 secrètent l'IL-17A et l'IL-17F. Chez la souris, l'IL-22 est également secrétée par les lymphocytes Th17, alors que chez l'homme, la plupart de l'IL-22 est sécrétée par une autre population de lymphocytes T dite Th22. L'IL-17 et l'IL-22 sont fortement exprimées dans les lésions psoriasiques [36]. Fits *et al.* ont montré que la réponse à l'IMQ, dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ, a été bloquée chez des souris IL-23p19 KO (Knock-Out) et IL-17RA (IL-17 receptor A) KO, ce qui met en évidence l'importance de l'axe IL-23/IL-17 dans le psoriasis [30].

Un autre profil de polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ en lymphocytes T auxiliaires de type 1 (Th1) est généré par l'IL-12 et l'IFN-γ. Ces lymphocytes Th1 sécrètent à leur tour des cytokines pro-inflammatoires, notamment de l'IFN-γ et du TNF [37].

Ces cytokines pro-inflammatoires produites par les lymphocytes T favorisent l'activation et la prolifération des kératinocytes. Comme les pDC, les kératinocytes sont également activés par le complexe LL37/ADN via TLR9, ce qui entraîne la production d'IFN de type I [38]. Les kératinocytes à leur tour participent à la cascade inflammatoire en secrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, et TNF), des AMP et surtout des chimiokines (MCP-1, IL-8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11) qui attirent des monocytes, des PNN et des lymphocytes de la circulation sanguine vers la peau [20]. Ce recrutement participe à l'amplification et au maintien de la réponse inflammatoire.

En parallèle, les lymphocytes T $CD8^+$ jouent un rôle important dans la genèse des lésions psoriasiques. Hijnen *et al.* ont montré que les lymphocytes T $CD8^+$, présents essentiellement dans l'épiderme, participent à la production de cytokines pro-inflammatoires IFN-γ, IL-13, IL-22 et IL-17 [39]. L'IL-13 augmente l'expression de CCL22 (macrophage-derived chemokine) et de la métalloprotéinase matricielle (MMP)-9 dans les kératinocytes, facilitant ainsi la migration de leucocytes dans l'épiderme [40,41].

Des lymphocytes T exprimant des marqueurs de cellules natural killer (NK) (CD94, CD158, CD161) ont été détectées au niveau des sites lésionnels, ce qui suggère l'implication de cellules NK-T dans la pathologie du psoriasis [42]. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* sur la

souris ont montré le rôle potentiel des cellules NK-T dans la formation de plaques psoriasiques via la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ et l'IL13 [42,43].

3.2.3. Rôle des monocytes/macrophages

Bien que le psoriasis soit une pathologie médiée principalement par les lymphocytes T, les **macrophages** dérivant de monocytes circulants contribuent également au développement des lésions psoriasiques [44]. Les monocytes sont l'une des principales sources productrices de TNF, une cytokine pro-inflammatoire qui joue un rôle central dans le maintien de la réponse inflammatoire chronique [45,46]. Le TNF est d'une importance particulière dans le psoriasis puisque son inhibition thérapeutique entraine une réduction de l'infiltrat inflammatoire constitué par les DC, les macrophages et les lymphocytes T, conduisant à une normalisation de la différenciation épidermique [45].

Plusieurs études ont montré une augmentation du nombre de macrophages dans la peau lésionnelle des patients psoriasiques, localisés au niveau de la jonction dermo-épidermique, par rapport à la peau non lésionnelle du même patient [45,46]. Une augmentation de l'expression de chimiokines comme MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1), a été également observée au niveau de la jonction dermo-épidermique des lésions psoriasiques [47]. Cela implique le recrutement de macrophages au niveau du site inflammatoire lésionnel de la peau psoriasique à partir de monocytes circulants.

Plusieurs modèles murins ont mis en évidence le rôle des macrophages dans la pathogenèse du psoriasis [48]. Par exemple, dans le modèle murin de psoriasis induit par l'injection intradermique de l'IL-23, une infiltration de macrophages a été observée dans la peau psoriasique. Le développement et la différenciation des monocytes en macrophages sont médiés par le CSF-1 (colony-stimulating factor 1) qui interagit avec son récepteur CSF-1R (colony-stimulating factor 1 receptor), qui est exprimé à la surface des monocytes et des macrophages. Afin de mieux comprendre le rôle des macrophages dans le modèle de l'IL-23, un inhibiteur sélectif du CSF-1R, administré par voie orale, a été utilisé pour induire une déplétion de la population monocyte/macrophage. Cette déplétion a conduit à une diminution de l'inflammation, associée à une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans la peau, notamment le TNF. Ceci démontre le rôle des

monocytes/macrophages dans la physiopathologie du psoriasis, suggérant ainsi qu'ils constituent une cible pertinente dans la thérapie du psoriasis [46].

En conclusion, cette partie a permis de présenter les acteurs de l'inflammation cutanée au niveau desquels les molécules thérapeutiques devraient agir pour qu'elles soient efficaces contre le psoriasis. Les différentes études présentées dans cette partie montrent l'interaction existant entre les cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité adaptative, et les kératinocytes dans la peau psoriasique (**Figure 6**). En effet, les cellules immunitaires innées produisent des cytokines pro-inflammatoires qui activent les mDC. Les mDC activées sécrètent des médiateurs tels que l'IL-12 et l'IL-23, conduisant à la polarisation des lymphocytes T en Th1 et Th17, respectivement. Les lymphocytes T à leur tour sécrètent des cytokines pro-inflammatoires qui activent la prolifération anormale des kératinocytes et induisent la production des AMP, des cytokines pro-inflammatoires, et des chimiokines. Ces médiateurs maintiennent la maladie inflammatoire d'une façon chronique.

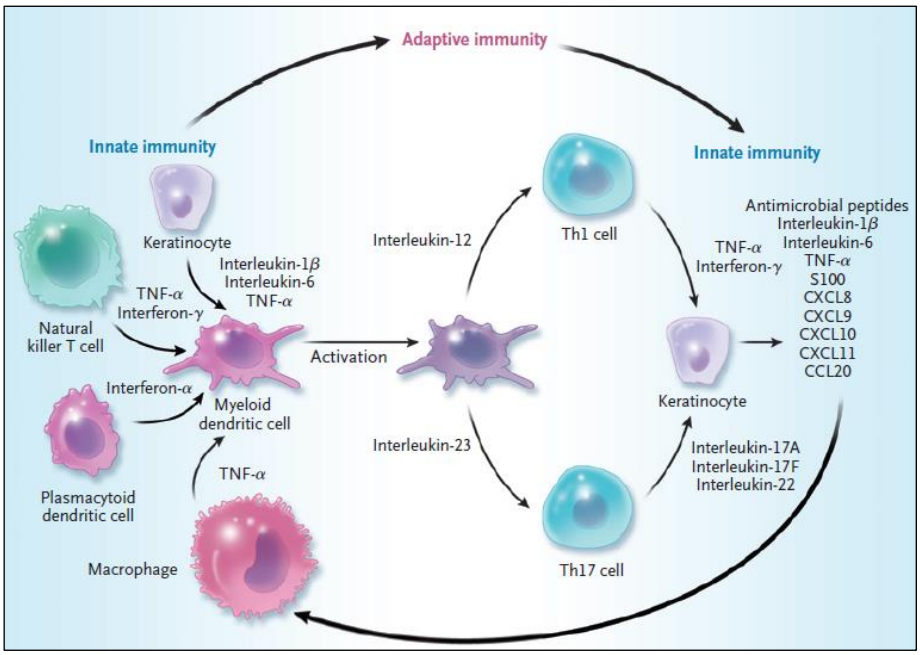


Figure 6. Interaction entre les cellules de l'immunité innée, les cellules de l'immunité adaptative, et les kératinocytes, qui contribue au développement d'une inflammation chronique au niveau de la peau psoriasique [20].

3.3. Le psoriasis, une maladie auto-immune ?

La présence de lymphocytes T réactifs contre des auto-antigènes exprimés dans la peau montre qu'un mécanisme d'auto-immunité peut être impliqué dans la pathogenèse du psoriasis. **LL-37**, **ADAMTSL5** et **Kératine 17** sont parmi les auto-antigènes récemment identifiés.

Le **LL-37** est un des auto-antigènes reconnus par les lymphocytes T. En plus de son rôle dans la rupture de la tolérance à l'ADN du soi, conduisant à l'activation des pDC (*cf* chapitre 1 partie **3.2.1**), il active également les lymphocytes T. Les lymphocytes T activés spécifiquement par LL-37 induisent la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN-γ et l'IL-17A. Ces lymphocytes T sont présents dans le sang et dans les lésions psoriasiques des patients. Leur présence est corrélée d'une façon significative à la sévérité de la maladie [3].

Arakaw *et al*. ont identifié un autre auto-antigène, la protéine **ADAMTSL5** qui est exprimée par les mélanocytes dans l'épiderme. ADAMTSL5 est présentée par (HLA)-Cw6 (Human Leucocyte Antigen) aux lymphocytes T $CD8^+$, ce qui induit la prolifération de lymphocytes T $CD8^+$ qui vont produire des cytokines impliquées dans la pathogenèse de psoriasis (IFN-γ et IL-17A). Cette étude a permis d'identifier les mélanocytes comme un autre acteur cellulaire impliqué dans le déclenchement de la réponse inflammatoire [49].

Des fragments de la protéine **kératine 17** (K17), qui est exprimée dans les follicules pileux, ont été également identifiés comme auto-antigènes activant les lymphocytes T. En effet, ces fragments peptidiques de K17 induisent la prolifération de lymphocytes T circulants chez les patients psoriasiques portant l'allèle HLA-Cw6 [50].

3.4. Facteurs génétiques impliqués dans le psoriasis

Plusieurs facteurs génétiques contribuent au développement du psoriasis. Les analyses génétiques ont montré la présence de 60 loci de susceptibilité, nommés PSORS (PSORiasis Susceptibility), situés dans des chromosomes différents. Ces PSORS contribuent d'une façon mineure ou majeure à la prédisposition au psoriasis [51]. Le locus PSORS1 est le locus majeur qui contribue de 35 à 50% au risque relatif de développer le psoriasis [20,52]. PSORS1 se situe sur le chromosome 6 en position 6p21 au niveau de la région des gènes du CMH (Complexes

Majeur d'Histocompatibilité), correspondant plus particulièrement à l'allèle HLA-Cw6 (nommé HLA-Cw*0602) du gène codant la protéine HLA-C. En effet, HLA-Cw6 peut prédisposer au psoriasis par un mécanisme d'auto-immunité déjà présenté dans la partie précédente.

De nombreuses autres régions chromosomiques indépendantes du CMH sont liées à la prédisposition au psoriasis. Ces régions contiennent des gènes de susceptibilité impliqués dans la réponse immunitaire, tels que le gène *IL-12B* codant la sous unité p40 commune à l'IL-12 et l'IL-23 [53]. Ces dernières, comme déjà présenté, sont des cytokines impliquées dans la polarisation de lymphocytes T en Th1 et Th17, respectivement**.** D'autres gènes de susceptibilité sont liés à la différenciation terminale de l'épiderme, tels que les gènes *LCE3B* (Late Cornified Envelope 3B) et *LCE3C* [54]**.** Une délétion commune de ces deux gènes induit une altération de la fonction barrière de l'épiderme. Le gène *DEFB4* codant la β-défensine 2, qui est surexprimée dans les lésions psoriasiques, est aussi associé au psoriasis [55]. Cette association est due à une augmentation du nombre de copies de ce gène.

La **figure 7** permet de résumer l'ensemble des acteurs participant à la dérégulation de la réponse immunitaire cutanée, à l'altération de la différenciation des kératinocytes et ainsi au développement des lésions psoriasiques.

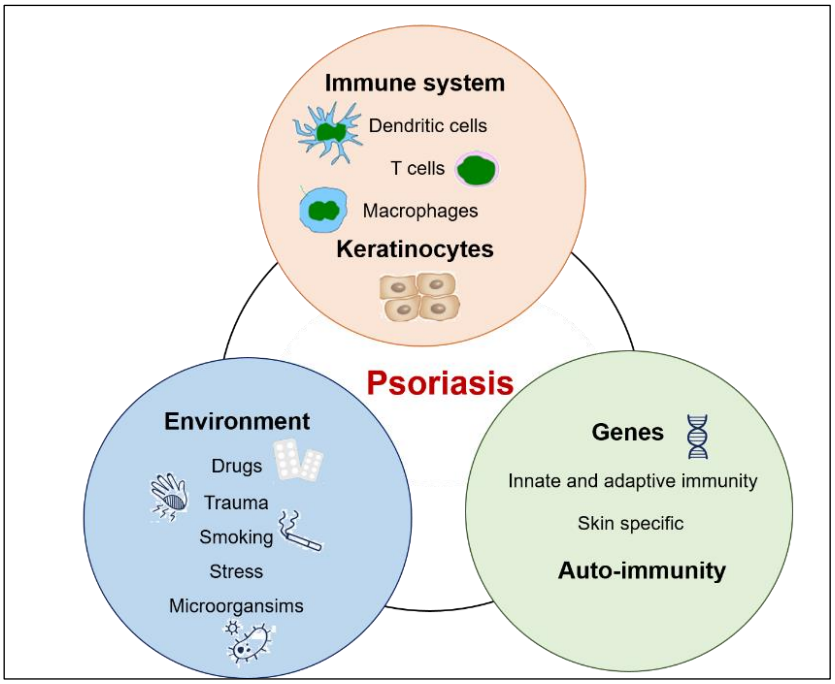


Figure 7. Étiologie du psoriasis. *Des gènes de susceptibilité, des auto-antigènes et des facteurs environnementaux contribuent à une dérégulation de la réponse immunitaire innée et adaptative, et conduisent au développement du psoriasis. Adaptée de [2].*

4. Traitements du psoriasis

À ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour le psoriasis. Les traitements disponibles sur le marché permettent d'améliorer les lésions psoriasiques, de manière transitoire, ou de prévenir l'exacerbation des lésions. Le choix du traitement par voie cutanée ou systémique dépend de la sévérité de la maladie et des comorbidités associées. Les patients psoriasiques sont classés selon deux groupes : formes légères ou formes modérées à sévères. Plusieurs index sont établis par les cliniciens pour évaluer la gravité de la maladie : % de BSA (Body Surface Area) atteinte, le score PASI (Psoriasis Area and Severity Index), ou le score DLQI (Dermatology Life Quality Index).

Un psoriasis est considéré comme sévère, si le % de **BSA atteinte est > 10%**, sachant que 1% de BSA correspond à la surface de la main [56].

La sévérité du psoriasis peut également être évaluée par le score PASI. Ce score est largement utilisé dans les essais cliniques pour évaluer la sévérité de la maladie et la réponse des patients aux traitements. Le score PASI combine les critères cliniques pertinents du psoriasis :

l'érythème (score 0 à 4), les squames (score 0 à 4), l'épaisseur de la plaque (score 0 à 4), et le pourcentage de la surface atteinte (score 0 à 6) pour les quatre régions (tête, cou, tronc, et membres inférieurs et supérieurs) [57]. Le score PASI ainsi calculé varie de 0 (normale) à 72 (sévérité maximale); les patients ayant un **score PASI > 12** (critère d'inclusion dans les essais cliniques) sont considérés comme ayant des formes sévères du psoriasis [56]. La plupart des essais cliniques considèrent qu'une réduction de 75% du score PASI (nommée *PASI75*) est nécessaire pour que le traitement soit considéré comme efficace. Cependant, pour beaucoup de cliniciens ce critère est trop strict, ce qui a amené une autre étude a montré qu'un *PASI50* équivaut aussi à une amélioration cliniquement significative du psoriasis [58].
Contrairement au score PASI, le score DLQI est subjectif. En effet, le score DLQI permet d'évaluer l'influence du psoriasis sur la qualité de vie du patient. Ce score, compris entre 0 et 30, repose sur 10 questions concernant l'influence de la maladie sur la vie privée, sociale et professionnelle du patient [57]. La forme du psoriasis est considérée sévère pour un **score de DLQI > 10** [59].

4.1. Thérapie topique (voie cutanée)

Le traitement topique cutané est le traitement de choix chez les patients atteints de formes légères de psoriasis (BSA atteinte < 10% ou PASI < 12) [60]. Les traitements par voie cutanée sont également prescrits en association avec les traitements systémiques pour la prise en charge des formes les plus sévères. Parmi ces traitements locaux, on trouve : les agents kératolytiques, les dérivés de la vitamine D et les rétinoïdes. Cependant, les dermocorticoïdes restent les principaux médicaments prescrits.

Les agents kératolytiques permettent la réduction des squames et de l'hyperkératose observée dans les plaques de psoriasis qui empêchent la pénétration des principes actifs.
L'acide salicylique est parmi les kératolytiques les plus couramment utilisés. Sa fonction kératolytique est due à sa capacité à détruire le ciment intercornéocytaire et, par conséquent, à réduire la cohésion intercornéocytaire [61]. De plus, il réduit le pH de la couche cornée, augmentant ainsi l'hydratation de la peau [62]. En raison de ses effets kératolytiques, l'acide salicylique est souvent associé à d'autres thérapies par voie cutanée, en particulier les

corticoïdes, afin d'augmenter leur pénétration cutanée (par exemple, Diprosalic® : acide salicylique + dipropionate de bétaméthasone).

Une des limitations de son utilisation en voie cutanée est cependant son absorption systémique non négligeable. En effet, des cas de toxicité systémique aiguë ont été signalés chez des patients traités par l'acide salicylique après une utilisation cutanée prolongée sur de grandes surfaces corporelles (> 20 % de la surface corporelle) ou suite à l'utilisation de pansements occlusifs [63].

Les dérivés de la vitamine D

La vitamine D (liposoluble) est une hormone connue pour son rôle dans la régulation du métabolisme phosphocalcique. Elle provient non seulement de l'alimentation, mais également de la synthèse naturelle dans l'épiderme à partir de son précurseur, le 7-déhydrocholestérol, sous l'action des rayons UVB. La forme de la vitamine D produite dans la peau est majoritairement la forme biologiquement inactive. Elle subit par la suite des réactions d'hydroxylation successives dans le foie et dans le rein pour former la vitamine D, la **1,25-dihydroxyvitamine D**. À côté de cette production rénale majeure, un site de production mineur de la forme active est identifié dans la peau. Une fois synthétisée, la forme active de la vitamine D diffuse dans l'organisme et agit sur les tissus cibles, notamment l'intestin, l'os, les reins, les glandes parathyroïdes, la peau et le cerveau [64]. Des analogues de la vitamine D ont été largement étudiés dans le traitement du psoriasis par voie cutanée, tels que le calcitriol (Silkis®), le calcipotriol (Daivonex®, Dovonex® et Psorcutan®), le tacalcitol (Curatoderm®, Apsor®) et ont montré une efficacité thérapeutique [60].

Les effets thérapeutiques de la vitamine D et de ses analogues par voie cutanée se produisent par l'intermédiaire de deux mécanismes : un mécanisme génomique et un mécanisme non génomique. Le mécanisme génomique est médié par les récepteurs nucléaires de la vitamine D (VDR), exprimés par les kératinocytes et les lymphocytes T. Le VDR lié à la vitamine D forme un hétérodimère avec le RXR (Retinoic X Receptor) nucléaire. Le complexe VDR/ RXR se lie sur des séquences spécifiques de l'ADN (Vitamin D Response Element, VDRE) et régule par la suite l'expression des gènes impliqués dans la prolifération épidermique, l'inflammation et la kératinisation. Le mécanisme non génomique induit une meilleure différenciation des kératinocytes par une augmentation du taux de calcium intracellulaire [65].

Le rôle anti-inflammatoire des analogues de la vitamine D résulte d'une inhibition de la production d'IL-2, d'IL-6 et d'IFN-γ et d'une diminution de l'expression des AMP tels que les β-défensines, qui sont surexprimés dans les lésions psoriasiques [65,66].
Il a été montré que les analogues topiques de la vitamine D utilisés en association avec les corticoïdes topiques, tels que le calcipotriol en association avec le dipropionate de bétaméthasone (Dovobet®, Daivobet®), présentent une efficacité supérieure à celle obtenue lors de leurs utilisations en monothérapie [67].
Les effets indésirables observés lors de l'utilisation des dérivés de la vitamine D par voie cutanée sont l'irritation cutanée et l'hypercalcémie [68].

Le premier **rétinoïde** synthétique utilisé dans le traitement des plaques de psoriasis est le tazarotène (Zorac®) [69]. Le tazarotène est un dérivé de la vitamine A. Une fois appliqué par voie cutanée, il est rapidement hydrolysé en sa forme active, l'acide tazaroténique, qui se lie sélectivement aux récepteurs nucléaires de l'acide rétinoïque (RAR) exprimés dans l'épiderme humain [70]. En régulant la transcription des gènes impliqués dans le processus pathologique du psoriasis, le tazarotène induit une normalisation de la différenciation des kératinocytes, une diminution de l'hyperprolifération des kératinocytes et des marqueurs de l'inflammation [71].
Les effets indésirables associés au traitement cutané par le tazarotène sont principalement des signes d'irritation de la peau (érythème, prurit, sensation de brûlure) [72].

Les dermocorticoïdes constituent le traitement par voie cutanée de référence contre le psoriasis, en monothérapie, ou en association à la thérapie systémique. Leur efficacité thérapeutique est due à leurs effets vasoconstricteurs, anti-inflammatoires et immunosuppresseurs [73]. Ils agissent par deux mécanismes : génomique et non génomique (**Figure 8**).
L'action génomique passe par l'intermédiaire des récepteurs glucocorticoïdes (GR) intra-cytoplasmiques. Après leur liaison sur les GR, les glucocorticoïdes augmentent la transcription des gènes ayant des fonctions anti-inflammatoires et diminuent la transcription des gènes pro-inflammatoires.
Le mécanisme non génomique permet d'expliquer l'effet rapide des glucocorticoïdes observé dès les premières minutes. Il se fait par l'intermédiaire des récepteurs membranaires et

permet ainsi de moduler l'activité des cellules immunitaires, telles que les monocytes et les lymphocytes T [74].

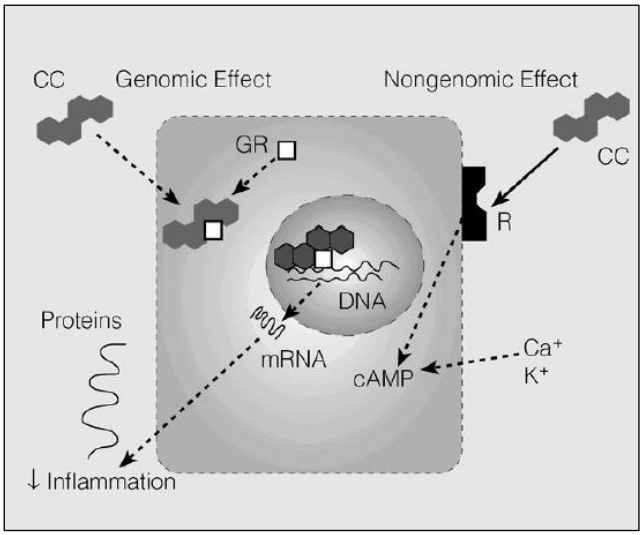


Figure 8. Représentation graphique des actions génomique et non génomique des dermocorticoïdes (CC).

Malgré leur efficacité à atténuer les lésions psoriasiques, les dermocorticoïdes sont recommandés pour une courte période de traitement à cause de leurs effets secondaires cutanés et systémiques. L'atrophie (amincissement) de la peau est l'un des effets indésirables le plus observé. On peut également observer une aggravation d'une infection préexistante à cause de leur effet immunosuppresseur. Les effets secondaires généraux des corticoïdes, lors d'un passage systémique (hypertension, ostéoporose, syndrome de Cushing) sont relativement rares [73].

Quelques exemples des agents topiques utilisés dans le traitement du psoriasis sont décrits dans le **tableau 1** ci-dessous.

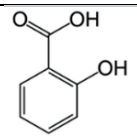
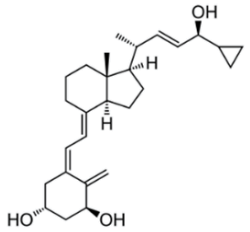
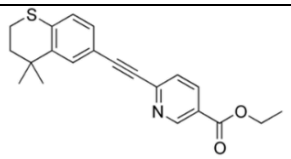
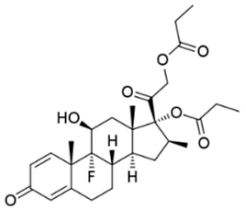
Agents topiques	Structure	Efficacité	Effets indésirables
Acide salicylique		+	+
Calcipotriol		++	+
Tazarotène		+	+
Dipropionate de bétaméthasone		+++	++

Tableau 1. Exemples d'agents topiques utilisés dans le traitement du psoriasis par voie cutanée [75,76].

4.2. Photothérapie

La photothérapie est utilisée pour le traitement des patients en cas de réponse négative aux traitements topiques cutanés.

Elle consiste à irradier le corps par des rayons UVB (290-320 nm) ou UVA (320-400 nm) avec du psoralène (PUVA), un agent photosensibilisant.

Il a été montré que la photothérapie associée aux rétinoïdes améliore l'efficacité anti-psoriasique et réduit la fréquence et la durée du traitement [77].

Cependant, les UVB peuvent induire des effets secondaires aigus, tels que l'érythème, les démangeaisons ainsi que le photo-vieillissement. Bien qu'elle soit efficace, la thérapie PUVA augmente le risque de tous les cancers cutanés, notamment le cancer épidermoïde, lors de son utilisation à long terme [77].

4.3. Thérapie systémique

4.3.1. Thérapie conventionnelle

Une thérapie par voie systémique est recommandée en cas d'absence de réponse à la thérapie par voie cutanée et pour les formes modérées à sévères de psoriasis (surface atteinte > 10% de la BSA ou score PASI > 12). Le méthotrexate (MTX), la ciclosporine, et les rétinoïdes (acitrétine) sont les thérapies systémiques traditionnelles de choix contre le psoriasis. Le fumarate de diméthyle et l'aprémilast sont de nouvelles thérapies récemment approuvées pour le traitement des formes sévères du psoriasis.

Le méthotrexate (voies orale, sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse) est un analogue structural de l'acide folique qui possède des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives efficaces dans le traitement du psoriasis. Il agit par l'inhibition de la dihydrofolate réductase, une enzyme nécessaire à la réduction de l'acide folique en acide tétrahydrofolique. Ce dernier est essentiel à la synthèse d'ADN, et donc à la prolifération cellulaire.

Nausée, leucopénie et hépatotoxicité sont les principaux effets indésirables observés durant un traitement à long terme avec le méthotrexate [78].

La ciclosporine est un agent immunosuppresseur puissant, administrée par voie orale, et utilisée dans le traitement des maladies auto-immunes et lors de la transplantation des organes.

Son effet immunosuppresseur est dû à l'inhibition de la calcineurine. Cette dernière est une phosphatase intracellulaire qui active les facteurs de transcription des gènes codant des cytokines impliquées dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T. Par conséquent, l'inhibition de cette voie entraine une inhibition de la fonction et de la prolifération des lymphocytes T [79].

Cependant, la ciclosporine induit des effets indésirables majeurs à long terme, notamment l'hypertension et la néphrotoxicité [80]. Leur utilisation est donc limitée à de courtes périodes.

Les esters de l'acide fumarique (FAE) possèdent des propriétés immunomodulatrices et anti-inflammatoires. Le fumarate de diméthyle (DMF) (Skilarence®), administré par voie orale, a été récemment approuvé en Europe pour le traitement des cas modérés à sévères de psoriasis. Le mécanisme d'action exact n'est pas très clair, mais l'interaction du DMF avec le glutathion, un tripeptide régissant l'homéostasie du potentiel redox intracellulaire, serait un des mécanismes entrainant une inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription NF-κB (nuclear factor-κB) et par conséquent une inhibition de son activité transcriptionnelle [81]. Cette inhibition entraîne une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1β, IL-6 et TNF, et des chimiokines, telles que MCP-1, CXCL10, CCL4, CXCL2 [82]. Une diminution de l'infiltration des lymphocytes T dans l'épiderme et le derme, ainsi qu'une diminution de l'hyperprolifération de l'épiderme et une normalisation de la kératinisation ont été observées sous traitement par le DMF [81,83].
Les effets indésirables les plus signalés avec les FAE sont les troubles gastro-intestinaux et le rougissement. En plus, une étude clinique a montré la présence d'une leucopénie chez 10% des patients traités par FAE [84].

L'aprémilast (Otezla®), un inhibiteur de la phosphodiesterase-4 (PDE4), inhibe la dégradation de l'AMP cyclique (AMPc), qui est un second messager intracellulaire régulant la réponse inflammatoire. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire causée par l'inhibition de PDE4 déclenche l'activation de la protéine kinase A (PKA), qui active le facteur de transcription CREB (C-AMP Response Element-binding protein) en le phosphorylant, provoquant ainsi la transcription des gènes anti-inflammatoires comme celui de l'IL-10. Par ailleurs, l'aprémilast inhibe la transcription des gènes pro-inflammatoires dépendante de NF-kB, tels que ceux de l'IFN-γ, du TNF, de l'IL-12 et de l'IL-23 [85].
Cependant, malgré son efficacité en clinique, l'aprémilast est associé à certains effets indésirables dont des troubles gastro-intestinaux (nausées et diarrhée), des rhinopharyngites (en raison de leur effet immunosuppresseur) et des céphalées [86].

4.3.2. Thérapie biologique

L'utilisation des agents biologiques dans la prise en charge du psoriasis est la stratégie la plus puissante. Les agents biologiques sont des anticorps monoclonaux bloquants (mAb) ou des

protéines de fusion (FP) avec un fragment Fc d'IgG1 humaine. Ces agents thérapeutiques ciblent une cytokine spécifique ayant un rôle important dans la physiopathologie du psoriasis, notamment le TNF, l'IL-23 et l'IL17, ou un marqueur spécifique de surface participant à l'activation des lymphocytes T.

Cependant, malgré l'efficacité remarquable des thérapies biologiques pour le traitement de psoriasis, leur coût très élevé et leur effet immunosuppresseur (risque augmenté d'infection et de lymphomes) [24] limitent leur utilisation.

Les agents biologiques utilisés pour la prise en charge du psoriasis sont résumés dans le **tableau 2** ci-dessous.

Médicament	Voie d'administration	Agent biologique	Cible	Nom commercial
Alefacept	Intramusculaire	**LFA-3/Fc FP**	**CD2**	**Amevive®** (approuvé aux États-Unis en 2003; retiré du marché en 2011)
Efalizumab	Sous-cutanée	**Anti-CD11a mAb**	**CD11a**	**Raptiva®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2003; retiré du marché en 2009)
Infliximab, Adalimumab, Certolizumab pegol	Intraveineuse (infusion), sous-cutanée, sous-cutanée	**Anti-TNF mAb**	**TNF**	**Remicade®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2006), **Humira®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2008), **Cimzia®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2018)
Etarnercept	Sous-cutanée	**TNF-R/Fc FP**	**TNF**	**Enbrel®** (approuvé en Europe et aux États-Unis en 2004)
Ustekinumab	Sous-cutanée	**Anti-IL-12/-23p40 mAb**	**IL-12/IL-23**	**Stelara®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2009)
Tildrakizumab, Guselkumab, Risankizumab	Sous-cutanée	**Anti-IL-23p19 mAb**	**IL-23**	**Ilumetri®** (Europe) et **Ilumya®**(États-Unis) (approuvés en 2018), **Tremfya®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2017), **Skyrizi®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2019)
Secukinumab, Ixekizumab	Sous-cutanée	**Anti-IL-17A mAb**	**IL-17A**	**Cosentyx®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2015), **Taltz®** (approuvé aux États-Unis et en Europe en 2016)
Brodalumab	Sous-cutanée	**Anti-IL-17RA mAb**	**IL-17RA**	**Kyntheum®** (Europe) et **Siliq®** (États-Unis) (approuvés en 2017)

Tableau 2. Les agents biologiques utilisés pour le traitement du psoriasis [5,87,88]. *IL-2R : IL-2 receptor ; LFA : lymphocyte function-associated antigen ; TNF-R : TNF receptor ; IL-17RA : IL-17A receptor.*

En raison de la nature inflammatoire chronique du psoriasis et de l'absence jusqu'à ce jour de traitement curatif, une thérapie à vie est nécessaire. Malgré l'efficacité des thérapies déjà présentées dans la prise en charge du psoriasis, leurs effets indésirables limitent leurs utilisations à long terme. Ainsi, le développement de nouvelles molécules est primordial afin de limiter ces inconvénients et ainsi améliorer la qualité de vie des patients.

5. Dendrimères

En fonction de leur architecture, les polymères peuvent être globalement classés en : polymères linéaires, polymères ramifiés d'une façon aléatoire et les polymères ramifiés d'une façon symétrique [89]. Les dendrimères font partie des polymères symétriquement hyper-ramifiés dont les premiers ont été décrits et synthétisés par les groupes de Vögtle et Tomalia [90,91]. Les dendrimères (du grec "*dendros*": arbre) sont des molécules synthétiques arborescentes formées d'un cœur central au niveau duquel sont rattachées des branches d'une manière répétitive et qui se terminent par des groupements fonctionnels de surface (**Figure 9**). La taille des dendrimères est en général de l'ordre de quelques nanomètres (2 à 3 nm) et augmente de 1 nm, environ, avec chaque génération supplémentaire de branches [92]. La génération d'un dendrimère est déterminée par le nombre de séries de branches partant du cœur jusqu'à la surface. L'addition de ces branches se fait à l'aide des points de divergence qui permettent d'une part l'ancrage des branches au niveau du cœur et d'autre part l'ajout d'une série de branches.

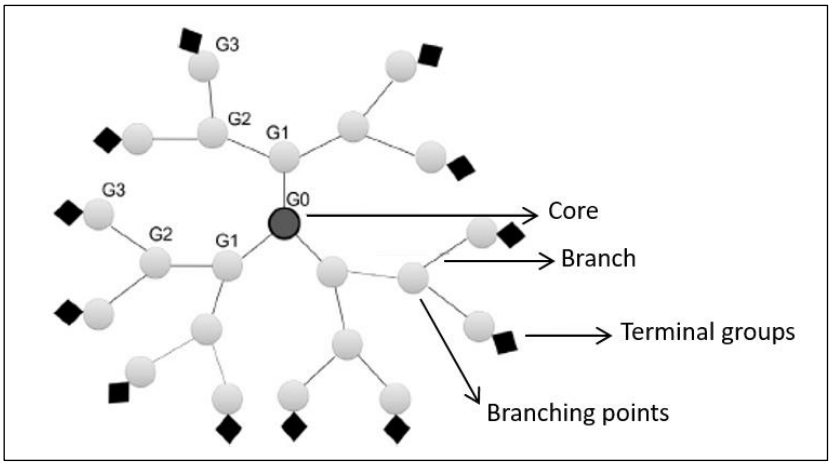


Figure 9. Représentation schématique de la structure d'un dendrimère de G3. *Adaptée de [93].*

Les dendrimères se sont révélés prometteurs dans diverses applications biologiques, y compris le diagnostic, la vectorisation des agents thérapeutiques (par voies intraveineuse, nasale, oculaire, orale et cutanée), la transfection, la vaccination et l'hormonothérapie [93,94]. De plus, les dendrimères ont également montré des propriétés antivirales, antimicrobiennes et anti-inflammatoires intrinsèques [95–98]. Ces larges domaines d'applications de dendrimères sont dus à leur taille nanométrique, leur structure globulaire précise et parfaitement définie (pour les dendrimères les plus petits), leur mono-dispersité, la haute densité de groupements fonctionnels de surface, qui permettent de créer des interactions multivalentes plus fortes avec les cibles thérapeutiques, leur réactivité et leur solubilité élevée [99]. Les dendrimères les plus largement utilisés sont des dendrimères de type Poly(AMidoAMine) (PAMAM) et de type Poly(PropyleneImine) (PPI).

Parmi leur large domaine d'application, les dendrimères ont montré une efficacité importante dans le traitement de maladies inflammatoires. D'une part, les dendrimères ont suscité beaucoup d'intérêt pour l'administration contrôlée de médicaments anti-inflammatoires, notamment par voie cutanée, et d'autre part, certains d'entre eux ont démontré des propriétés anti-inflammatoires intrinsèques.

5.1. Dendrimères : Systèmes d'administration cutanée de médicaments anti-inflammatoires

En raison de la présence de cavités internes dans l'architecture hyper-ramifiée des dendrimères et de la possibilité de contrôler leur taille et leurs propriétés de surface, les dendrimères ont fait l'objet d'une attention particulière pour encapsuler de nombreux principes actifs. En effet, les principes actifs peuvent être encapsulés dans la cavité hydrophobe interne du dendrimère, complexés à la surface par des interactions électrostatiques ou conjugués de manière covalente aux différents groupements de surface [100] (**Figure 10**).

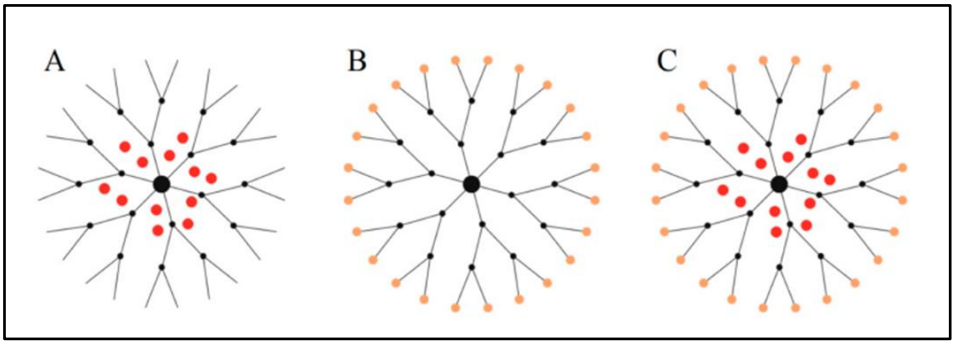


Figure 10. Principales stratégies de vectorisation de molécules médicamenteuses par les dendrimères. *La substance médicamenteuse peut être encapsulée dans la cavité interne du dendrimère (rouge) (A), liée de manière électrostatique ou covalente aux groupements de surface (orange) (B), ou les deux simultanément (C). Issu de [101].*

Malgré la présence de nombreuses études montrant que les dendrimères, notamment les PAMAM cationiques, sont efficaces pour l'amélioration de la pénétration cutanée de substances médicamenteuses, les mécanismes fondamentaux responsables des interactions substance médicamenteuse-dendrimère-peau restent peu connus. Des études ont montré que les mécanismes par lesquels les dendrimères améliorent la perméation cutanée semblent être liés à leur interaction avec les têtes polaires des lipides cutanés intercellulaires, et par la suite à l'altération des bicouches lipidiques du *stratum corneum* [102,103]. De plus, Hong *et al.* ont démontré que les dendrimères cationiques induisent des défauts ou des trous transitoires à l'échelle nanométrique sur les bicouches lipidiques et sur les membranes cellulaires [104,105]. Les dendrimères permettent également de moduler les propriétés

physicochimiques de substances médicamenteuses, en améliorant leur solubilité et leur stabilité, ce qui augmente ainsi leur diffusion cutanée [89].

5.1.1. Les dendrimères de type PAMAM

Les dendrimères PAMAM présentent un cœur central diaminoéthane et des branches de type **P**oly(**AM**ido**AM**ine). Ils peuvent présenter différents groupements terminaux qui comprennent des fonctions amine (**Figure 11**), groupes hydroxyle et groupes carboxyle [93].

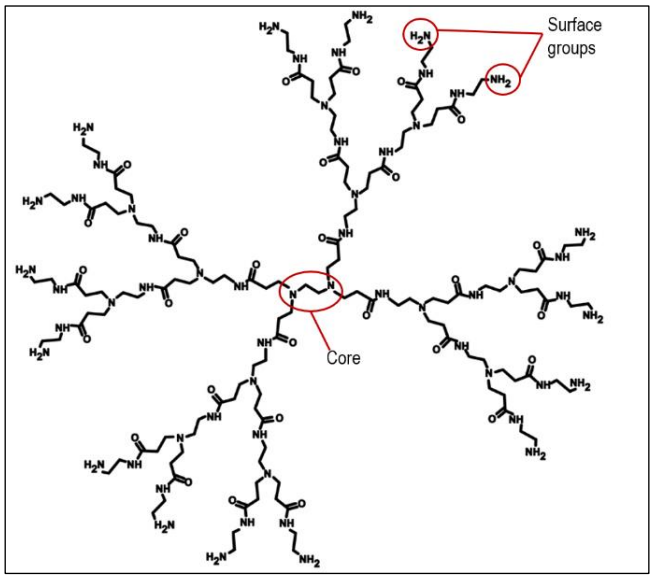


Figure 11. Structure chimique du dendrimère G2-PAMAM portant des fonctions amine à la surface.

L'amélioration de la perméation cutanée de substances médicamenteuses est dépendante de la taille moléculaire (la génération) des dendrimères, et de leur charge de surface. En effet, Yang *et al.* ont montré que la pénétration épidermique des PAMAM de faible génération (G2-NH_2) après 24h était 5,8 fois plus élevée que celle des plus grandes générations (G4-NH_2), indiquant que la pénétration des dendrimères cationiques à travers la peau est inversement liée à leur masse moléculaire [106]. D'autres études ont également montré que les PAMAM cationiques (groupements de surface NH_3^+), en comparaison avec les PAMAM anioniques (groupements de surface COO^-) et neutres (groupements de surface OH) au pH physiologique, et de faible génération sont plus efficaces pour améliorer la pénétration cutanée de médicaments hydrophiles dans les couches profondes de la peau [102,107]. Ceci pourrait être

attribué à la forte affinité de molécules cationiques pour les domaines intercellulaires chargés négativement [108].

En ce qui concerne la cytotoxicité des dendrimères, Il a été montré qu'en général, elle dépend de la génération du dendrimère et de la nature des groupements fonctionnels de surface (anionique, neutre et cationique). Il a été montré que les dendrimères de générations élevées et portant à la surface un nombre accru de groupements de charges positives entraînent la cytotoxicité la plus élevée [101,109]. Ces effets toxiques sont souvent observés en raison de leur forte interaction avec les constituants biologiques chargés négativement tels que les domaines lipidiques intercellulaires, les membranes biologiques et les acides nucléiques [101].

En 2010, Borowska *et al.* ont évalué la capacité des dendrimères G3-PAMAM et G4-PAMAM, portant à la surface 32 et 64 groupements amine respectivement, à améliorer l'administration cutanée du 8-méthoxypsoralène (8-MOP), le psoralène principalement utilisé en PUVA. Des études de pénétration *in vitro* ont montré que les dendrimères G3-PAMAM et G4-PAMAM ont permis d'améliorer l'administration cutanée avec passage transdermique du 8-MOP [110]. Ce même groupe a réalisé, en 2012, un essai de pénétration *in vivo* sur la peau de rat et a également montré une meilleure pénétration dans les couches profondes de la peau (épiderme viable et derme) du 8-MOP encapsulé par rapport au 8-MOP non encapsulé. Cette formulation topique du 8-MOP pourrait donc aider à améliorer l'efficacité de la PUVA et à réduire les effets secondaires associés au traitement par voie orale du 8-MOP, notamment les troubles gastro-intestinaux [111].

Chauhan *et al.* ont évalué l'efficacité de 3 types de dendrimères PAMAM (G4-NH_2, G4-OH et G4.5-COOH) pour l'administration percutanée de l'indométacine, un AINS (anti-inflammatoire non-stéroïdien) lipophile, à travers la peau du rat *in vitro* et *in vivo* [112]. Les études *in vitro* ont montré que la pénétration de l'indométacine à travers la peau augmente progressivement avec la concentration des dendrimères PAMAM. Dans cette étude, le meilleur passage transcutané de l'indométacine a été obtenu avec le dendrimère G4-NH_2 à la concentration la plus élevée. Cette amélioration de la pénétration percutanée de l'indométacine peut s'expliquer par l'augmentation de la solubilité du médicament dans les dendrimères PAMAM, qui est dépendante de la concentration et de la génération des

dendrimères PAMAM [113,114]. En effet, les auteurs ont montré que la meilleure solubilité de l'indométacine est obtenue avec le dendrimère G4-NH_2 qui est due, d'une part, à l'interaction électrostatique entre les fonctions amine terminales du dendrimère et le groupement carboxyle de l'indométacine, et d'autre part, à l'encapsulation du médicament dans les cavités internes du dendrimère. Cette amélioration de la solubilité de l'indométacine permet donc d'améliorer son coefficient de partage avec le *stratum corneum* et de favoriser par la suite sa diffusion dans la peau. Les études *in vivo* sur la peau de rat ont également montré une concentration plasmatique maximale de l'indométacine, lorsqu'elle a été complexée avec les PAMAM, significativement plus élevée que celle de la forme libre (G4-NH2 > G4-OH > G4.5-COOH). Cette étude pharmacocinétique a été suivie par une étude pharmadynamique évaluant les propriétés anti-inflammatoires du complexe PAMAM-indométacine sur un modèle inflammatoire *in vivo* induit chez le rat. Le complexe PAMAM-indométacine a également montré son efficacité à inhiber d'une façon significative l'inflammation induite chez le rat (G4-NH2 > G4-OH > G4.5-COOH) par rapport à l'indométacine sous forme libre [112].

Yiyun *et al.* ont évalué la pénétration percutanée d'autres AINS lipophiles, le kétoprofène et le diflunisal, après leur complexation avec les PAMAM G5-NH_2, à travers la peau du rat *in vitro* et *in vivo*. Les essais *in vitro* et *in vivo* ont montré que le passage transcutané du kétoprofène et de diflunisal a augmenté significativement par rapport à celui du kétoprofène et de diflunisal en suspension sous forme libre. Cette amélioration du passage transcutané des AINS, comme déjà observé avec l'indométacine, est due à une meilleure solubilité aqueuse des AINS par les dendrimères [115,116]. Une étude *in vivo*, faite sur un modèle murin de crampes abdominales induits par l'injection de l'acide acétique, a permis de confirmer l'efficacité des complexes PAMAM-AINS à induire un effet analgésique plus précoce et prolongé par rapport aux AINS sous forme libre [117].

5.1.2. Les dendrimères de type PPI

Les dendrimères appelés PPI sont basés sur un cœur diaminobutane et des branches de type Poly(PropylèneImine). Les dendrimères PPI ont été testés afin d'améliorer la pénétration cutanée de dithranol (DIT), un agent anti-psoriasique, et simultanément de contourner ses

effets indésirables, notamment l'instabilité du DIT en présence de la lumière et l'irritation cutanée. Dans cette étude, le DIT a été encapsulé dans des dendrimères de type G5-PPI portant à la surface des groupements NH_2 (DIT-PPI) (**Figure 12**).

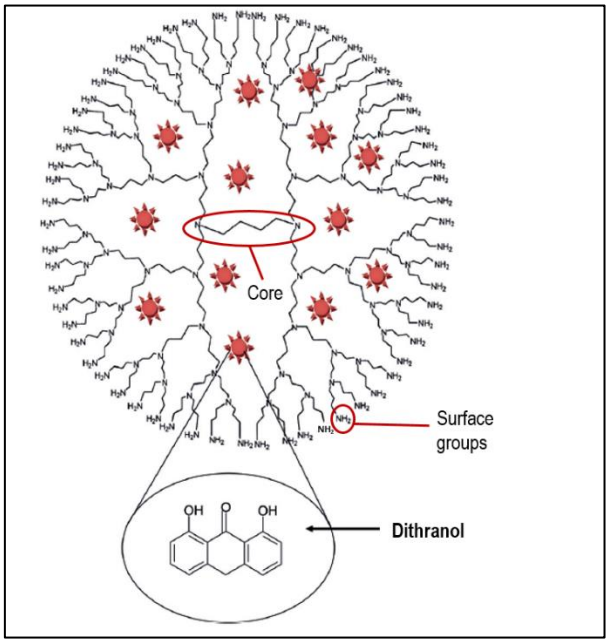


Figure 12. Schéma montrant le système DIT-PPI. *Adapté de [118].*

Agrawal *et al.* ont évalué l'efficacité du dendrimère PPI pour l'administration par voie cutanée de DIT en termes d'encapsulation, de perméation et de potentiel d'irritation cutanée. Le pourcentage d'encapsulation du DIT s'est révélé être dépendant du pH avec une encapsulation maximale à pH acide. Selon les auteurs, ceci peut être attribué à la variation de la protonation des fonctions amine terminales en fonction du pH et ainsi à la conformation du dendrimère PPI qui semble être plus relâchée en milieu acide alors qu'elle est probablement plus compacte en milieu neutre et alcalin, ce qui pourrait entraver l'encapsulation. L'essai de perméation *in vitro* sur la peau de rat a montré que le pourcentage de perméation cutanée de DIT encapsulé dans le PPI est significativement plus élevé (95%) que celui du DIT non encapsulé (34%). Le système DIT-PPI a également montré une moindre irritation cutanée par rapport à la solution de DIT. Les résultats de cette étude suggèrent donc que le PPI pourrait être utilisé pour améliorer la pénétration cutanée d'autres actifs et contrôler leur libération cutanée [118].

5.1.3. Les oléodendrimères

Une nouvelle classe de dendrimères de type Poly(propylETherImine) (PETIM) de G1 et de G2 à base d'acide oléique, appelés oléodendrimères, ont été synthétises afin d'évaluer leur efficacité pour améliorer la pénétration percutanée du diclofénac de sodium (AINS) [119] (**Figure 13**). Ces oléodendrimères sont formés par l'association de deux blocs, les dendrons (les parties identiques du dendrimère branchées au niveau du cœur) de type PETIM G1 ou G2 et l'acide oléique (promoteur de pénétration). Ce dernier est choisi car il a montré, dans une étude antérieure, une amélioration de la perméation cutanée du diclofénac de sodium par rapport à l'utilisation d'autres acides gras [120]. Les oléodendrimères ont montré leur capacité a augmenté de 3,3 et de 1,8 fois le passage transdermique du diclofénac de sodium par rapport à celui du diclofénac de sodium seul et en association avec l'acide oléique, respectivement [119].

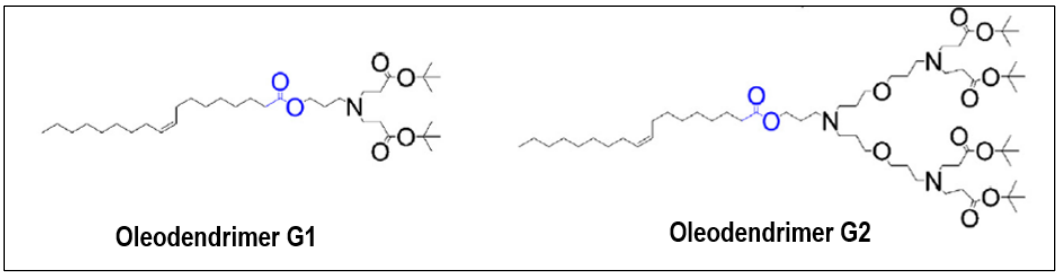


Figure 13. Structure des oléodendrimères. *Le dendron de type PETIM est lié à l'acide oléique par une liaison ester (en bleu) [119].*

5.2. Dendrimères présentant des propriétés anti-inflammatoires

En plus de leur efficacité dans la vectorisation des médicaments anti-inflammatoires, certains dendrimères ont démontré des propriétés thérapeutiques anti-inflammatoires par eux-mêmes.

5.2.1. Les dendrimères PAMAM et autres types de dendrimères

En 2004, Shaunak et *al.* ont évalué *in vitro et in vivo* les propriétés anti-inflammatoires et anti-angiogéniques de deux dendrimères PAMAM. Les dendrimères utilisés sont des PAMAM de génération 3,5 portant à la surface 64 groupements COOH, dont neuf avaient été conjugués

à des résidus de glucosamine ou à des résidus de glucosamine-6-sulfate. Les études *in vitro* ont montré que le dendrimère conjugué à la glucosamine présente une activité anti-inflammatoire alors que celui conjugué à la glucosamine-6-sulfate présente une activité anti-angiogénique. Une étude *in vivo*, sur un modèle de formation excessive de tissu cicatriciel chez le lapin après une chirurgie expérimentale de glaucome, a été menée afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de la combinaison des deux dendrimères. Chez les animaux traités avec une combinaison du dendrimère glucosamine et du dendrimère glucosamine 6-sulfate, le succès de la chirurgie à long terme a augmenté de 30% à 80%, par la réduction d'une façon significative de la production de tissu cicatriciel après chirurgie. Ces résultats montrent que la combinaison de dendrimère glucosamine et de dendrimère glucosamine 6-sulfate agit en synergie pour inhiber les stades précoces des réponses pro-inflammatoires et pro-angiogéniques [121].

En se basant sur l'étude de Chauhan *et al.* en 2003 qui a montré que le complexe PAMAM-indométacine améliore l'activité anti-inflammatoire de l'indométacine en augmentant sa solubilité aqueuse et ainsi en contrôlant sa libération, ce même groupe a mené une autre étude pharmacodynamique sur le modèle d'œdème de la patte induit par la carraghénane pour comparer l'activité anti-inflammatoire de l'indométacine libre à celle du complexe G4-NH_2-Indométacine, administré par voie intrapéritonéale, au cours du temps. Ce complexe a montré une activité anti-inflammatoire significativement plus élevée que celle de l'indométacine libre à tous les temps de post-administration (1, 2, 4, 5 et 8h). Cependant, il a également été noté que le dendrimère G4-NH_2 seul présente une activité anti-inflammatoire significative et inattendue [95]. En évaluant l'effet des groupements de surface sur l'activité anti-inflammatoire des dendrimères PAMAM, le dendrimère G4-OH a montré une activité anti-inflammatoire plus ou moins similaire à celle de G4-NH_2, alors que le dendrimère G4.5-COOH s'est révélé moins actif. Cet effet anti-inflammatoire de G4-NH_2, administré par voie intrapéritonéale, a été validé sur d'autres modèles d'inflammation chez le rat. En effet, en utilisant le modèle de granulome provoqué par l'implantation sous-cutanée d'un granule de coton chez le rat, le G4-NH_2 a également montré une activité anti-inflammatoire significativement plus élevée que l'indométacine seule. De même, dans le modèle de l'arthrite induite par l'adjuvant de Freund, le G4-NH_2 a induit une inhibition de l'inflammation significativement plus élevée que l'indométacine [95].

Des nanoparticules d'argent (AgNPs), possèdant des propriétés anti-inflammatoires, ont été conjuguées avec un dendrimère de 5ème génération, formant le nanocomposite de dendrimère d'argent (Ag-DNC) (**Figure 14**). Les auteurs ont montré que le dendrimère seul présente des propriétés anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. En effet, dans le modèle d'inflammation *in vitro* induit par le LPS, le dendrimère seul a significativement réduit la production de cytokines pro-inflammatoires et a amélioré l'effet anti-inflammatoire des AgNPs lorsqu'ils sont utilisés en association (Ag-DNC). Dans l'étude *in vivo*, sur un modèle de cicatrisation de brûlures chez la souris, un effet synergique similaire a été observé entre les AgNPs et le dendrimère avec un temps de guérison plus rapide que les AgNPs et le dendrimère lorsqu'ils sont utilisés séparément [122].

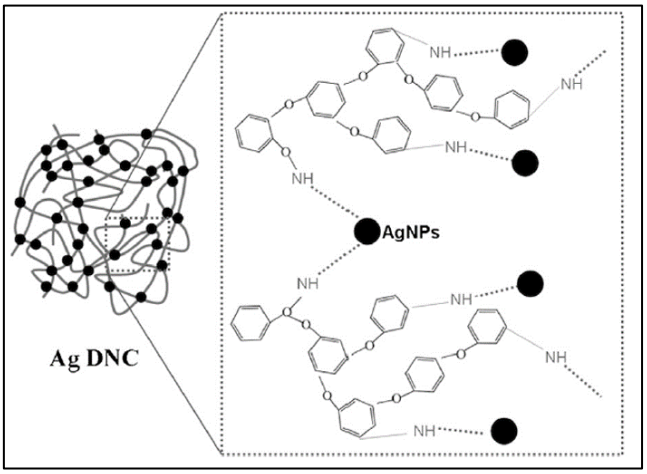


Figure 14. Représentation schématique des chaines du dendrimère conjuguées aux nanoparticules d'argent (Ag-DNC) [122].

Enfin, un dendrimère de type PEO (Poly(Ethylene Oxide), de 2ème génération, à base de cœur cyclo-triphosphazène, et présentant des terminaisons sulfate ($O\text{-}SO_3$) greffées sur des terminaisons saccharidiques a été synthétisé (**Figure 15**). L'activité anti-inflammatoire du dendrimère PEO sulfaté a été évaluée dans un modèle inflammatoire murin induit par l'injection intra-péritonéale du thioglycolate. Le dendrimère PEO sulfaté a significativement réduit le recrutement de neutrophiles de 86% et de macrophages de 60% chez les souris traitées par rapport à celles non traitées avec le dendrimère PEO sulfaté. Cette activité anti-inflammatoire est due au blocage de la L-sélectine, qui est un polysaccharide exprimé à la surface des leucocytes permettant leur adhésion aux cellules endothéliales via des

interactions multivalentes dépendantes des groupements sulfate. Cette inhibition de la sélectine par le dendrimère PEO sulfaté se traduit donc par une inhibition de l'extravasation des leucocytes à travers la barrière endothéliale vers les sites d'inflammation [123].

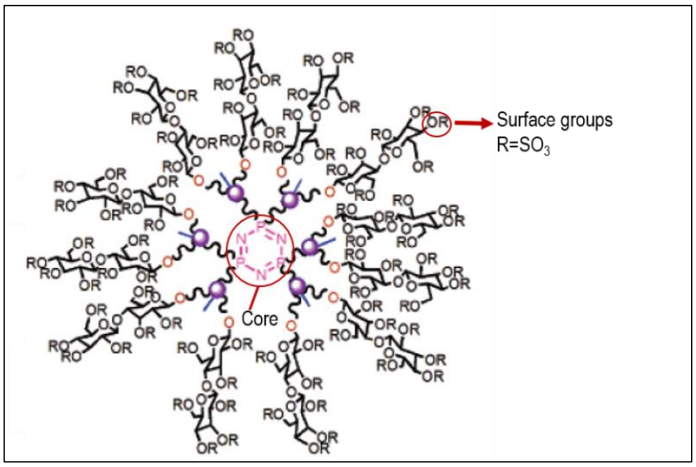


Figure 15. Structure du dendrimère PEO polysulfaté de 2ème génération. *Adaptée de [123].*

5.2.2. Le dendrimère phosphoré à surface AzaBisPhosphonate ABP

En 2006, des dendrimères de type Poly(PhosphorHydrazone) (PPH), avec un cœur de type cyclo-triphosphazène, ont été synthétisés par nos collaborateurs chimistes au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC, groupe de A.M. Caminade) [124]. Parmi ceux-ci, un dendrimère de première génération, nommé le **dendrimère ABP** (**Figure 16**), pour ses 12 groupements fonctionnels terminaux AzaBisPhosphonate, a montré des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices envers les cellules immunitaires, notamment les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T [125,126].

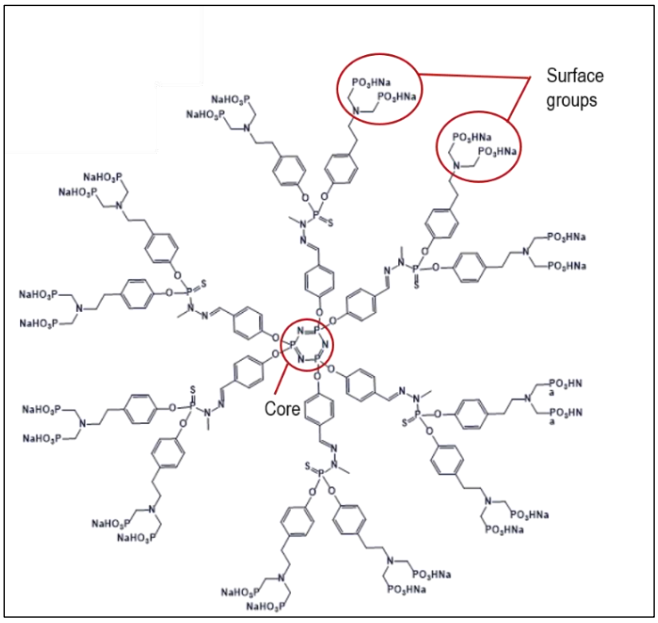


Figure 16. Structure du dendrimère ABP. *Masse molaire de 5820 g/mol.*

Dans cette partie, je présenterai plus en détail les propriétés anti-inflammatoires du dendrimère ABP validées *in vitro* sur les cellules immunitaires et *in vivo* dans des modèles murins de maladies inflammatoires.

5.2.2.1. Effet anti-inflammatoire sur cellules immunitaires

Interaction avec les monocytes/macrophages

En 2006, le premier effet immuno-modulateur du dendrimère ABP a été exploré sur les monocytes/macrophages humains. En effet, le dendrimère mis en culture avec des PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) a montré sa capacité à se lier spécifiquement en quelques secondes aux monocytes humains, suivie d'une internalisation rapide et d'une activation morphologique, caractérisée par une augmentation de la taille et de la granulosité des monocytes, et phénotypique, caractérisée par la diminution de l'expression des marqueurs de surface CD14 et HLA-DR [124,127]. Cet effet intéressant du dendrimère ABP sur les monocytes/macrophages, a été par la suite confirmé par une analyse transcriptomique des monocytes humains activés par le dendrimère ABP en comparaison avec des monocytes non-activés. Cette étude montre clairement que le dendrimère ABP induit une activation anti-

inflammatoire des monocytes/macrophages. En effet, il induit une augmentation de l'expression des gènes anti-inflammatoires, tels que ceux codant l'IL-10, le MRC1 (Mannose receptor C-type 1), l'IL-1RA (Interleukin-1 Receptor Antagonist), la CCL18, et une diminution de l'expression des gènes pro-inflammatoires, tels que ceux codant le CXCR4 (récepteur de la CXCL12) et la molécule d'adhésion LFA-1 impliquée dans le recrutement des leucocytes dans le tissu inflammatoire [98].

Ensuite, en 2014, nos équipes ont évalué l'effet immuno-modulateur du dendrimère ABP sur les monocytes/macrophages *in vitro* dans des conditions pro-inflammatoires. Dans cette étude, les monocytes ont été pré-incubés pendant 1 heure avec le dendrimère ABP, puis ont été orientés vers un phénotype pro-inflammatoire en les stimulant avec du LPS et d'IFN-γ. Les résultats montrent que le dendrimère ABP prévient l'inflammation en dirigeant les monocytes vers un phénotype anti-inflammatoire. En effet, le dendrimère ABP inhibe la production du TNF et de l'IL-12 par les monocytes et diminue d'une façon significative leur sécrétion de l'IL-1β et de l'IL-23 [128].

Interaction avec les cellules dendritiques (DC)

L'activité immuno-modulatrice du dendrimère ABP ne se limite pas uniquement aux monocytes/macrophages. En effet, l'effet immunomodulateur du dendrimère ABP a également été évalué sur des DC dérivées de monocytes *in vitro*, en présence de GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) et d'IL-4, qui sont orientées ensuite, comme les monocytes, vers un état pro-inflammatoire. Une activation anti-inflammatoire des cellules DC a été observée en présence du dendrimère ABP. Cela a été montré par la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire tolérogénique IL-10 et par la diminution significative de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, TNF et IL-12. Le dendrimère ABP inhibe également la maturation des DC comme montré par la diminution de l'expression de molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Ces molécules de co-stimulation représentent le second signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T après la liaison de leur TCR à l'antigène présenté par les DC [128].

Interaction avec les lymphocytes T

En plus de l'activation anti-inflammatoire des monocytes/macrophages et des DC, le dendrimère ABP exerce ses effets anti-inflammatoires envers une autre population immunitaire, les lymphocytes T. En effet, le dendrimère ABP est capable d'inhiber la

prolifération des lymphocytes T CD4 $^{+}$ et CD8^{+} humains pro-inflammatoires *in vitro*, sans affecter leur viabilité [129]. De plus, il a été montré que les monocytes activés par le dendrimère ABP promeuvent des cellules T CD4^{+} productrices d'IL10, qui ont des propriétés immuno-régulatrices et anti-inflammatoires [98]. Cet effet a également été observé *in vivo* dans un modèle inflammatoire de la sclérose en plaques, qui sera présenté plus en détail dans la section **5.2.2.2**, où les cellules présentatrices de l'antigène (monocytes/macrophages et DC) traitées par le dendrimère ABP favorisent la différenciation des lymphocytes T CD4^{+} présentant un phénotype inflammatoire, vers un phénotype anti-inflammatoire par la production de l'IL-10 [130].

En résumé, ces travaux de l'équipe montrent que le dendrimère ABP a une activité anti-inflammatoire en promouvant la production d'IL-10. Cette cytokine anti-inflammatoire est produite directement par les monocytes/macrophages activés par le dendrimère. Dans un deuxième temps, les monocytes/macrophages anti-inflammatoires vont induire la différenciation des cellules T CD4^{+} productrices d'IL-10 [98].

Les différents effets immuno-modulateurs exercés par le dendrimère ABP envers différentes sous-populations de cellules immunitaires mononucléaires humaines du sang périphérique sont résumés dans la **figure 17** ci-dessous.

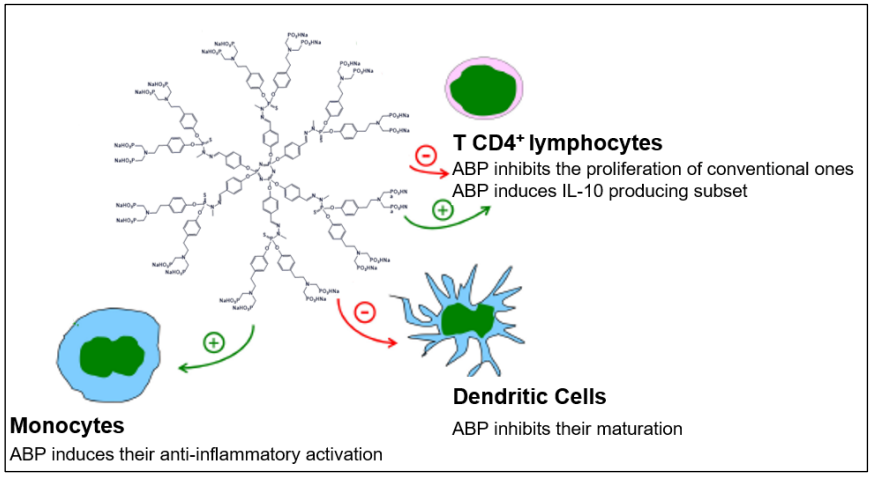


Figure 17. Effets anti-inflammatoires du dendrimère ABP sur différents types de cellules immunitaires. *Adaptée de [126].*

5.2.2.2. Effet dans les modèles précliniques de maladies inflammatoires

Ces effets anti-inflammatoires observés *in vitro* sur différentes populations immunitaires ont pu être testés par la suite à des modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques, et de maladies inflammatoires aigues, l'uvéite.

Modèles murins de la Polyarthrite Rhumatoïde (PR)

La PR est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation articulaire chronique résultant d'un dérèglement du système immunitaire. En 2011, le potentiel thérapeutique du dendrimère ABP a été évalué sur un modèle murin de la PR humaine, le modèle d'arthrite spontanée IL-1RA KO [131]. Nos équipes ont montré que le dendrimère ABP, administré par voie intraveineuse à la dose de 1 et 10 mg/kg/semaine pendant 12 semaines, supprime totalement l'arthrite (score arthritique ramené à zéro) au bout de 6 semaines de traitement (**Figure 18**). D'une part, cette suppression de l'arthrite s'accompagne de la diminution des taux de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF, IL-6 et IL-17) et des métalloprotéinases matricielles (MMP-3 et MMP-9, responsables de la dégradation du cartilage), dans le sérum de souris IL1-RA KO. Contrairement à la membrane synoviale des souris arthritiques non traitées, la membrane synoviale des souris arthritiques traitées au dendrimère ABP ne présente ni hyperplasie, ni infiltrat inflammatoire constitués par les PNN, les macrophages, et les lymphocytes. Ces résultats montrent que le dendrimère ABP exerce un effet envers ces populations immunitaires *in vivo.* D'autre part, cette suppression de l'arthrite est également due à l'inhibition de la formation des ostéoclastes, et par conséquent de la résorption osseuse. Nos équipes ont montré que le dendrimère ABP inhibe la différenciation des ostéoclastes *in vitro* à partir des monocytes et des DC [131]. Une autre étude a été réalisée par la suite pour déterminer si le dendrimère ABP pourrait être administré par une autre voie d'administration systémique, telle que la voie orale. Lorsque le dendrimère ABP est administré par voie orale à la dose de 10 mg/kg/semaine pendant 12 semaines, l'arthrite est également complètement supprimée chez les souris au bout de 11 semaines (**Figure 18**). Cela montre que le dendrimère ABP administré par voie orale n'est pas dégradé dans le tractus gastro-intestinal et que son effet est retardé par rapport à celui administré par voie intraveineuse [132].

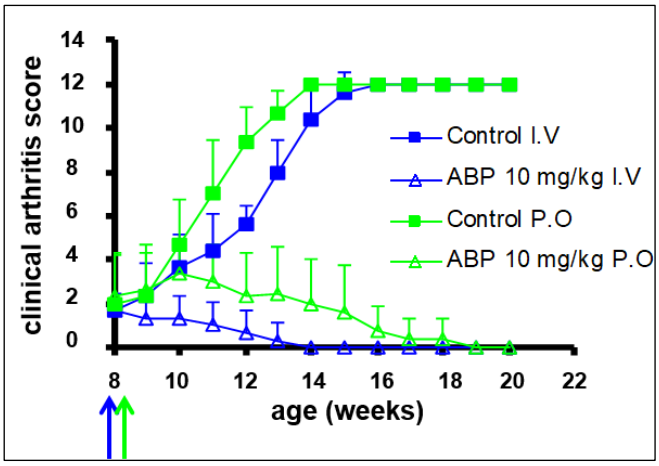


Figure 18. Inhibition de l'arthrite par le dendrimère ABP chez les souris IL-1RA KO. *Le dendrimère a été administré par voie intraveineuse (I.V.) ou par voie orale (P.O.) à la dose de 10 mg/kg/semaine à partir de l'âge de 8 semaines. Le score clinique (0 à 3) a été évalué sur chaque patte. Le score clinique représenté correspond au score arthritique cumulatif des 4 pattes (0 à 12) [126].*

En outre, cet effet thérapeutique du dendrimère ABP a été validé dans un autre modèle de la PR, le modèle d'arthrite induite au sérum K/BxN chez des souris naïves. Ce sérum contient des auto-anticorps qui permettent d'induire une inflammation aigue et rapide chez les souris. Le dendrimère ABP administré à la dose de 10 mg/kg par voie intraveineuse, suivant un protocole prophylactique ou thérapeutique, réduit également les signes cliniques de l'arthrite. Ces études montrent que le dendrimère ABP, en inhibant à la fois l'inflammation et la résorption osseuse, représente un candidat-médicament prometteur pour le traitement de la PR [131].

Modèle murin de la Sclérose en Plaques

La sclérose en plaques est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central (SNC), caractérisée par la présence des lymphocytes T $CD4^+$ auto-réactifs participant à la démyélinisation des fibres nerveuses et aux lésions axonales. En 2015, en se basant sur les effets anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo* du dendrimère ABP, nos équipes, en collaboration avec l'équipe de R. Liblaud et A. Saoudi au CPTP, ont évalué son effet dans un modèle murin de la sclérose en plaques, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Ce modèle est induit par l'injection d'un peptide dérivé de la glycoprotéine oligodendrocytaire de la myéline (MOG) et de la toxine pertussique afin de provoquer chez les souris une réaction auto-immune dirigée contre la myéline du SNC. Le dendrimère ABP administré par voie intraveineuse à la dose de 10 mg/kg tous les 3 jours ou toutes les semaines empêche le

développement de la maladie (en prophylaxie) et inhibe sa progression (en curatif, **Figure 19**). Dans ce modèle, le dendrimère ABP est aussi efficace que le Fingolimod, traitement standard pour les formes très actives de sclérose en plaques rémittente-récurrente. Cet effet thérapeutique important du dendrimère ABP est dû, d'une part, à la diminution de l'activité des cellules présentatrices de l'antigène au niveau de la périphérie, et d'autre part à la diminution de l'infiltration des lymphocytes T auto-réactifs au niveau du SNC. De plus, cette étude a démontré que le dendrimère ABP en ciblant les cellules présentatrices de l'antigène, et en diminuant leur activité, diminue la production des cytokines pro-inflammatoires de type Th1 et Th17 produites par les lymphocytes T $CD4^+$ auto-réactifs et favorise leur différenciation en lymphocytes T $CD4^+$ immunomodulateurs producteurs d'IL-10 [130].

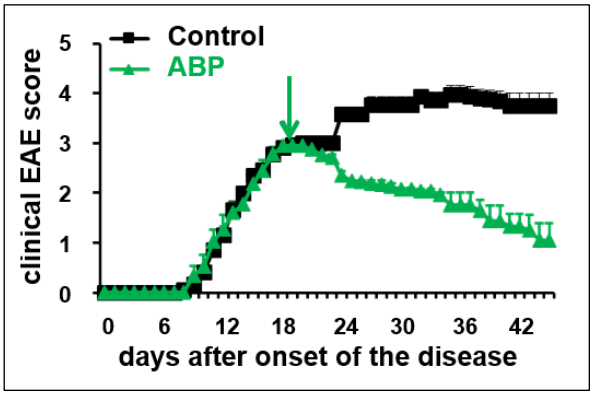


Figure 19. Le dendrimère ABP inhibe la progression de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez les souris. *Le dendrimère ABP a été administré par voie intraveineuse à la dose de 10 mg/kg tous les 3 jours à partir du jour 18 (après l'induction de la maladie). Score clinique allant de 0 à 5 [126].*

<u>*Modèle murin de l'uvéite*</u>

Enfin, nos équipes ont évalué l'activité anti-inflammatoire du dendrimère ABP, administré cette fois-ci par voie loco-régionale, dans un modèle inflammatoire aigu d'uvéite induite par l'injection systémique d'endotoxine bactérienne (LPS, LipoPolySaccharide) chez le rat. L'administration intra-vitréenne du dendrimère ABP à la dose de 2 µg/œil réduit significativement l'inflammation oculaire chez les rats atteints d'uvéite (**Figure 20**) par la production systémique d'IL-10, probablement en ciblant les monocytes/macrophages. Cet

effet anti-inflammatoire du dendrimère ABP est d'ailleurs comparable à celui de la dexaméthasone, qui est le traitement standard de l'uvéite [133].

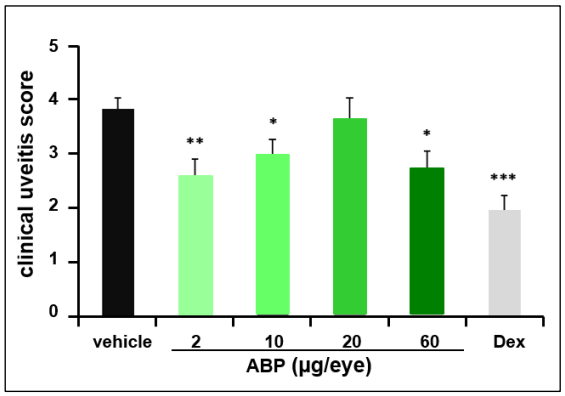


Figure 20. Le dendrimère ABP réduit significativement l'inflammation oculaire induite chez le rat quand administré par voie intra-vitréenne en protocole préventif. *L'activité anti-inflammatoire d'ABP à des doses comprises entre 2 et 60 µg/œil a été comparée à celle de la dexaméthasone (Dex) à la dose de 20 µg/œil. Le score clinique d'uvéite (0 à 5) a été évalué après 24 heures de l'induction de la maladie (pic de la maladie). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ par rapport au véhicule (NaCl 0.9%) [126].*

Ces études *in vivo* montrent d'une façon concluante que le dendrimère ABP est un candidat-médicament pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques ou aiguës.

5.2.2.3. Relation entre la structure chimique et les propriétés biologiques d'ABP

Il a été démontré que ces propriétés biologiques et thérapeutiques innovantes du dendrimère ABP sont étroitement liées à plusieurs paramètres structuraux. Je présenterai par la suite l'influence de la structure interne, de la nature des fonctions de surface, de leur densité et de la conformation tridimensionnelle du dendrimère sur l'activité anti-inflammatoire d'ABP.

D'abord, l'activité antiarthritique du dendrimère ABP chez la souris a été comparée à deux autres dendrimères. Le premier dendrimère présente une structure similaire à celle d'ABP (type PPH) mais les groupements de surface AzaBisPhosphonate ont été remplacés par des groupements **A**za**M**ono**P**hosphonate, d'où le nom AMP. Le second est un dendrimère de la famille de PPI, portant à la surface les mêmes fonctions de surface qu'ABP. Seul le dendrimère ABP a démontré une efficacité thérapeutique *in vivo,* les dendrimères AMP et PPI étaient

inactifs [131]. Une autre étude *in vitro* menée sur monocytes humains a également montré que le remplacement des groupements ABP de surface par des groupements carboxyle (dendrimère **A**za**B**is**C**arboxylate, ABC) rend le dendrimère inactif [127,134]. Ces études permettent de montrer que la structure interne ainsi que la nature des fonctions de surface sont des éléments cruciaux pour la bio-activité du dendrimère.

Ensuite, nos équipes ont évalué l'influence de la densité locale des fonctions de surface ABP sur l'activité anti-inflammatoire du dendrimère *in vitro* et ont montré que le dendrimère devait être composé de 8, 10 et 12 groupements terminaux ABP (4, 5 et 6 branches respectivement) pour avoir une activité anti-inflammatoire *in vitro* [135]. Dans la continuité de cette étude, l'influence du nombre de groupements de surface sur l'activité du dendrimère a été évaluée *in vivo* dans le modèle murin d'arthrite induite au sérum K/BxN. En ce qui concerne les dendrimères de 10 et 12 groupements ABP, administrés par voie intraveineuse, les résultats obtenus montrent leur capacité à contrôler et à prévenir le développement de la maladie chez la souris, ce qui est en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. Par contre, le dendrimère de 8 groupements ABP, qui était actif *in vitro*, n'est pas actif *in vivo*. Cette perte de l'activité *in vivo* de l'ABP à 4 branches a été expliquée par sa biodégradabilité, à pH physiologique et à 37°C, ce qui le rend inactif dans des expériences *in vivo* plus longues (2 semaines environ*)* que des expériences *in vitro* (entre 2 et 5 jours). En effet, le dendrimère à 4 branches PPH devient inactif dès qu'il perd une branche. Au contraire, les dendrimères à 5 et 6 branches doivent perdre 2 et 3 branches, respectivement, avant de perdre leur activité, ayant ainsi une action plus prolongée [136]. Ces études ont montré qu'il est possible de synthétiser des analogues fluorescents du dendrimère ABP, en substituant une des six branches par un fluorochrome. Parmi ceux-ci, un analogue fluorescent d'ABP émettant une fluorescence dans le proche infrarouge (ABP-NIR, ABP Near Infra-Red) sera utilisé dans notre étude pour la réalisation des expériences biologiques (**Figure 21**) [137].

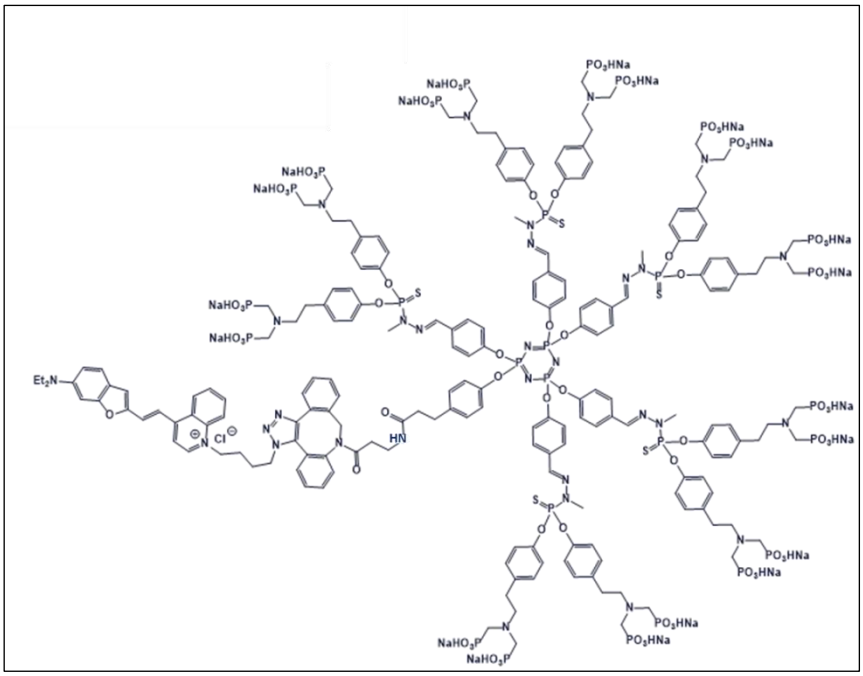


Figure 21. Structure du dendrimère ABP-NIR. *Masse molaire de 5746 g/mol.*

Récemment, nos équipes ont démontré pour la première fois que la conformation tridimensionnelle des dendrimères, dépendante de leur structure interne (cœur + branches), est cruciale pour leur bio-activité (**Figure 22**) [138]. En effet, les dendrimères PPH portant un cœur de type N_3P_3 et 12 groupements de surface ABP directionnels, présentent des interactions multivalentes plus fortes avec leur cible, ce qui favorisent donc leur activité anti-inflammatoire [136,138].

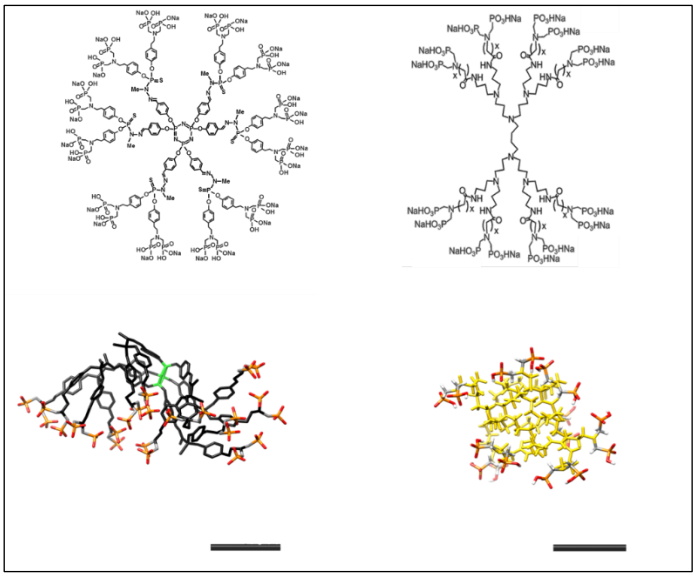


Figure 22. Conformation tridimensionnelle du dendrimère est dépendante de sa structure interne (cœur + branches). *Le dendrimère ABP à cœur N_3P_3 et branches de type PPH (12 groupements ABP à sa surface) présente une conformation directionnelle (actif in vitro et in vivo) (à gauche). Le dendrimère à cœur diaminobutane et de type PPI de deuxième génération (x=3) (8 groupements ABP à sa surface) présente une conformation non directionnelle (inactif in vitro et in vivo) (à droite). La barre d'échelle représente 1 nm. Adapté de [138].*

En conclusion, l'étude des relations entre la structure chimique et les propriétés biologiques d'ABP et de dendrimères dérivés a permis de définir un espace chimique multiparamétrique qui regroupe la taille du dendrimère, la nature des fonctions de surface, leur densité, leur directionnalité et leur flexibilité. Le dendrimère PPH de première génération portant 12 groupements azabisphosphonate directionnels (**le dendrimère ABP**) est le plus actif. En vue d'un développement préclinique réglementaire, une évaluation du rapport bénéfice/risque de nouveaux médicaments s'avère important pour identifier si le bénéfice thérapeutique de la molécule candidat pourrait être associé à des effets secondaires délétères. Dans la partie suivante, je présenterai les études réalisées pour évaluer la toxicité/ l'innocuité du dendrimère ABP.

5.2.2.4. Étude de la toxicité du dendrimère ABP

Dans l'étude réalisée *in vivo* sur l'efficacité thérapeutique du dendrimère ABP dans le modèle de la PR, aucune toxicité apparente n'a été détectée chez les souris IL-1RA KO traitées par le dendrimère ABP à la dose de 10 mg/kg durant toute la durée de traitement (12 semaines). De

plus, les coupes histologiques des reins, du foie, des poumons et de la rate n'ont révélé aucune anomalie par rapport à celles des souris normales [131]. Par la suite, une étude plus approfondie sur des animaux sains a été réalisée afin de confirmer l'innocuité du dendrimère ABP.

Pour cela, une étude de toxicité systémique du dendrimère ABP à doses répétées a été réalisée en 2014 sur un modèle de primates non-humains. Cette étude, où le dendrimère ABP est administré par voie intraveineuse à la dose de 10 mg/kg/semaine (qui est 10 fois plus élevée que la plus faible dose active *in vivo*) pendant 4 semaines, montre l'absence de toxicité aux niveaux biochimiques, hématologiques, immunologiques et histologiques (absence de changements pathologiques aux niveaux des principaux organes thoraciques et abdominaux) [139].

Dans la continuité de cette étude, nos équipes ont récemment évalué la sécurité et la dose maximale tolérée (DMT) du dendrimère ABP chez les rongeurs (souris et rats) [137]. Des souris traitées avec le dendrimère ABP à la dose de 10 mg/kg ne présentent aucun trouble hématologique par rapport aux souris non traitées avec l'ABP, ce qui est en accord avec les observations sur les primates non-humains. Une étude de génotoxicité *in vitro* a montré que le dendrimère ABP a un effet génotoxique mais à la concentration de 215 µM, soit 10 à 100 fois plus élevée que les concentrations actives du dendrimère *in vitro* sur les monocytes humains. La DMT a été par la suite déterminée en testant des doses croissantes du dendrimère ABP sur les rats et les souris. Il a été montré que la DMT du dendrimère ABP est de 100 mg/kg après une seule injection en intraveineuse chez la souris, et de 60 mg/kg/jour après des injections répétées pendant sept jours chez le rat [137]. Cette large différence entre les doses toxiques (doses supérieures à la DMT) et les doses thérapeutiques actives (1 et 10 mg/kg/semaine) permet d'estimer que le dendrimère ABP a un index thérapeutique large (IT considéré comme large lorsque IT= $\frac{Dose\ toxique}{Dose\ efficace}$ > 10 [140]).

L'ensemble de ces études attestent l'innocuité du dendrimère ABP et incitent au développement préclinique réglementaire de la molécule pour passer ensuite à son développement clinique.

Résumé

Les dendrimères sont des macromolécules synthétiques qui ont trouvé de nombreuses applications en nanomédicine. Le dendrimère nommé ABP, pour ses 12 groupements fonctionnels terminaux Azabisphosphonate, a montré des propriétés anti-inflammatoires et immuno-modulatrices envers différentes cellules immunitaires : les monocytes/macrophages, les DC, et les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$. Les effets anti-inflammatoires du dendrimère ABP ont également été validés dans des modèles animaux de maladies inflammatoires chroniques et aigues. Ces propriétés sont particulièrement intéressantes pour le traitement du psoriasis dans lequel les lymphocytes T $CD4^+$ et les lymphocytes T $CD8^+$, ainsi que les monocytes/macrophages et les DC, jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de la maladie. Ces propriétés du dendrimère ABP seront donc mises à profit dans le cadre de mes travaux de thèse pour le traitement du psoriasis.

6. Modèles murins de psoriasis

Plusieurs modèles, *in vitro* et *in vivo,* du psoriasis humain ont été développés afin de mieux comprendre la physiopathologie du psoriasis, et de développer de nouvelles thérapies [141]. Dans ce manuscrit, je présenterai uniquement les modèles animaux du psoriasis qui sont les plus utilisés.

Il est important de noter que le psoriasis est une maladie strictement humaine, qui ne se développe pas spontanément chez les animaux, à l'exception de quelques cas observés chez le singe et le chien [142,143]. Des modèles animaux, surtout des modèles murins, ont été développés et classifiés en : modèles spontanés, modèles génétiquement modifiés (transgéniques et KO), modèles de xénogreffes et modèles induits directement. Chacun de ces modèles a ses limites, qui sont dues principalement à la différence de la morphologie et de la composition immunitaire entre la peau humaine et celle de la souris (à l'exception du modèle de xénogreffe d'une peau humaine d'un patient psoriasique sur des souris immuno-déficientes). Contrairement à la peau humaine, la peau de souris se caractérise par une distribution plus dense de follicules pileux et par un épiderme moins épais constitué généralement de seulement 3 couches de kératinocytes (un quart de l'épiderme humain)

[144]. De plus, l'épiderme humain présente des crêtes épidermiques, absentes dans la peau de souris (**Figure 23**). Les cellules immunitaires présentes dans l'épiderme humain sont des cellules de Langerhans et des lymphocytes T $CD8^+$. Dans l'épiderme murin, une population de cellules T dendritiques (DETC) est prédominante, qui est absente dans l'épiderme humain. En ce qui concerne le derme, des cellules dendritiques, des lymphocytes T $CD4^+$, et des macrophages sont présents chez l'homme et la souris. Dans le derme de la peau murine, une autre population de lymphocytes T γδ non conventionnelle, productrice de l'IL-17, joue un rôle important dans l'immunité cutanée [145,146]. Cette population est définie par l'expression d'un TCR γδ (T-cell receptor γδ) alors que les lymphocytes T conventionnels $CD4^+$ et $CD8^+$ expriment à leur surface le TCR αβ.

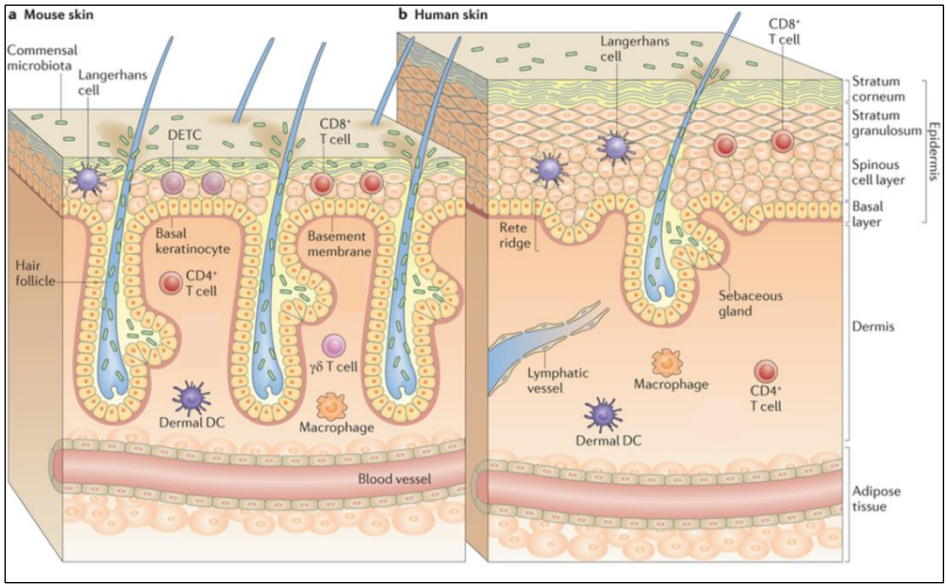


Figure 23. La morphologie et la composition de la peau murine (a) et de la peau humaine (b). *Adaptée de [145].*

Malgré ces différences, les modèles murins de psoriasis ont prouvé leur utilité dans la compréhension de la physiopathologie du psoriasis. Afin qu'un modèle murin de psoriasis soit pertinent, il doit présenter les caractéristiques suivantes [144,147,148]:

- Un épaississement de l'épiderme associé à une altération de la différenciation des kératinocytes
- Une hyperpapillomatose
- Un infiltrat inflammatoire constitué essentiellement de lymphocytes T
- Une hypervascularisation dans le derme

- Une réponse thérapeutique aux agents anti-psoriasiques standards

Gudjonsson *et al.* ont montré que 5 des modèles murins de psoriasis existants répondent à la majorité de ces critères et présentent de telles similitudes avec le psoriasis humain. Ces modèles sont les suivants : **K5-STAT3, K14-ARGE, K5-TGF-β1, K5-Tie2 et IMQ** [144]. Cette étude a été suivie par celle de Swindell *et al.* qui ont montré la présence d'une similitude statistiquement significative dans le profil d'expression des gènes entre ces modèles murins et le psoriasis humain [147]. Cependant, il existe des différences marquées entre ces modèles murins au niveau de l'expression des gènes associés au système immunitaire.

Dans cette partie, nous nous intéresserons à présenter les principales caractéristiques de ces modèles, ainsi que les modèles de xénogreffes qui constituent probablement le meilleur modèle *in vivo* du psoriasis humain.
Les similitudes entre les modèles murins et le psoriasis humain, ainsi que la facilité d'utilisation du modèle, en termes de reproductibilité des résultats et de durée d'expérimentation, nous permettra de justifier le choix du modèle qui a été utilisé par la suite pour réaliser ce travail.

Modèle K5-STAT3

STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription 3) est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire. Dans les lésions psoriasiques, une activation excessive de STAT3, qui est important dans la voie de signalisation d'IL-23, conduit à la polarisation des lymphocytes Th17 [149]. Dans le modèle de souris transgénique K5-STAT3, une surexpression du gène *STAT3* dans les kératinocytes de la couche basale entraine l'apparition des caractéristiques histologiques du psoriasis, principalement l'acanthose, la parakératose, l'absence de la couche granuleuse, l'hypervascularisation et l'infiltration leucocytaire [144]. Le développement des lésions dans ce modèle est dépendant de l'activation des lymphocytes T [141].

Modèle K14-ARGE

L'amphiréguline (AR) est un membre de la famille des facteurs de croissance épidermique (EGF). Des études antérieures ont montré que l'expression de l'AR est augmentée dans

l'épiderme psoriasique [150]. Suite à ces études, un modèle murin transgénique K14-*ARGE* (keratin 14- amphiregulin gene), dans lequel l'AR est surexprimée dans les couches basales des kératinocytes, conduit au développement des lésions avec un phénotype cutané proche du psoriasis humain [151]. L'histologie de la peau des souris montre une acanthose, une parakératose, une infiltration épidermique et dermique des lymphocytes T et des PNN, et une vasodilatation dans le derme.

Modèle K5-TGF-β1

Ce modèle est obtenu par une surexpression de TGF-β1 dans les kératinocytes des souris. Les TGF-β constituent un autre groupe de facteur de croissance impliqué dans le développement des lésions psoriasiques [144]. TGF-β1 induit une différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en Th17 [152]. Les souris K5-TGF-β1 développent les caractéristiques d'une peau psoriasique, tels que l'acanthose, l'hyperkératose, la formation des micro-abcès de PNN et l'infiltration des cellules immunitaires. L'inflammation chronique développée chez ces souris est due à l'angiogenèse et à la dilatation des vaisseaux sanguins, ce qui augmente le recrutement de cellules pro-inflammatoires aux sites lésionnels [144,147].

Modèle K5-Tie2

Un autre modèle intéressant de souris transgéniques **K5-Tie2** a été développé, et est basé sur la surexpression du récepteur aux angiopoïétines, Tie2, dans les kératinocytes. Ce récepteur est normalement exprimé dans les cellules endothéliales et est faiblement exprimé dans les kératinocytes [153]. Tie2 se lie aux angiopoïétines, et par conséquent sa surexpression induit une augmentation de l'angiogenèse dermique. De plus, cette surexpression de Tie2, récepteur à activité tyrosine kinase, dans les kératinocytes permet le développement d'un phénotype de psoriasis caractérisé histologiquement par une acanthose, une hyperpapillomatose, une hyperkératose et une parakératose. En outre, un infiltrat inflammatoire et des micro-abcès de PNN ont été observés [144,154].

La **figure 24** montre les manifestations cliniques du psoriasis chez les souris transgéniques déjà présentées.

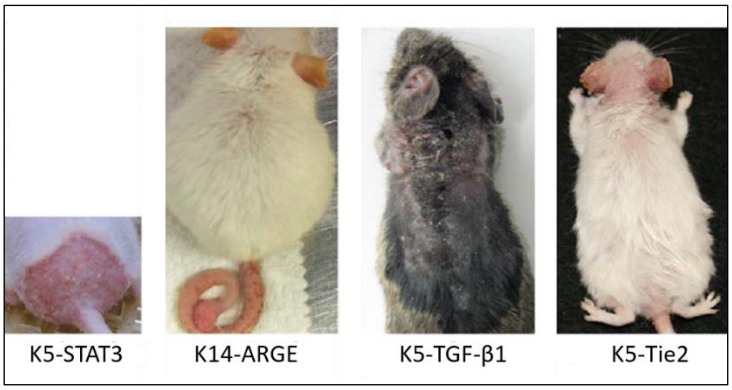


Figure 24. Présentation phénotypique des modèles de souris transgéniques de psoriasis. *La peau de souris dans chacun de ces modèles reflète les aspects cliniques de la peau psoriasique humaine. Elles sont caractérisées par la formation des plaques érythémateuses, épaisses et couvertes de squames. Adaptée de [147].*

Modèle induit par l'IMQ

L'IMQ, commercialisé sous le nom d'Aldara 5%, présente des effets antiviraux et anti-tumoraux. Il est prescrit pour le traitement topique des verrues génitales causée par le papillomavirus humain (HPV), et de certains cancers cutanés tels que la kératose actinique et les petits carcinomes baso-cellulaires superficiels [30]. Certains patients atteints d'un psoriasis stabilisé ont signalé une exacerbation des lésions psoriasiques pendant le traitement par l'IMQ contre les cancers cutanées [155,156]. L'IMQ induit chez ces patients, non seulement des lésions psoriasiques au niveau du site d'application, mais aussi au niveau des zones saines éloignées de son site d'application [156]. En plus, de faibles quantités d'IMQ ont été détectées dans le sérum et dans l'urine des patients, ce qui suggère la présence d'une absorption systémique de l'IMQ appliqué par voie cutanée [156].

La structure de l'IMQ est présentée dans la **figure 25.**

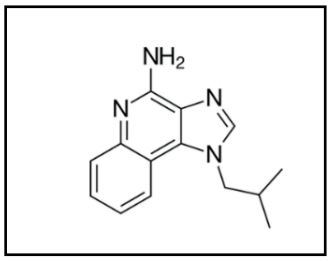


Figure 25. Structure de l'IMQ. *L'IMQ est une molécule lipophile de masse molaire 240,3 g/mol.*

L'IMQ est un agoniste des TLR7/8, exprimés par les macrophages et les pDC. Par conséquent, il contribue à une forte activation du système immunitaire induisant une réponse de type Th1, et la migration des cellules de Langerhans dans les organes lymphoïdes secondaires. Cette activation immunitaire est associée à la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines qui permettent le recrutement de cellules inflammatoires dans la peau. Ces effets de l'IMQ ont permis de développer un modèle murin de psoriasis basé sur l'application journalière d'IMQ pendant 5 à 7 jours sur la peau rasée et dépilée de souris [30]. Les lésions cutanées induites par l'IMQ commencent à se développer à partir du 3ème jour. Ces lésions présentent une apparence similaire au psoriasis humain. Elles sont caractérisées par des plaques érythémateuses, épaisses et squameuses (**Figure 26**).

Figure 26. Modèle de psoriasis induit par l'IMQ. *Présentation phénotypique de la peau du dos de souris Balb/c après 6 jours de traitement par l'IMQ (à droite) par rapport à la souris contrôle traitée par vaseline (à gauche) [30].*

Au niveau histologique, l'IMQ induit une hyperprolifération des kératinocytes associés à une altération de leur différenciation (parakératose, absence de la couche granuleuse, hyperkératose), une formation de micro-abcès de PNN et une hypervascularisation. Un infiltrat immunitaire dense, constitué par des lymphocytes T, des pDC, des PNN et des macrophages, a été observé dans le derme murin. Il a été également montré que les lymphocytes T jouent un rôle fonctionnel dans ce modèle. En effet, l'inflammation cutanée induite par l'IMQ est atténuée chez des souris déficientes en lymphocytes T, obtenues par un traitement avec un anticorps anti-CD3. La réponse à l'Aldara est induite principalement par les lymphocytes T de type Th17 et T γδ qui sont les principales source de l'IL-17 [30,146]. En effet, l'IMQ induit une augmentation de l'expression des cytokines de l'axe IL23/IL-17 dans

les lésions cutanées mais d'une façon transitoire malgré la continuité de l'aggravation clinique de la maladie. Une expression maximale de l'IL-23 est obtenue après 48h, suivie d'une induction de l'expression de l'IL-17A, de l'IL-17F, et de l'IL-22, présentant un pic maximal après 72h. L'expression de ces cytokines dans la peau diminue par la suite malgré la continuité du traitement des souris par l'IMQ [30].

Cependant, il a été montré que l'Aldara a un effet direct sur les kératinocytes par un mécanisme indépendant de TLR7 et de l'IMQ [157]. En effet, il a été observé que les souris TLR7 KO présente une hyperprolifération des kératinocytes aboutissant à une acanthose, 24 heures après la première application de l'Aldara. De plus, il a été démontré que le véhicule de l'Aldara en absence d'IMQ, notamment l'acide isostéarique qui est l'ingrédient le plus abondant dans l'Aldara, induit la lyse des kératinocytes humains et favorise l'activation de l'inflammasome (complexe protéique qui se forme suite à la reconnaissance des signaux inflammatoires) dans les kératinocytes en culture, activant ainsi la cascade inflammatoire. En effet, l'activation de l'inflammasome entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires (pro-IL-1α et IL-1β) qui activent par la suite la prolifération des kératinocytes.

Donc, on peut conclure que l'Aldara active au moins deux voies immunitaires indépendamment et que la présence simultanée d'IMQ et du véhicule de la crème (notamment l'acide isostéarique) est nécessaire pour avoir une réponse inflammatoire complète [157].

Modèle de xénogreffes

L'absence des caractéristiques morphologiques de la peau humaine constitue une limitation des modèles murins de psoriasis. Au contraire, les modèles de xénogreffes présentent l'avantage de la transplantation de la peau d'un patient psoriasique chez des souris immunodéprimées sans que la greffe soit rejetée. Il a été décrit trois modèles de xénogreffes, mais la transplantation de la peau humaine non lésionnelle d'un patient psoriasique chez des souris AGR129 (déficientes en lymphocytes B et T, et présentant des cellules NK inactives) constitue le meilleur modèle *in vivo* de psoriasis. Ce modèle a montré la formation spontanée de peaux lésionnelles au bout de quelques semaines. Cette formation des plaques psoriasiques est due principalement à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T humains. Il a été montré que ces lésions sont les plus proches de celles observées pour le psoriasis humain, caractérisées par une acanthose, une absence de la couche granuleuse, une

parakératose, une hyperpapillomatose, une hypervascularisation et par un infiltrat immunitaire dense (**Figure 27**) [5,158].

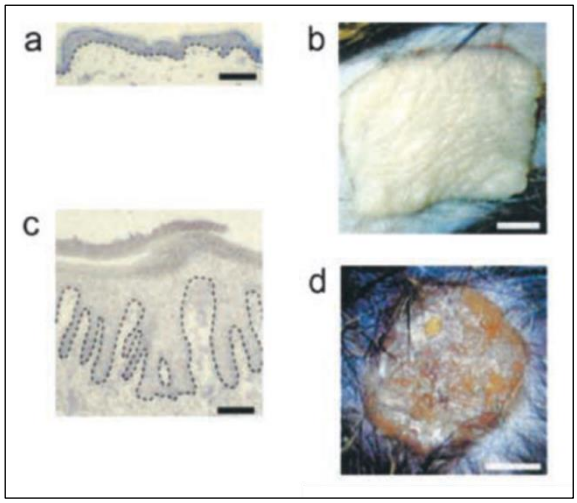


Figure 27. Représentation histologique et phénotypique de la greffe d'une peau non lésionnelle d'un patient psoriasique chez des souris AGR129. *Le jour de la greffe, la peau non lésionnelle est comparable à la peau humaine normale au niveau microscopique (a) et macroscopique (b). Après 6 à 8 semaines, la peau transplantée non lésionnelle est convertie spontanément en une peau lésionnelle présentant les caractéristiques histopathologiques (c) et les signes cliniques (d) typiques du psoriasis humain. Adaptée de [158].*

Tous les modèles murins présentés dans cette partie ont permis de mieux comprendre la physiopathologie du psoriasis, de développer et de valider de nouveaux traitements anti-psoriasiques.

Ces dernières années, une augmentation rapide du nombre de publications impliquant l'utilisation du modèle de psoriasis induit par l'IMQ a été observée (**Figure 28**).

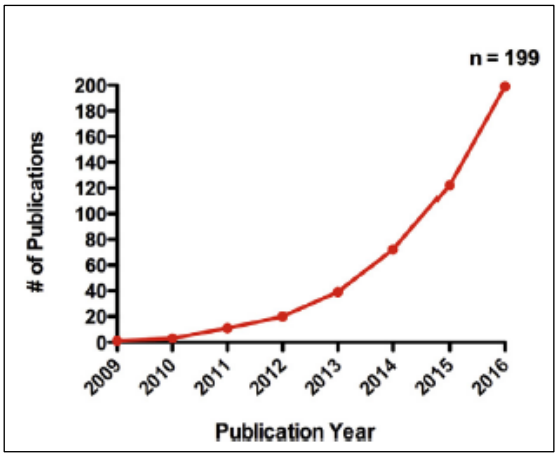


Figure 28. Augmentation du nombre de publications utilisant le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ depuis sa description initiale en 2009 jusqu'à 2016 [159].

La large utilisation de ce modèle repose sur sa facilité d'utilisation. Contrairement aux modèles de xénogreffes, ce modèle n'est pas coûteux, et ne nécessite pas une expertise technique particulière. De plus, la rapidité de ce modèle dans le développement d'une inflammation cutanée aigue en 2 à 4 jours, par rapport aux modèles de souris transgéniques (6 à 12 mois), le rend très approprié pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules anti-psoriasiques. Un autre avantage de ce modèle est la reproductibilité de la réponse inflammatoire cutanée, limitant les variations au sein du même groupe et entre les expériences. Le modèle d'IMQ, comme d'autres modèles de souris du psoriasis, présente également l'avantage de développer les principales caractéristiques du psoriasis humain, telles que l'hyperactivité du système immunitaire, l'hyperplasie vasculaire, et l'hyperprolifération kératinocytaire. Toutes ces caractéristiques du **modèle de psoriasis induit par l'IMQ** font que c'est celui que nous avons choisi pour tester l'efficacité anti-inflammatoire du dendrimère ABP dans le traitement du psoriasis.

7. Stratégies de promotion de la pénétration cutanée

L'administration de substances actives par voie cutanée constitue une voie intéressante pour cibler leur site d'action, la peau. Cependant, le *stratum corneum* (*cf* chapitre 1 partie **2**)

constitue la principale barrière cutanée qui s'oppose à la pénétration de substances actives, réduisant donc la quantité de médicament qui pénètre dans la peau, et limite ainsi une meilleure efficacité thérapeutique. Afin d'adopter une stratégie pour franchir cette barrière cutanée, il convient d'abord d'identifier le site d'action cutané de la substance active.

En fonction de l'objectif thérapeutique recherché, il existe différents sites d'actions cutanés aux niveaux desquels la substance active doit être transportée pour pouvoir agir. En effet, certaines formulations, telles que les écrans solaires, les désinfectants et les répulsifs contre les insectes, sont utilisées pour protéger la surface de la peau et nécessitent donc une efficacité uniquement dans le ***stratum corneum***. D'autres formulations, telles que les soins capillaires, les antiperspirants et les anti-acnéiques, agissent au niveau des **annexes cutanées** pour induire leur effet thérapeutique. Il peut également être recherché une activité anesthésique locale, anti-inflammatoire et antihistaminique dans les tissus cutanés plus profonds tels que **l'épiderme viable et le derme**. Enfin, la peau peut être utilisée pour l'administration systémique de médicaments en utilisant le **passage transdermique**. Parmi ces médicaments, on peut citer les patches de nicotine, indiqués dans le traitement de l'addiction au tabac, et les patches contenant des dérivés oestrogéniques, indiqués dans le traitement de la ménopause [160,161].

Dans notre étude, nous cherchons à mettre au point un système qui permette d'améliorer la pénétration du dendrimère ABP dans les couches profondes de la peau en particulier dans l'épiderme viable qui est le site principal de la physiopathologie du psoriasis, mais aussi dans le derme où on retrouve l'infiltration de cellules inflammatoires.

Plusieurs stratégies actives et passives permettent à la substance active de franchir la barrière cutanée et d'atteindre par la suite les zones plus profondes de la peau. Avant d'aborder ces stratégies, il est important de connaitre les voies de pénétration cutanée possibles et les principales caractéristiques physico-chimiques permettant à l'actif de pénétrer à travers la peau.

7.1. Voies de pénétration cutanée

Une substance active peut traverser le *stratum corneum* par diffusion passive selon trois voies possibles : transannexielle (passage à travers les annexes cutanées), transcellulaire (passage à travers les cornéocytes) et intercellulaire (passage à travers la matrice lipidique) (**Figure 29**).

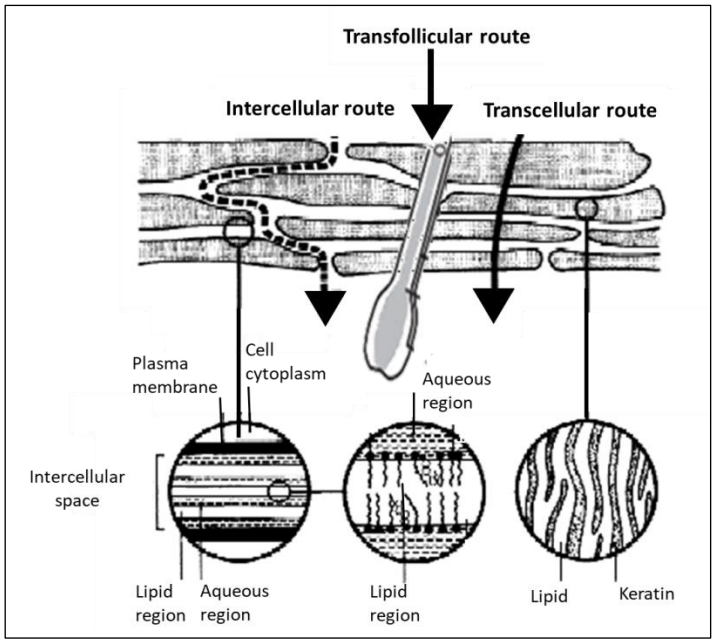


Figure 29. Diagramme représentatif des trois voies de pénétration possibles à travers le stratum corneum. *Adaptée de [162].*

La voie transannexielle

La **voie transannexielle** correspond majoritairement à la voie transfolliculaire vu que les canaux sudoripares sont obstrués la majorité du temps par le flux de la sueur, ce qui contrarie la pénétration des substances actives. Ces annexes cutanées constituent des zones de résistance moins importante que le *stratum corneum,* ce qui facilite la pénétration cutanée des actifs jusqu'au derme réticulaire. Il a été montré que cette voie folliculaire pourrait être importante dans la phase initiale de la pénétration, surtout pour les grosses molécules polaires et les ions qui ont du mal à traverser le *stratum corneum* intact [163]. La profondeur de pénétration dans le follicule pileux est inversement liée à la taille des particules [164,165]. Cependant, il est généralement admis que ces annexes ne représentent que 0,1% de la surface cutanée totale et que leur répartition est très variable sur le corps [166]. Ces facteurs rendent donc la contribution de la voie transannexielle à la pénétration cutanée de médicaments trop minime. Par conséquent, la majorité des stratégies d'amélioration de la pénétration cutanée consiste à augmenter le transport de l'actif à travers le *stratum corneum* plutôt qu'à travers les annexes cutanées [167].

La voie transcellulaire

Étant donné que les cornéocytes contiennent des filaments de kératine intracellulaire qui sont relativement hydratés, et donc de nature polaire, la **voie transcellulaire** a longtemps été considérée comme la voie de pénétration principale des molécules hydrophiles. Cependant, les molécules traversant la couche cornée par la voie transcellulaire doivent non seulement diffuser dans les cornéocytes mais aussi diffuser dans la matrice lipidique intercellulaire pour passer d'un cornéocyte à un autre. La pénétration par cette voie nécessite donc une série de diffusion à travers de multiples domaines hydrophiles (environnement polaire intracellulaire) et hydrophobes (domaines lipidiques intercellulaires), ce qui est défavorable pour la majorité des médicaments [167,168].

La voie intercellulaire

Bien que la matrice intercellulaire n'occupe que 5% du volume du *stratum corneum*, plusieurs études ont montré que la **voie intercellulaire** représente la voie majeure de pénétration cutanée pour une grande variété de composés [169]. Cette voie de pénétration cutanée est limitée principalement par la barrière lipidique, ce qui exige que les molécules aient une certaine affinité pour les milieux lipophiles afin de pouvoir pénétrer. Il a été estimé que la longueur du trajet de diffusion des molécules par la voie tortueuse du ciment lipidique peut atteindre jusqu'à 500 µm pour traverser une épaisseur de *stratum corneum* de 20 µm [170]. Dans les domaines lipidiques intercellulaires, le transport peut avoir lieu, d'une part à travers les régions hydrophiles (au niveau des têtes polaires) des bicouches lipidiques pour les molécules polaires, et d'autre part à travers les régions hydrophobes de ces mêmes bicouches lipidiques pour les molécules moins polaires. La matrice lipidique favorisera préférentiellement la pénétration de molécules lipophiles et amphiphiles.

En résumé, les trois voies peuvent contribuer simultanément, d'une façon mineure ou majeure, à la pénétration cutanée des substances actives. Il est évident que la contribution relative de chacune de ces voies est liée principalement aux propriétés physico-chimiques de la substance active.

7.2. Caractéristiques physico-chimiques de la substance active

Afin qu'un actif puisse pénétrer dans la peau, il doit avoir la capacité de pénétrer, d'une manière successive, dans les couches hydrophobes et hydrophiles de la peau. Cette perméation cutanée (diffusion d'une couche à la suivante) dépend de plusieurs facteurs, notamment des propriétés physico-chimiques de l'actif.

Le coefficient de partage

Afin de pénétrer dans les différentes couches de la peau, l'actif doit avoir un coefficient de partage octanol/eau (log P) compris entre 1 et 3 [167]. Les molécules ayant des coefficients de partage intermédiaires présentent ainsi une solubilité adéquate dans les domaines lipidiques afin de diffuser à travers le *stratum corneum* (milieu hydrophobe) tout en gardant une solubilité suffisante dans les domaines aqueux pour diffuser dans l'épiderme viable (milieu hydrophile). Les molécules très lipophiles auront, quant à elles, une affinité élevée pour *le stratum corneum* mais seront incapables de diffuser dans l'épiderme viable, alors que les molécules très hydrophiles seront peu susceptibles de diffuser de leur véhicule vers le *stratum corneum* [167].

La taille moléculaire

La masse moléculaire d'une substance chimique est un bon indicateur de sa taille. Cette dernière est inversement liée au coefficient de diffusion, et donc plus la molécule pénétrante est petite plus sa diffusion est facilitée. Une faible masse molaire, généralement < 500 g/mol, a été définie comme une caractéristique favorable au passage cutané [171].

Le degré d'ionisation

Le degré d'ionisation des molécules, qui dépend de leur pKa et du pH du milieu, peut également affecter la perméation cutanée. Il a été montré que les espèces non ionisées d'une molécule acide ou basique sont plus perméables à travers les barrières biologiques que les espèces ionisées, car ces dernières présentent un log P plus faible. Cependant, l'ion peut au contraire augmenter la solubilité dans les tissus hydrophiles, devenant un atout. Par conséquent, le choix du pH dans la formulation joue un rôle important dans l'amélioration de la pénétration cutanée [172].

Lorsqu'un actif possède toutes ces caractéristiques physico-chimiques, une application par voie cutanée et percutanée (tels que la nicotine et la nitroglycérine) est donc possible. Cependant, lorsqu'un actif ne répond pas à tous ces critères, son efficacité par voie cutanée est donc limitée par la faible quantité pénétrante dans la peau, ce qui nécessite donc d'améliorer sa pénétration cutanée.

Dans notre cas, le dendrimère ABP (l'actif) (*cf* **Figure 16**) est très soluble dans l'eau malgré l'hydrophobie de son cœur (solubilité > 1g/mL), il présente une masse molaire élevée de 5820 g/mol et possède en surface 12 groupements anioniques de biphosphonate de sodium. Ces critères limitent forcément une bonne pénétration cutanée du dendrimère ABP, d'où la nécessité d'adopter une stratégie afin d'améliorer sa pénétration cutanée vers les couches profondes de la peau.

Un certain nombre d'approches différentes et innovantes ont été explorées et développées pour améliorer le transport de la substance active dans la peau. En cohérence avec l'objectif de notre étude, seuls les systèmes les plus pertinents qui pourraient être capables d'améliorer la pénétration de l'ABP vers l'épiderme viable et le derme seront développés.

7.3. Stratégie d'administration cutanée de principes actifs

Comme déjà présenté, la fonction barrière de la peau, assurée en grande partie par le *stratum corneum*, limite la pénétration de la plupart de substances actives administrées par voie cutanée. Les technologies utilisées pour contourner ce problème sont divisées en deux grandes familles : les méthodes actives et les méthodes passives.

7.3.1. Les stratégies de promotion active

Les stratégies de promotion active sont basées sur des méthodes physiques qui visent à traverser ou supprimer le *stratum corneum* au niveau de la zone de traitement, afin d'atteindre directement les couches profondes.

Une partie de ces méthodes consiste à améliorer le transport cutané par la perforation de la couche cornée/ l'épiderme. Celles-ci incluent l'utilisation des ultrasons à basse fréquence

(sonophorèse) qui améliorent la perméabilité de la peau à divers actifs par l'augmentation de la fluidité des lipides intercellulaires [173], l'utilisation d'un courant électrique de faible amplitude qui permet la migration des molécules chargées dans la peau par répulsion électrostatique entrainant ainsi leur transport transdermique (iontophorèse) [174], ou bien l'application d'impulsions électriques à haute tension pour une courte durée de quelques microsecondes à millisecondes (électroporation) [175], afin de créer des pores aqueux transitoires dans les bicouches lipidiques. L'électroporation favorise ainsi le transport transdermique de médicaments de masses molaires variables allant de ceux de petites masses molaires, tels que le fentanyl et le timolol [176,177], aux macromolécules, telles que l'héparine et le FITC-dextran (masses molaires allant jusqu'à 40 kg/mol) [178,179]. Également, des dispositifs à haute pression, utilisant un gaz comprimé comme source d'énergie, tels que les injecteurs de liquide et de poudre, sont utilisés pour propulser respectivement des gouttelettes (par exemple une solution d'insuline) et des particules solides (par exemple un vaccin à ADN), avec des vitesses comprises entre 100 et 200 m/s (mètres/seconde). Soumises à cette haute pression, ces gouttelettes et poudres percent la barrière cutanée ce qui permet leur pénétration dans les couches profondes de la peau [180–182]. Enfin, des microaiguilles cutanées, constituées par des aiguilles courtes et fines, sont aussi développées pour l'administration percutanée de médicaments par la formation des micro-canaux dans le *stratum corneum* [183].

D'autres méthodes physiques consistent à franchir la barrière cutanée par la suppression de la couche cornée. En effet, des sources thermiques puissantes, appliquées d'une manière localisée à la surface de la peau, sont utilisées pour induire l'ablation sélective du *stratum corneum,* de façon à ce que les tissus viables plus profonds restent structurellement intact [184,185]. Une autre technique mécanique, la microdermabrasion, permet d'éliminer le *stratum corneum* par la projection de cristaux abrasifs d'oxyde d'aluminium (les plus couramment utilisés) contre la peau pour l'exfolier. Ces cristaux permettent une augmentation de la pénétration d'actifs à travers la couche cornée [186]. Enfin, une technique très simple, telle que le ''Tape stripping'', consiste à éliminer les couches du *stratum corneum* par l'application répétitives de bandes adhésives sur la surface de la peau (une couche de cornéocytes est éliminée par une bande adhésive) [187].

Malgré leur grande efficacité pour améliorer le transport cutané et ainsi atteindre des niveaux thérapeutiques suffisants dans la circulation systémique, la majorité de ces méthodes physiques sont coûteuses, invasives, et impliquent dans la plupart des cas l'utilisation de dispositifs complexes qui nécessitent une formation des patients à leur emploi. Par conséquent, leur utilisation est envisagée dans des cas restreints où les médicaments nécessitent une forte pénétration transdermique, comme dans le cas de l'insuline, de l'héparine, de vaccins (contre des maladies comme la rougeole, le choléra, l'hépatite B, la grippe et la poliomyélite), ou d'hormones de croissance [178,180,188]. De plus, ces techniques physiques ne sont pas adaptées à une utilisation à long terme dans le psoriasis en raison de leur effet invasif.

L'amélioration de l'administration cutanée des médicaments d'une manière simple, et non invasive peut être obtenue par des **stratégies de promotion passive**.

7.3.2. Les promoteurs chimiques de pénétration

L'utilisation de **promoteurs chimiques de pénétration (CPE)** est l'une des approches passives les plus largement utilisées pour faciliter la pénétration cutanée de médicaments [189]. Les CPE sont faciles à utiliser par simple ajout à la formulation. Il existe une grande variété de mécanismes par lesquels ces promoteurs peuvent améliorer la pénétration cutanée de substances actives. Une des possibilités, est la fluidification de bicouches lipidiques de la couche cornée en interagissant avec les têtes polaires des lipides (promoteurs polaires) ou en s'intercalant entre les chaines lipidiques (promoteurs hydrophobes). Dans les deux cas, ces promoteurs perturbent les propriétés barrières du *stratum corneum* en altérant l'organisation des lamelles lipidiques intercellulaires (**Figure 30**) [161].

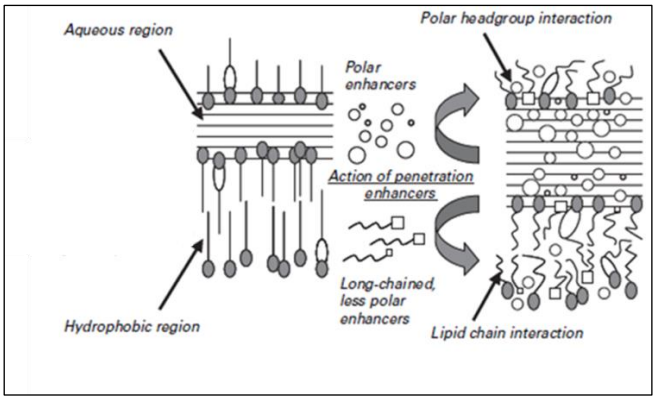


Figure 30. Mode d'action des CPE sur la matrice lipidique intercellulaire de la couche cornée. *Adaptée de [161].*

En plus de leur effet sur les lipides intercellulaires de la couche cornée, des produits chimiques, tels que le DMSO (diméthylsulfoxide), et le diméthylformamide (DMF) interagissent avec les macrofibrilles de kératine intracellulaire, et altèrent ainsi leur conformation [190]. Cependant, il a été montré que le DMF induit des dommages cutanés irréversibles [191]. Cette altération des macrofibrilles de kératine induit ainsi une augmentation de la perméabilité de substances actives par la voie intracellulaire. Cependant, de nombreuses études suggèrent que les lamelles lipidiques de la couche cornée sont le site d'action principal des CPE plutôt que la matrice de kératine intracornéocytaire [167]. L'augmentation de la solubilité de la substance active, et ainsi l'amélioration de son coefficient de partage (*stratum corneum*/véhicule), est une autre possibilité du mécanisme d'action des CPE [192]. Ces derniers peuvent induire également une extraction des lipides intercellulaires, et une hydratation de la couche cornée qui contribuent par la suite à l'augmentation de la perméabilité de la couche cornée aux substances actives [193].

Il existe plusieurs types de CPE qui sont divisés en plusieurs groupes en fonction de leur structure chimique [189]. Parmi les promoteurs chimiques les plus utilisés, on distingue : les alcools (tels que l'éthanol et le propylène glycol), les sulfoxides, l'azone (1-dodécylazacycloheptan-2-one, première molécule conçue pour servir comme CPE), les huiles essentielles (notamment l'huile essentielle d'eucalyptus) [194], les terpènes, les acides gras (surtout les acides à chaines aliphatiques saturées de 10 à 12 atomes de carbone), les tensioactifs (cationiques, anioniques et non-ioniques), les phospholipides (phosphatidylcholine) et l'urée [189,191].

Cependant, l'inconvénient majeur de l'utilisation de CPE est l'irritation cutanée [189,195]. Cette irritation provient de l'interaction de ces promoteurs avec la couche cornée perturbant les structures lipidiques organisées, les membranes et les protéines cellulaires de la couche cornée. L'irritation causée par cette interaction se traduit par une inflammation locale (un érythème et un œdème). De plus, les promoteurs de perméation les plus puissants peuvent ne pas limiter leur action à la couche cornée superficielle et diffuser ensuite dans l'épiderme viable où se trouvent les kératinocytes, et provoquer ainsi une cytotoxicité [196]. En résumé, il semble être difficile de trouver une balance entre la sécurité et l'efficacité optimale des CPE.

C'est pourquoi la vectorisation de principes actifs, constitue une alternative pertinente pour contourner ces problèmes. Plusieurs voies d'administration de médicaments, telles que les voies orale, parentérale et nasale, ont adopté cette stratégie notamment pour améliorer le transport de médicaments sur leur site d'action, démontrant ainsi l'intérêt grandissant de l'industrie pharmaceutique pour la vectorisation. Aujourd'hui, l'utilisation de ces nanovecteurs comme systèmes de vectorisation s'oriente de plus en plus vers des applications topiques. En effet, les nanovecteurs utilisés pour l'administration passive de médicaments, pour un transport cutané ou transcutané, offrent plusieurs avantages par rapport aux techniques de promotion passive conventionnelles : une augmentation de la solubilité et de la stabilité de l'actif, une administration de la substance active au niveau de sa cible thérapeutique, une libération contrôlée du principe actif, une irritation cutanée réduite, et une meilleure perméation cutanée de la substance active [197]. Les systèmes de vectorisation les plus pertinents pour une application par voie cutanée seront présentés dans la partie suivante. Concernant le mode d'action par lequel les nanovecteurs améliorent la pénétration cutanée, ce sujet reste un objet de controverses dépendant des propriétés physicochimiques de chaque vecteur.

7.3.3. Vectorisation des principes actifs pour une application cutanée

Les nanovecteurs sont des systèmes colloïdaux dont la taille est généralement inférieure à 500 nm [198]. Ces nanovecteurs diffèrent par leur structure et leur composition, et peuvent être classés en deux grandes familles : les systèmes matriciels et les systèmes cœur-couronne [199].

La description de ces différents systèmes va permettre d'orienter notre choix, à savoir le vecteur le plus simple à mettre en œuvre, le moins irritant et possédant les propriétés adéquates pour l'amélioration de la pénétration du dendrimère ABP dans les couches profondes de la peau.

7.3.3.1. Systèmes matriciels

Les systèmes matriciels sont des réseaux tridimensionnels formés par des lipides, des tensioactifs, des polymères, ou des dendrimères (*cf* chapitre 1 partie **5.1**) dans lesquels le principe actif est piégé [199].

Microémulsions

Les émulsions sont des systèmes hétérogènes composées de deux liquides non miscibles, l'eau et l'huile, dont l'un est la phase dispersée représentée par de fines gouttelettes et l'autre est la phase continue, mélangés entre eux et stabilisés grâce à des tensioactifs, souvent en combinaison avec des co-tensioactifs. Les émulsions sont généralement classées en: émulsion eau dans l'huile (E/H) où la phase continue est lipophile et la phase dispersée est hydrophile, et inversement pour l'émulsion huile dans l'eau (H/E) [200].

En fonction de la composition de l'émulsion (sélection de l'huile, du tensioactif et du co-tensioactif) et du procédé de fabrication, la taille des gouttelettes peut varier et donner lieu à différents types d'émulsion : les émulsions classiques (ou macroémulsion) de couleur blanchâtre (taille de gouttelettes de 1 à 10 µm), les microémulsions et les nanoémulsions translucides (taille de gouttelettes inférieure à 100 ou 200 nm), et les émulsions multiples (E/H/E ou H/E/H) [200] (**Figure 31**).

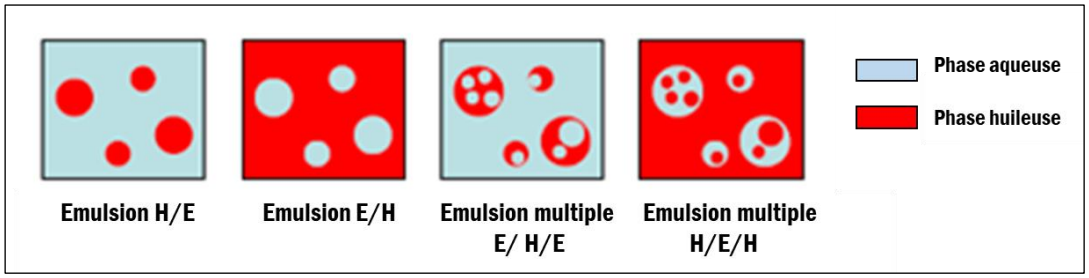


Figure 31. Schéma représentatif de différents types d'émulsions. *Issu de [199].*

Les microémulsions, qui correspondent à une organisation spontanée des composants chimiques qui les constituent, sont thermodynamiquement stables, contrairement aux émulsions classiques dont les gouttelettes sont de taille micrométriques (métastables). De plus, les microémulsions sont faciles à préparer car elles se forment spontanément et sont peu coûteuses.

Plusieurs études ont montré l'intérêt des microémulsions dans l'amélioration de la pénétration cutanée de molécules hydrophiles (émulsion E/H) et lipophiles (émulsion H/E) [201]. Un des mécanismes par lesquels les microémulsions permettent de promouvoir la pénétration cutanée, est la fluidification de la bicouche lipidique du *stratum corneum* en perturbant l'organisation des lipides intercellulaires. Cela est dû aux promoteurs de pénétration, tels que les tensioactifs et les lipides, qui sont utilisés dans la formulation. Ces systèmes peuvent également favoriser l'absorption cutanée en augmentant la capacité de solubilisation de principes actifs [202].

Par exemple, les microémulsions ont permis d'améliorer l'administration cutanée et percutanée de médicaments de diverses catégories, tels que le 5-fluorouracile (anti-néoplasique), le chlorhydrate de tétracaïne (anesthésique local), la minoxidil (indiquée dans le traitement de l'alopécie), le diclofénac (AINS), ou de la dexaméthasone (anti-inflammatoire stéroïdien) [202–206].

Cependant, les grandes quantités de tensioactifs et de lipides présentes dans les microémulsions peuvent entraîner des effets toxiques, ce qui freine leur utilisation [207].

Nanosphères

Les nanosphères sont des particules colloïdales solides, de diamètre compris entre 100 et 200 nm, composés de polymères [199]. Ces nanosphères piègent la substance active dans leur matrice polymère, mais il est également possible que la substance active soit adsorbée à la surface de la matrice [208]. Les polymères utilisés pour la formation des nanosphères sont souvent biocompatibles, et peuvent être classés selon leur origine : en polymères naturels (ou biopolymères), comme le chitosane, l'albumine, l'alginate et la gélatine, en polymères synthétiques non-dégradables, comme les polyacrylates, ou en polymères synthétiques biodégradables, tels que les polymères dérivés de la tyrosine, les acide polylactiques, les

acides polyglycoliques, les copolymères d'acide poly(lactique-co-glycolique) et les poly(ε-caprolactones) [209,210].

Des nanosphères composées de polymères amphiphiles dérivés de la tyrosine, nommés Tyrosphères, ont montré leur efficacité pour l'administration cutanée de médicaments hydrophobes en améliorant leur solubilité et ainsi leur pénétration cutanée. Parmi ces médicaments, on distingue le paclitaxel, le cholécalciférol et la ciclosporine indiqués dans le traitement du psoriasis et l'adapalène indiqué dans le traitement de l'acné [211–214].

Les études ont montré que ces nanosphères rigides ne pénètrent pas au-delà du *stratum corneum* superficiel, et présentent une certaine affinité pour les follicules pileux par lesquels ils peuvent pénétrer. Les nanoparticules polymères peuvent donc s'avérer utiles en tant que réservoir de substances actives à la surface de la peau contrôlant leur libération dans les couches profondes de la peau [215,216].

Il est important de rappeler que l'une des conditions nécessaires à la mise sur le marché d'un produit pharmaceutique est l'existence d'une méthode de production appropriée et finement contrôlée à large échelle. Ainsi l'absence de méthode simple et rentable pour la production de nanosphères à large échelle entrave leur développement industriel. De plus, certains polymères, notamment les polyesters, peuvent être phagocytés par les macrophages et ainsi leurs produits de dégradation peuvent entraîner des effets cytotoxiques [217]. Les polymères naturels, quant à eux, sont moins toxiques mais la variabilité d'un lot à l'autre empêche l'obtention de produits de caractéristiques constantes [210].

Des nanoparticules de polyélectrolytes, qui se situent à l'interface entre les nanosphères et les nanocapsules, sont également utilisées pour l'administration cutanée de substances médicamenteuses, notamment d'acides nucléiques afin de les protéger contre la dégradation par des nucléases et d'améliorer leur internalisation cellulaire qui est limitée à cause de leur caractère ionique [218]. Le chitosane est l'un des polycations les plus étudiés pour la vectorisation de matériel génétique thérapeutique, tels que ASO (oligonucléotide anti-sens) et siRNA (small interfering RNA), dû à ses propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité. Les nanoparticules de chitosane peuvent être obtenues soit par interactions électrostatiques entre le chitosane et l'acide nucléique, chargé négativement, soit par gélation ionique du chitosane avec un autre polyélectrolyte chargé négativement (alginate, tripolyphosphate, acide hyaluronique) puis adsorption de l'acide nucléique à la surface de ces

nanoparticules [219]. Par exemple, des nanoparticules de chitosane-alginate chargées d'ASO, qui sont destinés à inhiber l'expression de smad3 (protéine impliquée dans la voie de signalisation de TGF-β1), ont montré leur efficacité pour accélérer la cicatrisation de plaies. Cela peut s'expliquer, d'une part, par l'amélioration de la stabilité des ASO via le complexe de polyélectrolytes, et d'autre part, par les propriétés cicatrisantes du chitosane et de l'alginate de sodium [220]. Cette complexation polyélectrolytique semble en principe être simple à réaliser, cependant, elle dépend de plusieurs variables, telles que le rapport des polyélectrolytes utilisés, le pH et la température du milieu de dissolution [221]. Ces facteurs permettent donc de limiter l'obtention des nanoparticules de tailles reproductibles.

Nanoparticules lipidiques solides (SLN)

Les SLN sont des particules de lipides solides dispersés dans un milieux liquide et stabilisées par des tensioactifs [222] et dont la taille varie entre 40 et 1000 nm [197]. Les SLN présentent de nombreux avantages tels que la biocompatibilité, la protection de médicaments dans leur matrice solide contre la dégradation chimique (tels que la coenzyme Q10, vitamine E Lipopearls® et le rétinol), et le contrôle de la libération de médicaments [222,223]. Contrairement aux nanosphères, les SLN présentent l'avantage de pouvoir être produites d'une façon simple à grande échelle [224].

En raison des propriétés d'adhésivité des petites particules, les SLN forment un film hydrophobe qui a un effet occlusif à la surface de la peau [222,223]. Cet effet occlusif va limiter la perte en eau et va favoriser ainsi l'hydratation de la peau. Cette hydratation entraine par la suite un élargissement des espaces intercornéocytaires et augmente ainsi la mobilité des chaines lipidiques intercellulaires ce qui peut potentialiser la pénétration de substances actives dans les couches cutanées supérieures [225]. De plus, les lipides des SLN peuvent éventuellement fusionner avec les lipides cutanés, augmentant ainsi la pénétration de substances actives dans la peau [226]. Jensen *et al.* ont démontré que la solubilité de l'actif dans les lipides utilisés dans les SLN et la taille des nanoparticules ainsi obtenues peuvent également affecter le profil de pénétration de l'actif dans la peau. Afin d'élucider ceci, le profil de pénétration du valérate de bétaméthasone (un corticoïde) dans différents SLN qui diffèrent par leur composition en lipides (distéarate de glycérol, tripalmitate de glycérol et le palmitate de cétyle) a été évalué. Les SLN composées de distéarate de glycérol, ont permis

d'observer des quantités plus élevées du valérate de bétaméthasone dans la peau, en particulier dans le *stratum corneum*, par rapport à celles composées des deux autres lipides. Cela est probablement dû à la meilleure solubilité de l'actif dans le distéarate de glycérol et à la taille plus petite de ces SLN par rapport à celles composées de tripalmitate de glycérol ou de palmitate de cétyle [227].

Jensen *et al.* ont également comparé la pénétration cutanée de l'actif encapsulé dans les SLN à une formulation dans une pommade conventionnelle (paraffine) qui, comme les SLN, convient à l'administration de substances médicamenteuses lipophiles dans la peau et possède des propriétés occlusives. Cette étude a montré que la perméation de la substance médicamenteuse à travers la peau est réduite lorsqu'elle est formulée dans les SLN par rapport à la pommade, mais une plus grande quantité de cette substance est retenue dans la couche cornée, durant l'application des SLN, au cours du temps [227]. Ceci montre que les SLN, comme les nanoparticules polymères solides, restent à la surface de la peau et dans la couche cornée et créent un réservoir de médicaments qui prolonge leur diffusion cutanée [227].

Cependant, leur capacité de charge en molécules actives est limitée et l'expulsion de substances actives incorporées dans ces nanoparticules solides n'est pas toujours contrôlée pendant la période de stockage. Cela est dû à la cristallisation des lipides qui peut engendrer une ségrégation substance active/lipides et donc les lipides perdent leur pouvoir solubilisant de substances hydrophobes. Ces facteurs limitent ainsi l'application des SLN dans la vectorisation de principes actifs [225], ce qui a conduit au développement de nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC).

Les nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC)

Les NLC sont une deuxième génération de nanoparticules lipidiques. Leur matrice lipidique est formée par un mélange de lipides structurellement très différents, c'est-à-dire de lipides solides avec des acides gras à chaîne longue et de lipides liquides (huiles) avec des acides gras à chaînes courtes [226]. Ces nanoparticules lipidiques présentent divers avantages similaires à ceux des SLN, tels que l'utilisation de lipides biocompatibles, la production à grande échelle, et la protection de substances médicamenteuses contre la dégradation [228]. Contrairement aux SLN composées uniquement de lipides solides, l'introduction de lipides liquides dans la matrice lipidique entraine une réduction de l'ordre des lipides au sein de la matrice, et ainsi

conduit à un pouvoir solubilisant de substances hydrophobes plus important que la phase lipidique solide (**Figure 32**) [229]. Ceci permet donc d'obtenir des taux d'encapsulation plus élevés avec les NLC et une meilleure stabilité dans le temps.

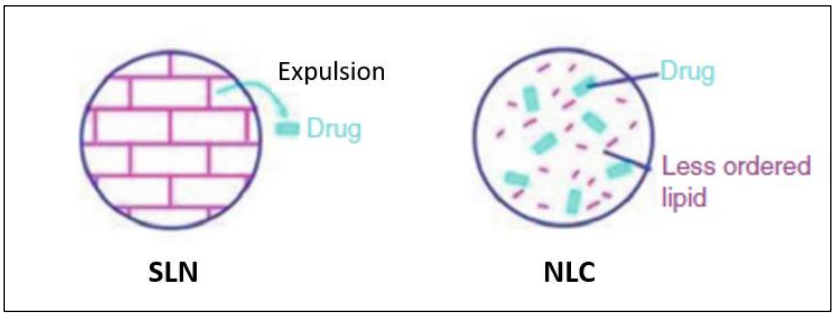


Figure 32. Représentation schématique montrant la différence entre la structure cristalline ordonnée de SLN et la matrice lipidique moins ordonnée de NLC. *Adapté de [226].*

Les NLC ont montré leur efficacité dans l'administration cutanée de divers médicaments dans l'épiderme viable et le derme. En effet, Viegas *et al.* ont récemment montré le potentiel de NLC à l'administration combinée de siRNA dirigés contre le TNF et du tacrolimus (anti-psoriasique) dans les différentes couches de la peau. L'effet anti-psoriasique de cette combinaison co-délivré à l'aide du NLC a été validé *in vivo* [230].
Malgré leur efficacité, l'encapsulation d'actifs hydrophiles dans les NLC reste limitée.

7.3.3.2. Systèmes cœur-couronne

Les systèmes de type cœur-couronne sont des particules colloïdales composées d'un cœur hydrophile ou hydrophobe délimité par une enveloppe. Cette enveloppe est formée de polymères, de lipides ou de tensioactifs. Selon les molécules qui composent l'enveloppe, ainsi leur organisation en monocouche ou en bicouches, les systèmes de type cœur-couronne peuvent être classés en catégories différentes : les nanocapsules et les polymersomes, les liposomes, les transfersomes, les éthosomes, les niosomes et les vésicules catanioniques. La plupart de ces systèmes permettent d'encapsuler à la fois des molécules hydrophiles et hydrophobes. La composition de leur enveloppe influence leur propriétés physicochimiques, tels que la taille, la charge, la capacité d'encapsulation, et ainsi leur efficacité à améliorer le transport cutané de principes actifs [231].

Nanocapsules et Polymersomes

Les nanocapsules et les polymersomes sont des systèmes cœur-couronne dans lesquels le principe actif est confiné dans un cœur liquide entouré d'une mince paroi de polymère. Ces deux systèmes diffèrent par l'hydrophilie de leurs cavités et par la structure membranaire polymère [232] (**Figure 33**).

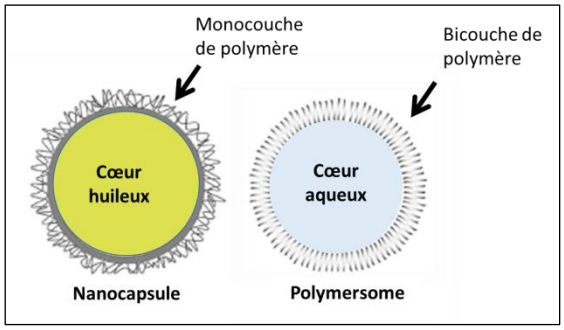


Figure 33. Représentation de la structure d'une nanocapsule et d'un polymersome.

Dans le cas des **nanocapsules**, la membrane est formée d'une seule couche de polymère, entourant un cœur liquide, huileux dans la majorité des cas. Le polymère utilisé pour la formation de nanocapsules est un homopolymère ou un copolymère à blocs [232].

L'utilisation de nanocapsules a été essentiellement centrée sur la formulation de soins cosmétiques, de désinfectants ou d'écrans solaires, qui doivent rester au niveau de la couche cornée pour être efficaces [233]. L'une des premières applications des nanocapsules a été l'encapsulation de la vitamine A, pour un usage antirides [234]. Alvarez-Román *et al.* ont également montré leur efficacité dans l'amélioration de la rétention dans la couche cornée de l'écran solaire lipophile, le dioctylmethoxycinamate (OMC), ce qui était recherché [235]. En effet, il a été montré que les nanocapsules restent préférentiellement à la surface de la peau et forment un film fin sur la peau, en conservant leurs structures particulaires dans les premières couches du *stratum corneum* [236], ce qui prolonge la diffusion du principe actif. Les nanocapsules ont permis donc de limiter la pénétration de l'écran solaire dans les couches profondes de la peau et ont augmenté son efficacité dans la couche cornée.

Dans le cas des **polymersomes**, la cavité interne est aqueuse et la membrane est une bicouche de copolymères à blocs amphiphiles. Contrairement aux nanocapsules, les polymersomes

permettent à la fois l'encapsulation des médicaments hydrophiles, dans leur cavité aqueuse, et des médicaments hydrophobes, dans leur membrane [237]. Il a été décrit que les polymersomes sont stables, ce qui permet d'obtenir une cinétique de libération de principes actifs contrôlée au cours du temps [237,238].

L'encapsulation de la finastéride (log P= 3,03), un inhibiteur de la 5-α-réductase (principalement située dans le follicule pileux), dans la bicouche hydrophobe des polymersomes couverts par du chitosane chargé positivement, a permis d'augmenter sa rétention dans l'épiderme et dans le derme et de contrôler sa libération dans la peau. Il a été observé que l'ajout du chitosane a contribué à augmenter l'accumulation du finastéride dans l'épiderme. Cette augmentation de la rétention cutanée est due à une forte interaction des polymersomes avec les composants de la peau, probablement en raison de la charge de surface positive des polymersomes qui interagissent avec les lipides cutanés chargés négativement, altérant ainsi leur structure [239]. Les polymersomes non-enrobés, quant à eux, ne peuvent pénétrer que dans les couches superficielles du *stratum corneum* intact ce qui dirigent probablement le système vers un transport folliculaire [239,240].

Malgré leur efficacité dans le domaine de la vectorisation, la principale limite des nanocapsules et des polymersomes, comme pour les nanosphères, réside dans leur méthode de préparation, pouvant être difficile à produire à l'échelle industrielle. En effet, la technique permettant d'obtenir les polymersomes est basée sur la dissolution de co-polymères dans un solvant organique volatile qui est évaporé pour obtenir un film de polymère. Ce film est ensuite réhydraté avec une phase aqueuse puis redispersé par agitation, sonication ou extrusion afin d'obtenir les polymersomes [199]. Les résidus de solvants organiques sont difficiles à éliminer en totalité, et peuvent être irritants pour la peau. Ils posent également un problème environnemental lorsqu'ils sont utilisés industriellement.

Liposomes

Les liposomes sont parmi les systèmes d'administration cutanée de médicaments les plus étudiés et les plus développés. Ce sont des vésicules lipidiques principalement composées d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides (**Figure 34**), renfermant un cœur aqueux. Comme les polymersomes, les liposomes sont utilisés pour le transport de molécules hydrophiles et hydrophobes [197]. Ils sont généralement classés en fonction de leur taille et du nombre de bicouches lipidiques, de la façon suivante : les vésicules multilamellaires (MLV),

de taille supérieure à 500 nm, les petites vésicules unilamellaires (SUV), de taille comprise entre 20 nm et 100 nm, les grandes vésicules unilamellaires (LUV) dont la taille est de 100 à 500 nm, et les vésicules unilamellaires géantes (GUV) de taille supérieure à 1 µm [241].

Le premier produit topique liposomal mis sur le marché est un gel de liposome de l'éconazole (Pevaryl®) indiqué dans le traitement de candidoses cutanées [242]. Puis, l'encapsulation dans les liposomes de divers médicaments, tels que le triamcinolone (un corticoïde), le fluconazole (antifongique), et la trétinoïne (anti-psoriasique), a montré une meilleure rétention cutanée de ces médicaments par rapport à leur utilisation sous forme non encapsulée [243–245].

Concernant le mode d'action par lequel les liposomes améliorent la pénétration cutanée, il est devenu évident que les liposomes ne pénètrent pas profondément dans les couches cutanées mais restent dans les couches superficielles du *stratum corneum* où la rupture des vésicules peut se produire en raison de leur manque de déformabilité [197,245].

Malgré leur grand intérêt, l'instabilité physique des liposomes limite leur utilisation dans le domaine de la vectorisation. En effet, l'instabilité physique, qui est due à une agrégation de plusieurs liposomes, conduit à la formation d'objets de grande taille, inutilisables en vectorisation. De plus, cette instabilité peut conduire à la libération des substances actives des liposomes avant d'atteindre leur cible. Concernant la méthode de préparation des liposomes, elle nécessite l'utilisation de solvants organiques, dont l'élimination n'est pas complète et peut engendrer des effets toxiques.

La rigidité des membranes des liposomes a amené les chercheurs à développer des liposomes plus flexibles : les transfersomes et les éthosomes (**Figure 34**).

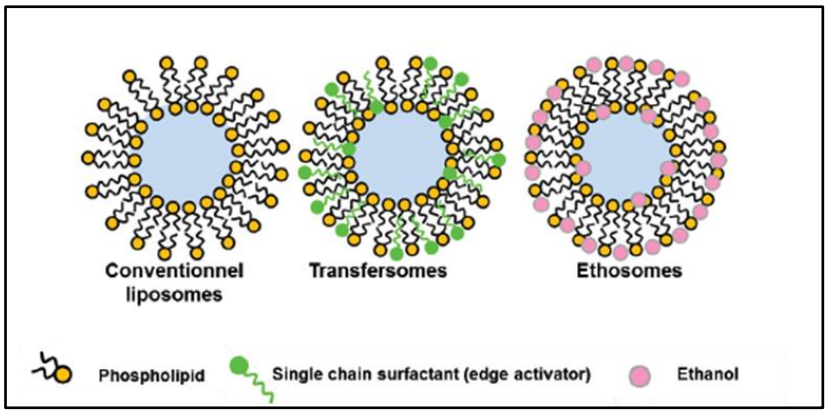


Figure 34. Schéma représentatif de la structure d'un liposome, d'un transfersome et d'un éthosome [224].

Transfersomes

Des recherches approfondies ont conduit au développement d'une nouvelle classe de liposomes hautement déformables, appelé transfersome [246]. Les propriétés élastiques de la bicouche des transfersomes sont obtenues par l'ajout d'un adjuvant (10 à 25 %), nommé ''edge activator'' (EA), qui s'insère entre les phospholipides de la bicouche [247]. Les EA sont, la plupart du temps, des tensioactifs, tels que le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, certains ester de sorbitane et polysorbates, qui altèrent l'organisation des bicouches lipidiques des vésicules et augmentent ainsi leur déformabilité [248].

Les transfersomes ont montré leur efficacité dans l'administration cutanée et percutanée de nombreux médicaments, notamment la ciclosporine, le méthotrexate et l'insuline [249–252]. Grâce à la flexibilité de leur membrane, les transfersomes peuvent se déformer et traverser facilement les espaces intercellulaires du *stratum corneum*. Toutefois, la diffusion passive de transfersomes est forcée par le gradient osmotique à travers la peau, qui est dû à la différence de teneur en eau entre le *stratum corneum* (15%) et les couches inférieures de l'épiderme (70%), ce qui nécessite donc des conditions d'application non-occlusives [246,253].

Bien qu'ils améliorent le transport dermique et transdermique de molécules actives, les techniques de préparation des transfersomes requièrent, encore une fois, l'utilisation d'une quantité importante de solvants organiques, et sont peu adaptées à une transposition à l'échelle industrielle.

Ethosomes

Les éthosomes ont été décrits pour la première fois par Touitou *et al.* il y a une vingtaine d'années. Ce sont des vésicules lipidiques composées de phospholipides et d'une grande quantité d'éthanol (20-45%) [254]. Il a été démontré que les éthosomes présentent une taille relativement plus petite et une efficacité d'encapsulation plus élevée que les liposomes [255]. Contrairement aux transfersomes, les éthosomes sont efficaces à la fois dans des conditions d'application occlusives et non-occlusives [248].

Des études ont montré leur efficacité dans l'amélioration de la pénétration de médicaments hydrophobes et hydrophiles (tels que l'indométacine et le méthotrexate) dans les couches profondes de la peau [256,257].

Bien que le mécanisme de pénétration exacte des éthosomes ne soit pas complètement connu, il est fort probable qu'une synergie de mécanismes contribue à leur efficacité. D'une part, l'éthanol, un promoteur de pénétration, s'intercale au niveau des têtes polaires des lipides intercellulaires du *stratum corneum* et augmente ainsi leur fluidité (*cf* chapitre 1 partie **7.3.2**). D'autre part, l'éthanol interagit également avec les phospholipides des éthosomes en augmentant par la suite la fluidité et l'élasticité de leur bicouche lipidique. Ces effets de l'éthanol sur les lipides du *stratum corneum* et sur la fluidité de la bicouche lipidique des éthosomes, facilitent le passage des éthosomes dans les voies intercellulaires altérées du *stratum corneum* vers les couches profondes de la peau [255].

Cependant, des applications répétées d'éthosomes sur la peau peuvent être irritantes, à cause de la grande quantité d'éthanol qu'ils contiennent. De plus, l'absorption d'éthanol à travers la peau endommagée, en particulier chez les enfants, peut entraîner des effets toxiques aigus ou systémiques [258].

Niosomes

Les niosomes sont structurellement similaires aux liposomes, mais leur membrane est composée de tensioactifs non-ioniques (notamment des esters de sorbitane et des polyoxyéthylène alkyl éther, aussi appelés, Brij®) et de cholestérol [259]. Le cholestérol est utilisé dans la préparation des niosomes, en plus des tensioactifs, pour renforcer la cohésion de leur membrane ce qui a pour conséquence de diminuer sa perméabilité. Ces systèmes, analogues aux liposomes et aux polymersomes, peuvent encapsulés à la fois des

médicaments hydrophiles et hydrophobes. Cependant, les niosomes sont plus stables que les liposomes [260].

Plusieurs études ont montré l'efficacité des niosomes pour améliorer la perméation cutanée de nombreux médicaments, tels que le 5-fluorouracile, l'itraconazole, l'acéclofenac (AINS), la trétinoïne, l'enoxacin (fluoroquinolone, un antibiotique) [261–265].

De nombreux mécanismes peuvent expliquer la capacité des niosomes à améliorer la pénétration cutanée de ces médicaments. Les niosomes, comme les liposomes, sont principalement localisés dans le *stratum corneum*, alors que leur perméation dans l'épiderme viable et le derme est très restreinte. Cela est dû probablement à l'ajout de cholestérol, qui peut entraîner une augmentation de la rigidité de la bicouche vésiculaire, ce qui limite donc la pénétration des vésicules à travers la couche cornée. L'aptitude des niosomes à améliorer la pénétration cutanée peut donc principalement s'expliquer par leur action sur les lipides intercellulaires, augmentant ainsi la fluidité du *stratum corneum* [260]. De plus, le tensioactif non-ionique peut agir lui-même comme un promoteur de pénétration, ce qui contribue également à l'amélioration de la perméation de médicaments à l'aide de niosomes (*cf* chapitre 1 partie **7.3.2***)*.

Bien que les niosomes présentent certains atouts supplémentaires par rapport aux liposomes, en termes de stabilité et de prix en matières premières, l'absence de constituants généralement reconnus comme sûrs (comme les phospholipides dans les liposomes) limite leur utilisation. Ils sont également connus pour induire un effet plus irritant que les liposomes [266].

En résumé, ces systèmes cœur-couronne ont montré leur intérêt dans l'administration cutanée grâce à leur aptitude à encapsuler des molécules d'hydrophilie variable. Cependant, leur capacité à pénétrer dans la peau dépend de leurs propriétés physicochimiques, et principalement de la fluidité de leur membrane. En effet, les vésicules à membrane solide, comme les polymersomes et les liposomes rigides (chaînes hydrocarbonnées à l'état solide), reste dans les couches superficielles de la peau alors que ceux à membrane fluide et déformable (par ajout d'éthanol ou de tensioactif), comme les éthosomes et les transfersomes, peuvent pénétrer dans les couches profondes de la peau. Donc, la fluidité de la membrane de ces systèmes, dépendante de ses composants, est un facteur important qui

nous apparait indispensable à prendre en compte dans notre cas. Cependant, les applications pharmaceutiques de chacun de ces vecteurs sont limitées par différents inconvénients. Notamment, ces systèmes nécessitent l'utilisation de matières premières à prix élevé, des méthodes de préparation complexes et l'utilisation d'additifs nocifs. De plus, la plupart d'entre eux ont une instabilité notable.

Les vésicules catanioniques

Les vésicules catanioniques, qui font l'objet de ce travail, sont des systèmes composés d'une bicouche de tensioactifs catanioniques (**Figure 35**), c'est-à-dire d'un mélange de tensioactifs de charges opposées. En effet, ces tensioactifs catanioniques sont capables, en fonction de leur structure, de la stœchiométrie cation/anion et de leur concentration, de former spontanément des vésicules en milieu aqueux, démontré pour la première fois par *Kaler et al.* en 1989 [267–269]. Bien que formées spontanément, les vésicules catanioniques ont la même capacité d'encapsulation de substances actives que les liposomes. Cependant, contrairement aux liposomes, la simplicité de leur mode de préparation, leur formation en milieu aqueux sans l'utilisation de solvants organiques, donc sans risques de toxicité, et ainsi leur stabilité à long terme rendent leur utilisation intéressante dans le domaine de vectorisation à l'échelle industrielle [270,271].

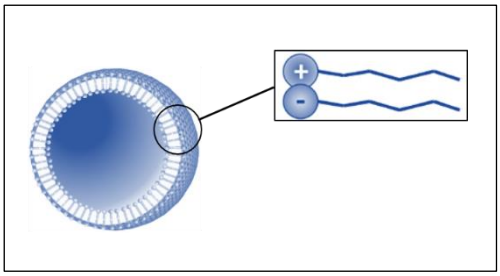


Figure 35. Représentation schématique d'une vésicule catanionique formée par l'assemblage spontané de tensioactifs catanioniques bicaténaires.

L'étude de Lui *et al.* a permis de caractériser des vésicules catanioniques contenant de l'éthanol, et a montré leur potentiel d'application dans l'administration cutanée de principes actifs par leur capacité d'encapsulation élevée de l'acétate de tocophérol [272]. D'autres auteurs ont étudié le processus de libération de médicament encapsulé dans des vésicules

catanioniques, elles-mêmes dispersées dans un gel, et ont montré qu'après leur application sur la peau, elles restent stables et sont responsables par conséquent d'une libération prolongée du médicament [273–275].

Parmi les tensioactifs catanioniques, l'utilisation de tensioactifs dérivés de sucre est avantageuse. Ils sont biocompatibles, non toxiques, peu chers et améliorent la solubilité des tensioactifs catanioniques dans l'eau à l'équimolarité, contrairement aux catanioniques classiques, tels que CTAT/ SDBS (Cetyl TrimethylAmmonium Tosylate/Sodium DodecylBenzene Sulfonate) [267,276]; CTAB / SDS (Cetyl Trimethylammonium Bromide/ Sodium Dodecyl Sulfonate) [277], qui nécessitent un large excès de l'un des tensioactifs afin d'éviter la précipitation du mélange [267,278].

Dans notre équipe, des tensioactifs catanioniques originaux dérivés de sucre ont été synthétisés et préparés dans le but d'obtenir de nouvelles formulations bioactives (le principe actif fait partie de la paire d'ions) et de nouvelles formulations de composés actifs pour l'administration cutanée. Consola *et al.* ont développé des vésicules catanioniques formées spontanément par l'auto-association d'un tensioactif cationique dérivé de sucre et de l'indométacine (AINS). Cette formulation bioactive, où l'AINS participe à sa propre formulation, a permis de prolonger la diffusion de l'indométacine à travers la peau et d'améliorer ainsi son activité anti-inflammatoire *in vivo* [279]. D'autres vésicules catanioniques bioactives ont été développées pour l'administration cutanée de la prométhazine, un antihistaminique, et ont assurées également sa libération contrôlée et prolongée [280]. Ces deux inventions, menées en collaboration avec la société Pierre Fabre Dermo-Cosmétique, ont été brevetées [281,282].

Un tensioactif tricaténaire catanionique, formé par l'assemblage d'un tensioactif cationique dérivé de sucre, biocompatible, et d'un tensioactif anionique, désigné par « TriCat » a été par la suite développé et optimisé [269,283]. En solution aqueuse, le TriCat (**Figure 36**) s'auto-associe spontanément pour former des vésicules catanioniques, qui ont montré leur efficacité à encapsuler des principes actifs hydrophiles (dans la cavité aqueuse) et hydrophobes ou amphiphiles (dans la bicouche de tensioactifs) [284,285].

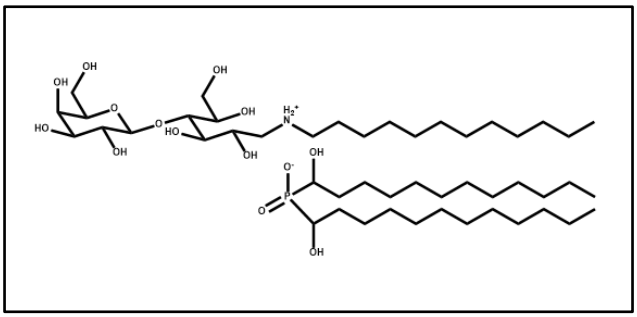


Figure 36. Structure chimique du TriCat.

De plus, les vésicules catanioniques de TriCat ont montré leur capacité à interagir avec la membrane cellulaire de différents types de cellules, notamment celle des kératinocytes et des monocytes/macrophages, par des processus actif (endocytose) et passif (fusion membranaire) [284,286]. Cette fusion spontanée avec les membranes lipidiques a été confirmée également dans des modèles de membrane lipidiques (GUV) [286,287].

Très récemment, Richard *et al.* ont montré que l'éthanol, et des molécules hydrophobes, comme le dipropionate de bétaméthasone, en s'intercalant dans la bicouche de TriCat, permettent de contrôler la température de transition de phase de la membrane des vésicules pour la rendre fluide à la surface de la peau [288,289]. Cette fluidité des vésicules a permis par la suite d'améliorer la perméation cutanée de molécules modèles dont nous reparlerons dans l'introduction de la partie II du chapitre Résultats.

Résumé

En conclusion, plusieurs stratégies, actives et passives, ont été développées afin d'améliorer la pénétration par voie cutanée d'une quantité suffisante de la substance active pour agir et induire par la suite un effet thérapeutique. Cependant, malgré leur efficacité, leur effet toxique vis-à-vis de la peau, le prix de la matière première, la complexité de la méthode de préparation, ou l'instabilité thermodynamique de la plupart de nanovecteurs limitent leur utilisation. Les vésicules catanioniques dérivées de sucre, quant à elles, sont des systèmes d'administration présentant une innocuité avérée, peu chers, simples à mettre en œuvre, stables et efficaces pour l'administration cutanée de molécules actives. C'est donc ce type de vecteur qui va nous intéresser dans la deuxième partie de notre étude.

Chapitre 2 : Résultats

Partie I: Résultats publiés

Article: An Anti-Inflammatory Poly(PhosphorHydrazone) Dendrimer Capped with AzaBisPhosphonate Groups to Treat Psoriasis

Ranime Jebbawi, Abdelouahd Oukhrib, Emily Clement, Muriel Blanzat, Cédric-Olivier Turrin, Anne-Marie Caminade, Eric Lacoste, Séverine Fruchon and Rémy Poupot

Biomolecules. 2020 Jun 23;10(6):949. doi: 10.3390/biom10060949.

Résumé

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, le développement de la plaque psoriasique érythémateuse, squameuse et épaisse n'est pas dû uniquement à l'hyperprolifération anormale des kératinocytes mais résulte aussi de leur interaction, au travers d'un réseau de cytokines et chimiokines, avec les acteurs du système immunitaire.

Les traitements anti-psoriasiques disponibles sur le marché (*cf* chapitre 1 partie **4**), en agissant sur une ou plusieurs cibles thérapeutiques du psoriasis, ont montré leur efficacité pour atténuer les symptômes et ralentir la progression de la maladie. Cependant, leur utilisation à long terme, en raison du caractère chronique du psoriasis, présente des coûts élevés et des effets secondaires délétères qui affectent l'observance du traitement prescrit chez les patients. Afin d'améliorer la qualité de vie des patients psoriasiques, l'industrie pharmaceutique s'oriente vers deux propositions : soit le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, soit l'optimisation de médicaments déjà existants en utilisant un vecteur médicamenteux (*cf* chapitre 1 partie **7.3.3)**.

La première partie de notre travail de recherche a consisté à évaluer le potentiel d'une nouvelle molécule thérapeutique, le dendrimère ABP, dans un modèle murin de psoriasis. En effet, le dendrimère ABP, comme détaillé dans la partie bibliographique, a déjà fait preuve d'une efficacité prometteuse dans le contrôle de l'inflammation dans plusieurs modèles murins de maladies inflammatoires chroniques [130,131]. De plus, les propriétés anti-inflammatoires du dendrimère ABP sont dirigées vers les cellules immunitaires qui jouent un

rôle important dans la physiopathologie du psoriasis : les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T (*cf* chapitre 1 partie **5.2.2.1**). Nous avons donc évalué le potentiel thérapeutique du dendrimère ABP dans un modèle murin reconnu de psoriasis, induit par l'application cutanée de l'IMQ (*cf* chapitre 1 partie **6**).

Dans un premier temps, nous avons évalué, avec la société MD Biosciences, l'effet du dendrimère ABP administré par voie intraveineuse. Le dendrimère ABP a été administré dans une solution de PBS à la dose de 10 mg/kg tous les 3 jours, protocole préventif déjà utilisé dans le modèle murin de la sclérose en plaque [130]. L'injection du dendrimère ABP par voie intraveineuse à la dose choisie n'a eu aucun effet sur la progression et la sévérité des lésions psoriasiques. Bien que le dendrimère soit injecté par voie systémique et malgré l'hypervascularisation des plaques psoriasiques induites par l'IMQ, il se peut que la progression des lésions psoriasiques dans ce modèle de courte durée soit trop rapide et agressive pour pouvoir détecter un effet par voie systémique avec uniquement trois injections d'ABP.

Dans un second temps, nous avons évalué l'administration du dendrimère ABP par voie cutanée, vu que la physiopathogenèse du psoriasis est localisée principalement dans le tissu cutané. Avant d'évaluer l'effet d'ABP par voie cutanée dans le modèle murin de psoriasis, nous avons d'abord évalué sa capacité à pénétrer dans la peau murine psoriasique induite par l'IMQ *ex vivo*. Nous avons montré que le dendrimère ABP est capable de traverser le *stratum corneum* et de pénétrer profondément dans la peau murine psoriasique. En collaboration avec la société Imavita, nous avons montré qu'une application cutanée journalière d'ABP dans un tampon physiologique (PBS), sans formulation particulière, que ce soit à 5 ou 50 mg/kg, réduit significativement les scores cliniques observés au niveau de la peau. Ces résultats cliniques ont été confirmés par une étude histologique qui a montré une amélioration des aspects histopathologiques du psoriasis dans les groupes traités par le dendrimère ABP : une réduction de l'acanthose, de la parakératose, de l'hyperkératose, une persistance de la couche granuleuse et une diminution de l'infiltrat constitué par les cellules inflammatoires. Enfin, afin de déterminer l'action du dendrimère ABP sur les types cellulaires constituant l'infiltrat inflammatoire cutané, nous avons réalisé plusieurs marquages immunohistochimiques sur les coupes de la peau du dos des souris traitées ou non traitées par le dendrimère ABP. Nous avons ainsi détecté que le traitement par le dendrimère ABP affecte les macrophages (cellules F4/80^{+}) en diminuant d'une façon significative leur

recrutement dans la peau. De plus, nous avons détecté une tendance vers une diminution de l'infiltration des lymphocytes T dans la peau (cellules $CD3^+$), quoique la différence soit non-significative par rapport aux souris non traitées par l'ABP. Par contre, aucune différence n'a été détectée au niveau des PNN (cellules Ly-6G/Ly-$6C^+$) entre les souris traitées et non traitées par l'ABP. La quantification des cellules dendritiques, quant à elle, n'a pas été réalisée dans notre étude. Néanmoins, il serait intéressant de la réaliser dans les prochaines expériences afin d'évaluer l'effet de l'ABP sur cette population immunitaire dans la peau psoriasique.

En conclusion, ces premiers résultats mettent en avant pour la première fois l'efficacité du dendrimère ABP pour le traitement du psoriasis par voie cutanée. Toutefois, cette efficacité thérapeutique d'ABP doit être améliorée. Comme il ressort de la bibliographie qu'une telle molécule, en raison de ses groupements anioniques et de sa taille moléculaire élevée, ne devrait passer que très difficilement la structure complexe du *stratum corneum*, nous avons cherché à maximiser ses effets thérapeutiques par sa formulation dans des vésicules catanioniques de TriCat.

biomolecules

MDPI

Article

An Anti-Inflammatory Poly(PhosphorHydrazone) Dendrimer Capped with AzaBisPhosphonate Groups to Treat Psoriasis

Ranime Jebbawi [1,2], Abdelouahd Oukhrib [3,4], Emily Clement [1], Muriel Blanzat [2], Cédric-Olivier Turrin [3,4], Anne-Marie Caminade [3,4], Eric Lacoste [5], Séverine Fruchon [1] and Rémy Poupot [1,*]

1 INSERM, U1043, CNRS, U5282, Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, F-31300 Toulouse, France; ranime.jebbawi@inserm.fr (R.J.); emily.clement@inserm.fr (E.C.); severine.fruchon@inserm.fr (S.F.)

2 CNRS, UMR 5623, Université de Toulouse, UPS, Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique, IMRCP, 118 route de Narbonne, CEDEX 9, F-31062 Toulouse, France; blanzat@chimie.ups-tlse.fr

3 CNRS, UPR 8241, Laboratoire de Chimie de Coordination, 205 route de Narbonne, BP 44099, CEDEX 4, F-31077 Toulouse, France; abdelouahd.oukhrib@lcc-toulouse.fr (A.O.); cedric-olivier.turrin@lcc-toulouse.fr (C.-O.T.); anne-marie.caminade@lcc-toulouse.fr (A.-M.C.)

4 LCC-CNRS, Université de Toulouse, CNRS, 31400 Toulouse, France

5 Imavita S.A.S., Canal Biotech 1, 3 rue des Satellites, Parc Technologique du Canal, F-31400 Toulouse, France; eric.lacoste@imavita.com

* Correspondence: remy.poupot@inserm.fr; Tel.: +33-562-748-661

Received: 5 May 2020; Accepted: 15 June 2020; Published: 23 June 2020

Abstract: Dendrimers are nanosized, arborescent macromolecules synthesized in a stepwise fashion with attractive degrees of functionality and structure definition. This is one of the reasons why they are widely used for biomedical applications. Previously, we have shown that a poly(phosphorhydrazone) (PPH) dendrimer capped with anionic azabisphosphonate groups (so-called ABP dendrimer) has immuno-modulatory and anti-inflammatory properties towards human immune cells in vitro. Thereafter, we have shown that the ABP dendrimer has a promising therapeutic efficacy to treat models of acute and chronic inflammatory disorders in animal models. In these models, the active pharmaceutical ingredient was administered systematically (intravenous and oral administrations), but also loco-regionally in the vitreous tissue. Herein, we assessed the therapeutic efficacy of the ABP dendrimer in the preclinical mouse model of psoriasis induced by imiquimod. The ABP dendrimer was administered in phosphate-buffered saline solution via either systemic injection or topical application. We show that the topical application enabled the control of both the clinical and histopathological scores, and the control of the infiltration of macrophages in the skin of treated mice.

Keywords: dendrimer; drug candidate; imiquimod mouse model; inflammation; phosphonate; preclinical efficacy; psoriasis; topical application

1. Introduction

The World Health Organization (WHO) describes psoriasis as "a chronic, non-communicable, painful, disfiguring, and disabling disease for which there is no cure, and with great negative impact on patients' quality of life" [1]. Its prevalence in developed countries is around 3%, for which more than 100 million people are affected worldwide. After decades of basic and clinical research, the physio-pathological mechanisms of this skin disorder remain controversial [2,3]. Alternatively,

genetic, environmental, and auto-immune factors have been proposed as starting points of psoriasis. It is likely that all of these factors aggregate at the onset, and then nurture the development and the maintenance of the disease. Despite the fact that psoriasis is not considered a true auto-immune disease [4], clinical and pathological correlations have shown similarities with other auto-immune diseases. Indeed, the implication of pro-inflammatory T cells and innate immune cells such as monocytes and dendritic cells infiltrating the dermis, as well as pro-inflammatory relays between them, are reminiscent of auto-immune chronic inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and Crohn's disease [5]. These relays lead to the production, inter alia, of pro-inflammatory and inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-1β, IL-22, and IL-17. Moreover, some of these inflammatory mediators stimulate the proliferation of keratinocytes, which in turn sustain the immune dysregulation of the skin [6]. This general inflammatory background in the skin is responsible for a thickening of both the epidermis (acanthosis) and the stratum corneum (SC, hyperkeratosis). The accelerated renewal of keratinocytes at the SC level is accompanied by a lack of their terminal differentiation, as evidenced by the persistence of their nucleus in the upper layers of the SC (parakeratosis) [2]. As a consequence, the barrier function of the skin is strongly impaired, leading to itch, pain, and bleeding at the psoriatic plaques. Treatment of psoriasis relies on a graduated strategy to resolve inflammation during the crises [3]. The local administration of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) or steroidal cortisone-like drugs is one of the most common prescription for mild to moderate psoriasis. Moderate to severe forms may require phototherapy and/or systemic immuno-suppressive drugs. The latter are mainly engineered injectable biologics that selectively target immune cells or signaling mediators (typically monoclonal antibodies or soluble receptors). Although they have proved their efficacy, some patients do not respond to these therapies, while others develop adverse effects leading to discontinuation across biologic treatments [7,8]. They are also often criticized due to their cost. Therefore, there is an unmet clinical need for the treatment of psoriasis, and innovative therapeutic approaches have to be proposed [3].

Animal models are of great help both to decipher the pathophysiological mechanisms of diseases and to assess new therapeutic approaches. Several animal models of inflammatory diseases of the skin have been developed, especially in mice [9], with some of them developing psoriasis-like burden [10]. One of the most recent and most commonly used is the imiquimod (IMQ)-induced psoriasis-like mouse model [11]. The repeated topical application of IMQ on the shaved skin of mouse causes skin inflammation, leading to cutaneous manifestations reminiscent of that of human psoriasis. The mechanisms underlying these clinical features are complex, involving the concomitant activation of several immune cells [12], as well as oxidative stress [13].

Like for many other biomedical purposes, nanotechnology is thoroughly explored for dermatological applications [14]. In psoriasis, nanoformulations of existing drugs, especially of small organic molecules such as methotrexate or analogues of vitamin D, have been developed and assessed with the aim of enhancing the permeability of skin, and thereby improving the efficacy of these drugs. These nanoformulations with therapeutic cargos are lipid or synthetic polymeric nanostructures [15]. Among the latter, dendrimers are hyperbranched, multivalent, and polyfunctional nanodevices that can optimize targeting of anti-psoriasis drugs to relevant epidermal and dermal sites [16]. Dendrimers are synthesized in a stepwise fashion. Generally, low generation dendrimers have a perfectly defined structure. They are a promising alternative to poorly defined nanoparticles, such as linear polymer or metallic nanoparticles, for biomedical development. Dendrimers are designed from a central core to which one or several series of branched monomers are linked. Each monomer is ended by a branching point that enables the dendritic growth of the molecule by addition of the next generation of branched monomers, leading to a "tree-like" structure. The synthesis ends with the addition of functional groups on the last-added series of branched monomers. The total number of series of branched layers determines the generation of the dendrimer [17]. A few types of dendrimers have shown anti-inflammatory properties per se in chronic and acute inflammatory animal models [17,18]. On our side, we have shown that phosphorus-based dendrimers of the poly(phosphorhydrazone) (PPH) series,

capped with azabisphosphonate groups, have strong immuno-modulatory and anti-inflammatory effects. The "lead" candidate in the PPH series is a first-generation dendrimer capped with 12 azabisphosphonate (ABP) groups; therefore, it is called the ABP dendrimer (Figure 1).

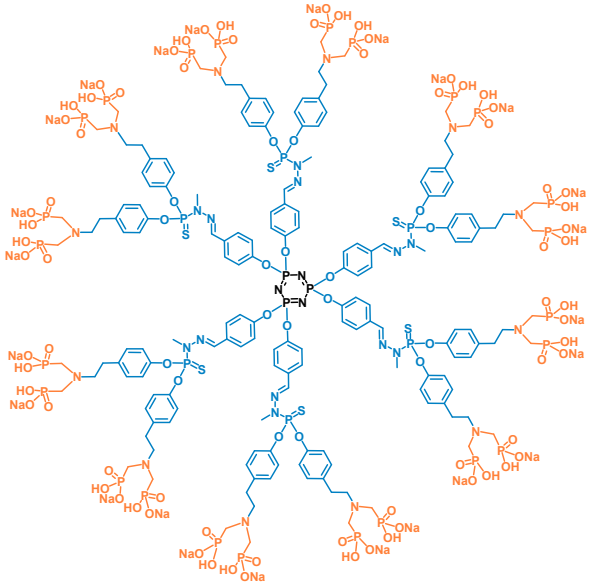


Figure 1. Two-dimensional structure of the azabisphosphonate (ABP) dendrimer. The cyclotriphosphazene core (N_3P_3) is in black, and the poly(phosphorhydrazone) (PPH) branched monomers (including the point of divergence) are in blue. The tyramine-based (in blue) ABP surface groups are in orange.

We have shown that the ABP dendrimer is able to control chronic and acute inflammatory disorders in animals [19–21]. As a common feature, we have shown that these therapeutic effects rely on the activation of IL-10-producing immune cells [22]. The cellular mechanisms underlying these therapeutic effects involves the anti-inflammatory activation of monocytes/macrophages [23] and dendritic cells [24], and the control of the proliferation of pro-inflammatory CD4+ T cells [25] together with the induction of regulatory CD4+ T cells producing IL-10 [23]. Moreover, we have also shown that the same dendrimer is able to promote the proliferation of the anti-tumor Natural Killer (NK) cells [26]. Regarding the structure/activity relationships of PPH dendrimers, we have shown that the chemical composition of the surface [27,28] and the global three-dimensional structure [29,30] of the molecule are key determinants of the bioactivity.

Here, we challenged the immuno-modulatory and anti-inflammatory properties of the ABP dendrimer in the IMQ-induced mouse model of psoriasis. We show that the topical application of the molecule can control the disease from clinical, histopathological, and immunological points of view.

2. Materials and Methods

2.1. Synthesis of the ABP Dendrimer

The ABP dendrimer used in this study was synthesized at the "Laboratoire de Chimie de Coordination" (Toulouse, France), and its synthesis has been already described [31]. The near infra-red (NIR) fluorescent analogue ABP-NIR was afforded by the "Laboratoire de Chimie de Coordination" (A. Oukhrib, A.M. Caminade, C.O. Turrin).

2.2. Animals

Studies in animals were conducted in accordance with the principles and procedures outlined by the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimentation. The mice

were housed in groups of 5 in plastic cages in an air-conditioned room (temperature of 22 ± 2 °C and relative humidity of 50 ± 15%) with 12 h artificial light/12 h dark. Food and drinking water were provided ad libitum.

Male Balb/c mice of 9 to 10 weeks of age were obtained from Janvier (Saint-Berthevin, France) and were acclimatized before starting the experimentation. The in vivo design and procedures were assessed and approved by the local Anexplo Ethical Committee. All animals were managed similarly, with due regard for their well-being, according to prevailing practices. The appearance and behavior of animals were assessed at least daily from the start and until termination of the in vivo study. A clinical score was evaluated every day for each animal. This clinical score was based on three criteria: erythema, scaling, and thickness of the skin. Each criterion was quantified with a 1 to 5 scale: 1 corresponds to "normal", 2 to "slight", 3 to "moderate", 4 to "important", and 5 to "very important". It was decided before the study that the following ethical points would be checked daily: hydration and feeding default on a period of 24 h to 48 h, weight loss >20%, hypothermia observed with hypoactive animal, dyspnea with increased respiratory movement, skin wound observed purulent, necrotic or exudative; clinical score at 12 for 3 consecutive days. If one of these endpoints was observed on one animal, the animal would have been euthanized immediately.

For the study, the animals were shaved and depilated (using a commercial depilatory cream) on the back at day -1. Then, the induction of psoriasis was performed on animals by daily administration, from day 0 to day 6 in the morning, of 4 mg of IMQ (equivalent to 80 mg of Aldara 5% cream, Meda AB, Sweden) on the skin of the back of animals. The surface of application was about 4 cm^2 on the back of the animals, which corresponded to a rectangle of about 1.5 by 2.5 cm. After the deposition of the IMQ-containing cream, it was smoothly massaged with a gloved finger for 5 to 10 seconds. The intravenous (IV) injection of the ABP dendrimer was performed every 3 days (at day 1, 4, and 7) at 10 mg/kg, whereas the topical administration was performed daily, in the afternoon, from day 0 to day 6 by deposition of a volume of 90 μL (equivalent to the two doses of 5 and 50 mg/kg) of the ABP dendrimer in phosphate-buffered saline (PBS) and massage. The ABP dendrimer is highly soluble in aqueous solutions (over 1 g/mL). Therefore, it was completely solubilized in PBS at the highest dose used in this study (deposition volume at a concentration of ABP ≈ 16 mg/mL for the dose at 50 mg/kg, depending on the weight of each mouse). For the study based on IV injections of the ABP dendrimer, we euthanized the mice at day 10, whereas for the study based on topical administration of the ABP dendrimer, we euthanized the mice at day 7.

2.3. Skin Penetration Study

The ex vivo study of the penetration of dendrimers on IMQ-induced psoriatic skins was conducted using Franz diffusion cells with a diffusion area of 1.77 cm^2 (PermeGear, Hellertown, PA, USA). The induction of psoriatic skin by IMQ on the back of mice was achieved as described above. After 5 or 7 days, we sacrificed the animals, and the diseased skin of the back was excised and stored at −80 °C until use. Before the permeation experiment, we thawed the skins to room temperature and then mounted them between the donor and receptor compartments of the Franz diffusion cell with the SC facing the donor compartment. The near infra-red fluorescent analogue (ABP-NIR) of the ABP dendrimer was used for visualizing its penetration in the diseased skin. A solution of the ABP-NIR dendrimer in PBS with a concentration corresponding to the dose of 50 mg/kg was prepared and deposited all over each skin in the donor compartment. A control assay was performed with deposition of PBS on the skin from the back of mice to establish the normal fluorescence of the tissues. The receptor compartment was filled with 12 mL PBS and stirred at 300 rpm. After a 24 h incubation at a temperature of 37 ± 1 °C, we removed the skins and carefully washed them with PBS, and then froze them at −80 °C in an optimal cutting-temperature compound (isopentan). We then cut 10 μm thick cryo-sections from the skin samples using a cryostat (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany), and we mounted them using ProLong Gold anti-fade reagent with DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) for nuclear staining. Images of 512 × 512 pixels were acquired

with a 63X immersion objective on a Leica SP8 confocal microscope. For the detection of the ABP-NIR dendrimer, the excitation wavelength was 635 nm and the emission wavelengths were between 650 and 800 nm. Images were processed using ImageJ software.

2.4. Histopathology

Excised dorsal skins were fixed for 24 h in 4% (*w*/*v*) buffered formalin and embedded in paraffin. Then, 5 µm sections from which paraffin had been removed were stained using routine histological hematoxylin/eosin staining. Images were obtained with a Panoramic Slide Scanner 250 (3DHISTECH, Budapest, Hungary), and all slides were scanned at 40X magnification. Histological analysis and scoring of the slides were performed on the whole section. The histological score was based on the six following parameters: acanthosis, hyperkeratosis, parakeratosis, absence of granular layer, presence of Munro's micro-abscesses, and infiltration of immune cells. For each, a score ranging from 0 to 1 (0: none; 0.5: moderate; 1: marked) was given and these scores were cumulated to give the histological score of the back.

2.5. Immunohistochemistry

After antigen retrieval using either heat-induced epitope retrieval (HIER) in citrate buffer (pH = 6) for T cells and neutrophils, or proteinase K (R.T.U., S3020, Dako) for macrophages, we incubated sections with the following antibodies: the rabbit monoclonal anti-CD3 clone SP7 diluted at 1:200 (ab16669, Abcam) at room temperature (RT) for 1 h, the rat monoclonal anti-polynuclear neutrophil (PNN) marker clone 64608 diluted at 1:200 (sc-71674, Santa-Cruz) at 4 °C overnight, and the rat monoclonal anti-F4/80 clone Cl:A3-1 diluted at 1:100 (MCA497GA, AbD Serotec) at RT for 1 h. Sections were then incubated for 30 min at RT with biotinylated goat-anti-rabbit diluted at 1:250 (R.T.U., BP-9100, Vector Laboratories), or goat-anti-rat diluted at 1:50 (STAR113P, Bio-Rad) secondary antibodies followed by incubation with horseradish peroxidase (HRP) (R.T.U., PK-7100, Vector Laboratories) for 30 min. Diaminobenzidine (SK-4105, Vector Laboratories) was used to reveal the staining, followed by blue hematoxylin counterstaining.

Quantification of immunohistochemistry staining was done in 5 zones of similar areas in all sections of dorsal skin. HistoQuant software (3DHISTECH) was used to quantify the number of CD3+ T lymphocytes and PNN per area (cells/mm^2), and DensitoQuant software (3DHISTECH) was applied to calculate the percentage of all F4/80-positive pixels (sum of weak, moderate, and strong positive pixels divided by the total number of pixels).

2.6. Statistical Analyses

All statistical analyses were performed with Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). The homogeneity of the variances of the 3 groups was analyzed using the Bartlett's parametric test. For Figure 4C,D and Figure 6A–C, we verified the homogeneity of the variances. Therefore, the one-way ANOVA test was used followed by the post hoc Dunnett's test to evidence statistically significant differences. On the contrary, for Figure 5D,E, we found the variances to not be homogeneous. Therefore, we applied the non-parametric Kruskal–Wallis' test followed by the post hoc Dunn's test to evidence statistically significant differences.

3. Results

3.1. Clinical Assessment of the Efficacy of the ABP Dendrimer

In a first assay using the mouse model in which psoriasis-like disease is induced by daily application of IMQ on the dorsal skin of mice, we administered the ABP dendrimer via the systemic IV route of administration. The ABP dendrimer was injected at 10 mg/kg at days 1, 4, and 7 (Figure 2A). The clinical score was assessed daily from day 0 until day 10, and no difference was observed between the two groups of mice during the assay. Results obtained at day 10 are shown in Figure 2B.

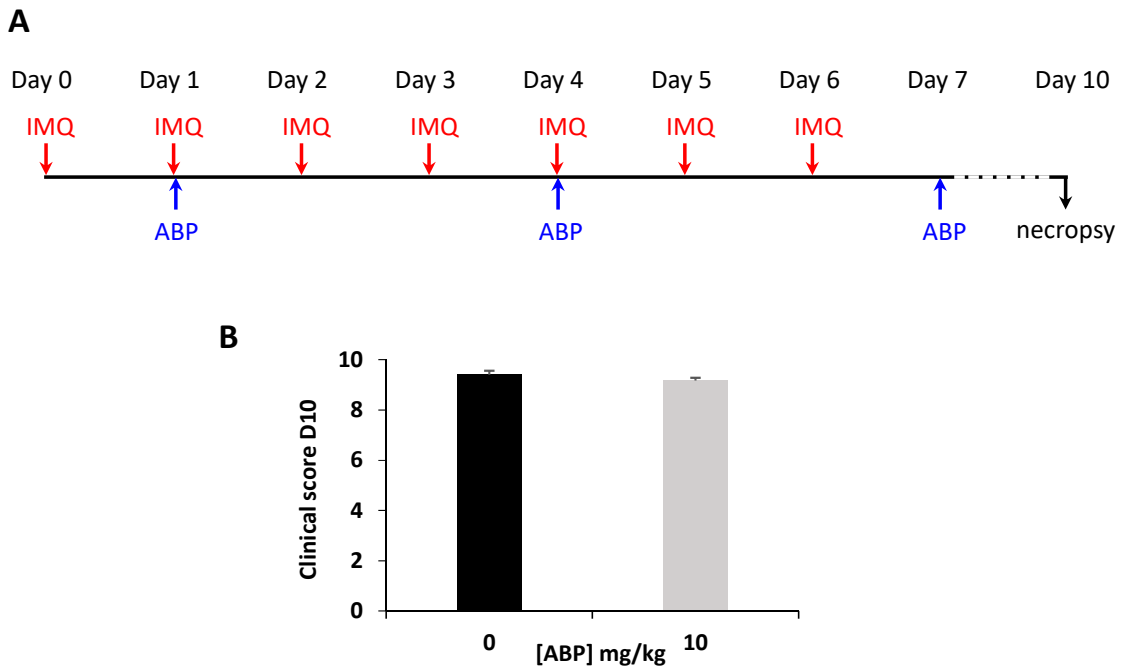


Figure 2. Clinical assessment of the efficacy of the ABP dendrimer when administered intravenously to imiquimod (IMQ)-induced psoriatic mice. (**A**) Time line of the study. (**B**) Clinical score at day 10 for control psoriatic mice (black bar) and mice treated with 10 mg/kg of the ABP dendrimer every 3 days (n = 10 mice in each group).

Then, in a second assay, we moved to topical administration of the ABP dendrimer. Prior to the study, we assessed the capability of the ABP dendrimer to permeate the skin of IMQ-induced psoriatic mice. We took advantage of an already available fluorescent analogue of the ABP dendrimer that emits near infra-red fluorescence thanks to the presence of a polymetine-based mega-Stokes dye in place of one of the six branches of the ABP dendrimer (the so-called ABP-NIR dendrimer) [32]. The near infra-red fluorescence does not overlap auto-fluorescence of the tissues. Diseased skins were excised from the back of mice at days 5 and 7. Using a Franz diffusion cell, we tested the penetration of the ABP-NIR dendrimer at the highest dose intended for the topical application of the ABP dendrimer (50 mg/kg). To better appreciate the penetration of the ABP-NIR dendrimer in the skin, we imaged co-staining of the ABP-NIR dendrimer and DAPI, a nuclear fluorescent probe. Figure 3A shows the normal fluorescence of the skin tissues at the wavelengths used for imaging. After both 5 days (Figure 3B, two mice) and 7 days (Figure 3C, two mice), the ABP-NIR dendrimer penetrated the psoriatic skin beyond the SC with a clear co-localization with the nucleated cells of epidermis and dermis.

For the assay with topical application, we chose two doses of the ABP dendrimer, which were administered daily via massage of the skin of the back (5 and 50 mg/kg in PBS) (Figure 4A). Figure 4B presents representative pictures of the dorsal skin of mice. These pictures reveal a perceivable visual improvement of the skin of treated mice when compared to control psoriatic mice, especially in the group treated at the lower dose. The skin looked thinner and there were significantly less scales. Indeed, the clinical score at day 6 was significantly lower with either doses of the ABP dendrimer, with the difference being more significant at 5 mg/kg (Figure 4C). The cumulative scores from day 0 to day 7 also showed the same statistically significant differences between the control psoriatic group and the treated groups (Figure 4D).

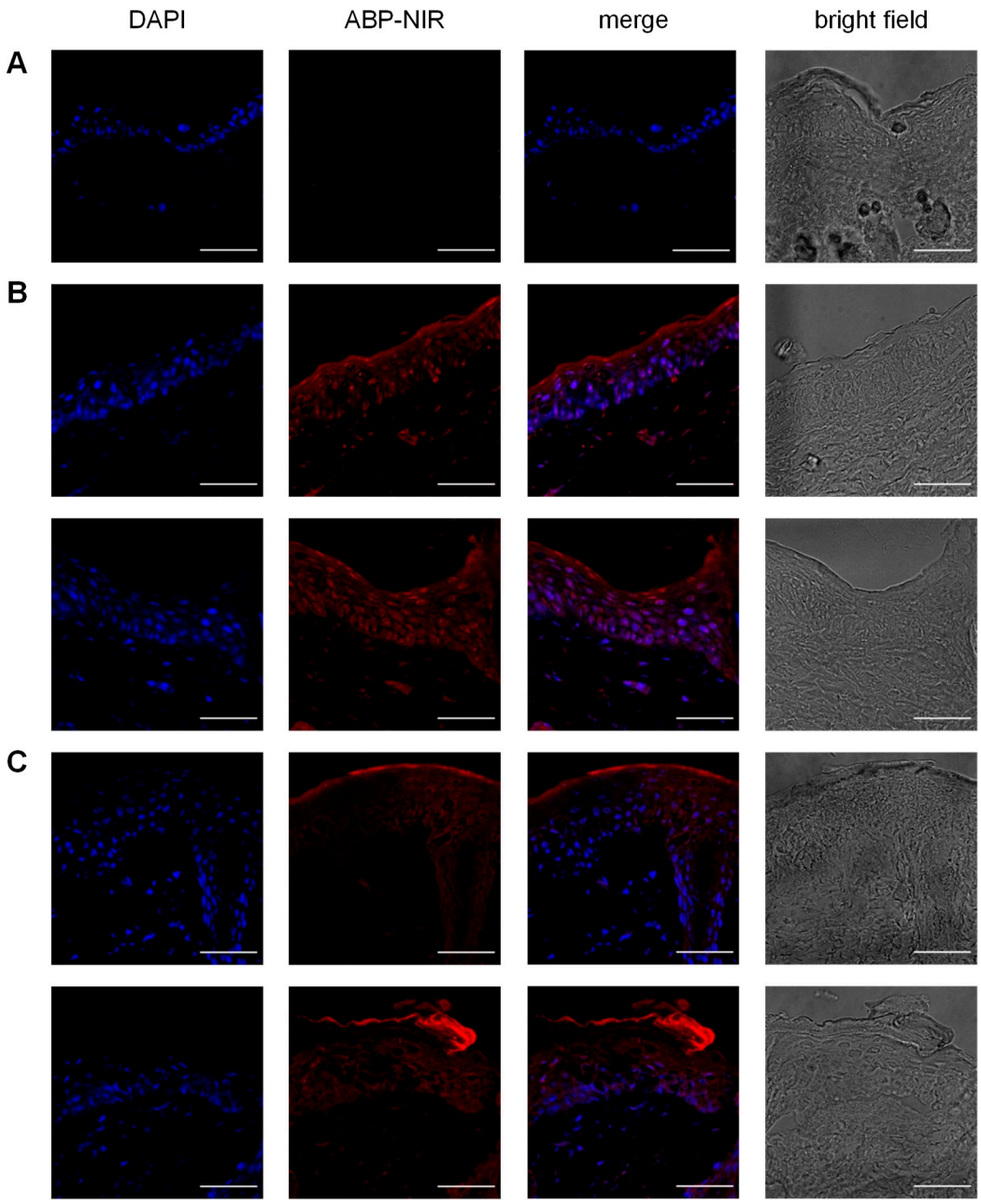


Figure 3. Penetration of the IMQ-induced psoriatic skin by the near infra-red (NIR) ABP-NIR dendrimer, a fluorescent analogue of the ABP dendrimer. First column shows the nuclear 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining, second column shows the near infra-red fluorescence of the ABP-NIR dendrimer, third column shows the merge of the first two columns, and last column shows bright field imaging of (**A**) skin incubated with phosphate-buffered saline (PBS; control), and (**B**) day 5 and (**C**) day 7 psoriatic skins incubated with the ABP-NIR dendrimer (two mice each). Scale bars represent 50 μm.

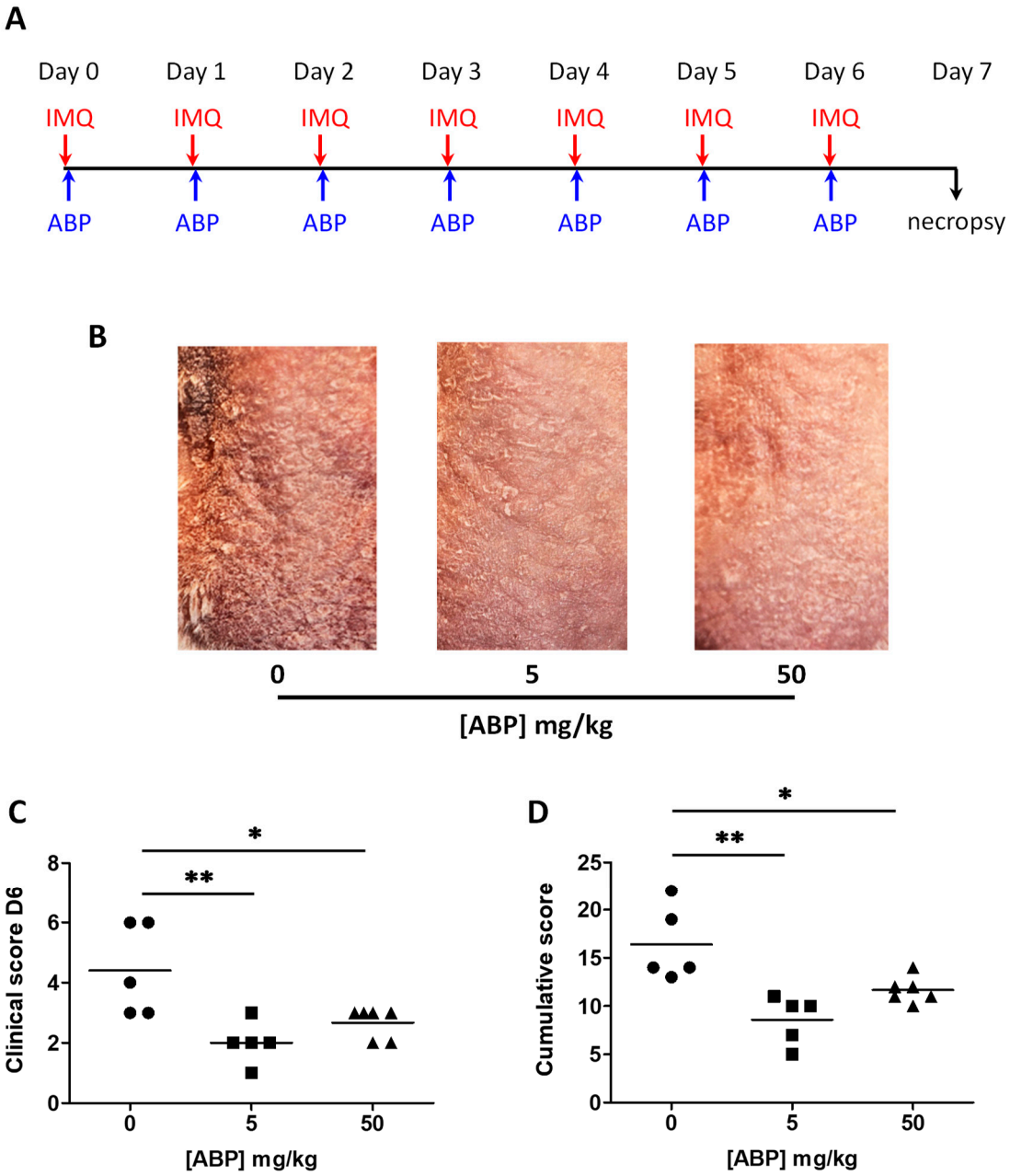


Figure 4. Clinical assessment of the efficacy of the ABP dendrimer when administered topically to IMQ-induced psoriatic mice. (**A**) Time line of the study. (**B**) Representative pictures of the skin of the back of mice. On the left, control psoriatic mouse; in the middle and on the right, mouse treated daily with 5 mg/kg and 50 mg/kg of the ABP dendrimer, respectively. (**C**) Clinical score at day 6 for each group of mice (n = 5 mice in the control group at a concentration of ABP = 0 mg/kg, n = 5 mice for the group at 5 mg/kg, and n = 6 mice for the group at 50 mg/kg). (**D**) Cumulative clinical score from day 1 to day 7 for each group of mice. * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$ versus untreated mice (concentration of ABP = 0 mg/kg) using the one-way ANOVA test followed by the post hoc Dunnett's test.

3.2. Histological Assessment of the Efficacy of the ABP Dendrimer

At day 7, mice were sacrificed and the dorsal skin was excised for histological analysis after hematoxylin/eosin staining. Figure 5A shows the classical histopathological features of a psoriatic skin. At the SC level, hyperkeratosis (thickening of the SC), parakeratosis (retention of nuclei in the upper layers of keratinocytes of the SC), and a diminished granular layer at the basis of SC were noticeable. However, Munro's micro-abscesses were scarce. At the epidermal level, acanthosis

(diffuse epidermal hyperplasia), and spongiosis (intercellular edema) were observed, with both being responsible for a thickening of the epidermis. Finally, at the dermal level, a dense infiltration of immune cells was evidenced.

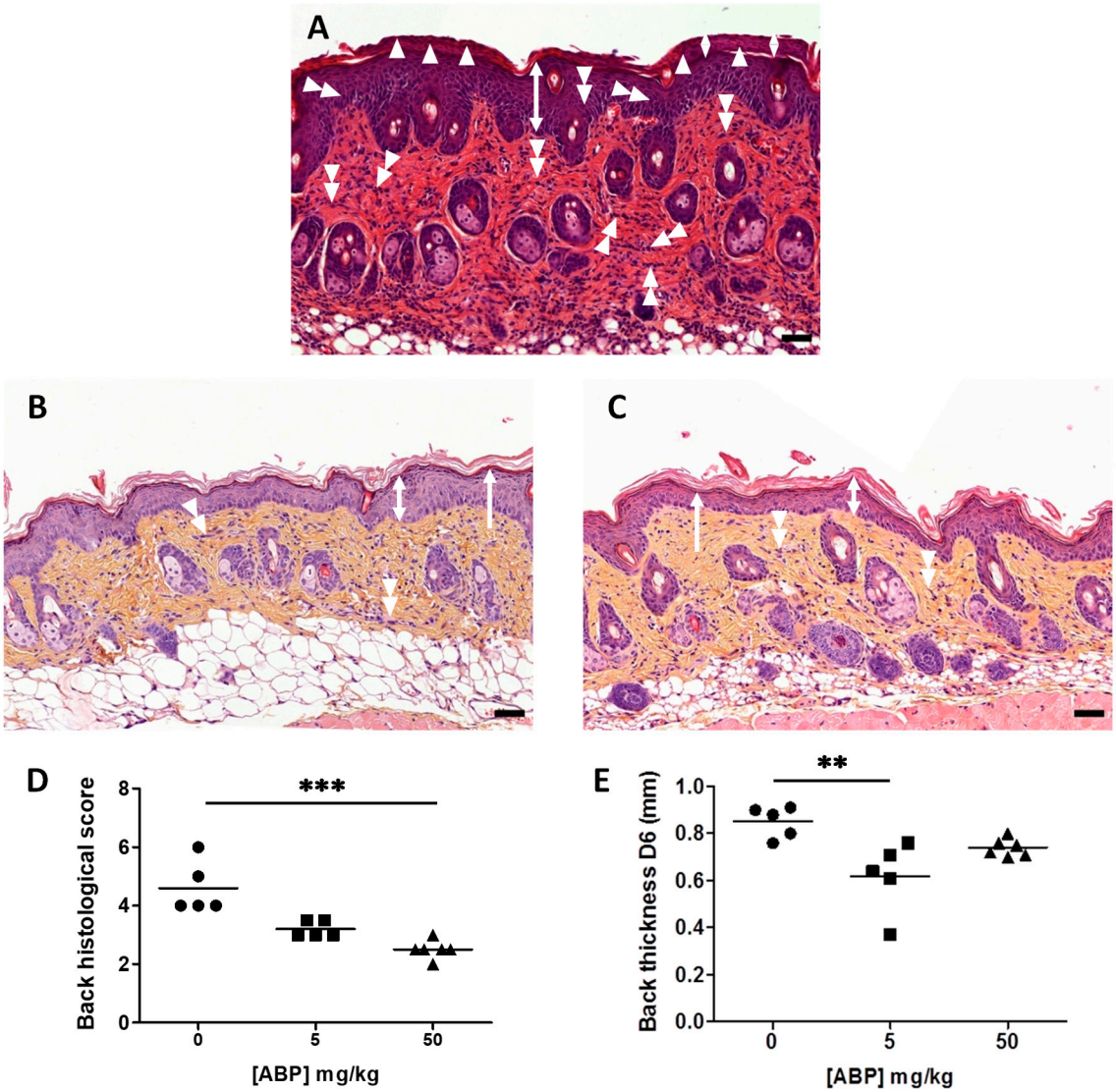


Figure 5. Histological assessment of the efficacy of the ABP dendrimer when administered topically to IMQ-induced psoriatic mice. Representative pictures of the skin of the back of mice stained with hematoxylin/eosin at day 7 from psoriatic control mouse (representative of $n = 5$ mice) (**A**), and from mice treated daily with 5 mg/kg (representative of $n = 5$ mice) (**B**) and 50 mg/kg (representative of $n = 6$ mice) (**C**) of the ABP dendrimer; black scale bars represent 50 µm. Single-headed arrows point the granular layer (absent in (**A**)), double-headed arrows show acanthosis, single arrow heads show parakeratosis (lowered in (**B**) and (**C**)), diamonds show hyperkeratosis (lowered in (**B**) and (**C**)), double arrow heads show infiltration of immune cells. (**D**) Scoring of the histological assessment of the skin of the back for each group of mice; *** $p < 0.001$ versus untreated mice (concentration of ABP = 0 mg/kg) using the Kruskal–Wallis' test followed by the post hoc Dunn's test. (**E**) Measurement of the thickness of the skin of the back for each group of mice at day 6; ** $p < 0.01$ versus untreated mice (concentration of ABP = 0 mg/kg) using the Kruskal–Wallis' test followed by the post hoc Dunn's test.

The same analysis performed on the dorsal skin of mice treated with the ABP dendrimer underscored a lower hyperkeratosis and no parakeratosis (this combination being defined as orthokeratosis) at the SC level. Moreover, the granular layer was perfectly visible. At the epidermal

level, acanthosis and spongiosis were decreased, whereas at the dermis level, the infiltration of immune cells was weaker (Figure 5B,C). These histopathological features were quantified to establish a histological score for each mouse. Results are presented in Figure 5D and show a statistically significant decrease of the histological score only in the group of mice treated with 50 mg/kg of ABP dendrimer. On the contrary, measurement of the thickness of the skin of the back showed a significant decrease only in the group of mice treated with 5 mg/kg of ABP dendrimer, as reported for day 6 (Figure 5E).

3.3. Immunological Assessment of the Efficacy of the ABP Dendrimer

The skin of the back of mice were also used for the quantification of the infiltration of immune cells by immunohistochemistry. Three immune populations were quantified: F4/80-positive cells (mainly infiltrating macrophages, but also dendritic cells and resident Langerhans' cells [33]), CD3-positive cells (i.e., T lymphocytes), and polynuclear neutrophils (PNN). Considering that the F4/80 staining was very dense and that F4/80-positive cells are spread out and flattened, we decided to quantify them as the ratio of the number of F4/80-positive pixels to the total number of pixels on the slide (Figure 6A).

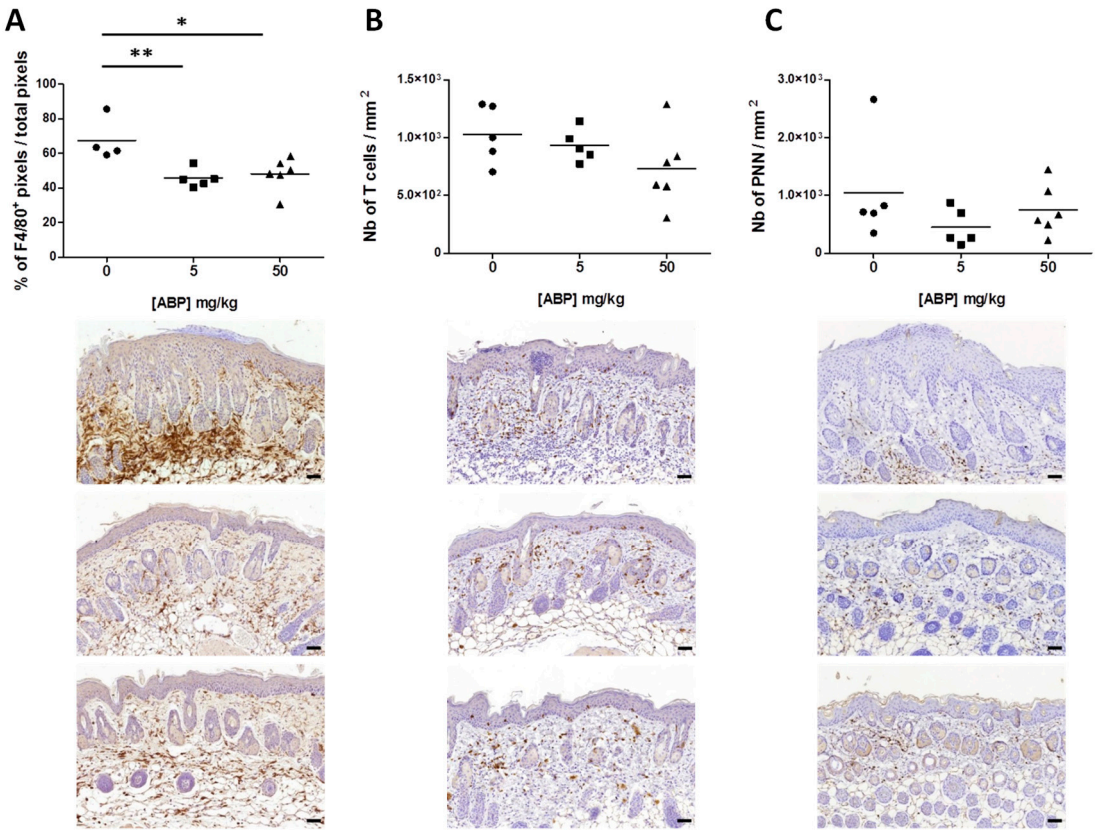


Figure 6. Immunological assessment of the efficacy of the ABP dendrimer when administered topically to IMQ-induced psoriatic mice. Quantification of the infiltration of F4/80-positive cells (mainly macrophages) (**A**), T lymphocytes (**B**), and polynuclear neutrophils (**C**) in the skin of the back of each group of mice (n = 5 mice in the control group at a concentration of ABP = 0 mg/kg, n = 5 mice for the group at 5 mg/kg, and n = 6 mice for the group at 50 mg/kg) by immunohistochemistry; * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$ versus untreated mice (concentration of ABP = 0 mg/kg) using the one-way ANOVA test followed by the post hoc Dunnett's test. Below each graph, representative immunochemistry pictures of the skin of the back of mice at day 7 from psoriatic control mouse, and mice treated daily with 5 mg/kg and 50 mg/kg of the ABP dendrimer, from top to bottom, respectively, are shown; black scale bars represent 50 μm.

For the two other cell populations (T cells and PNN), we were able to perform cell counting, which we reported as the number of cells per square millimeter (Figure 6B,C). Only F4/80-positive cells were statistically decreased in both treated groups of mice, with the decrease being more significant at 5 mg/kg of ABP dendrimer (Figure 6A). Moreover, a slight decrease in the number of T lymphocytes, although not statistically significant, was noticed (Figure 6B). Below each graph of Figure 6, representative pictures of the immunohistochemistry slides from control psoriatic mice, as well as mice treated with both 5 and 50 mg/kg of the ABP dendrimer, are shown.

4. Discussion

For many years, dendrimers have been the subject of applicative research in the biomedical field, mainly as agents for imaging and nucleic acid transfection, and also as drug delivery vectors. More recently, some dendrimers have emerged as efficient drug candidates by themselves, especially for the treatment of inflammatory and infectious contexts [17,34]. In particular, the ABP dendrimer used in this study showed dramatic therapeutic effects in two mouse models of experimental arthritis relevant to rheumatoid arthritis (RA) [19,30], and in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) relevant to multiple sclerosis (MS) [20]. As these two diseases are chronic inflammatory diseases of autoimmune origin, we assessed the therapeutic effect of the ABP dendrimer in a mouse model of psoriasis. However, contrarily to RA and MS, the autoimmune origin of psoriasis remains a key question, and it is now acknowledged that this illness is not a bona fide autoimmune disease [2,4]. In a first attempt with the IMQ-induced psoriatic mouse model, we administered the ABP dendrimer intravenously, as we did before for RA and MS mouse models, at the dose of 10 mg/kg every 3 days. This protocol did not afford any improvement of the disease status. This absence of any beneficial effect was unexpected as the dermis is vascularized, with blood capillaries vascularizing the papillary dermis. This uppermost layer of the dermis is intertwined with the rete ridges of the epidermis that project into the papillary dermis. Moreover, during psoriasis, there is both a distention of existing blood vessels and neovascularization at the papillary dermis level [3]. These pathophysiological features should have favored the IV route of administration. Therefore, someone's first intention could have been to repeat the IV protocol with increasing doses of the ABP dendrimer combined with a higher frequency of administration. However, we assayed the topical route of administration through daily massages with the ABP dendrimer in PBS. We tested two doses of the molecule corresponding to 5 and 50 mg/kg, starting from the initial principle that the active ingredient is totally absorbed through the skin barrier, which was probably not the case. Nevertheless, via the topical route of administration and with either doses, we showed that the ABP dendrimer had a statistically significant therapeutic effect in the IMQ-induced psoriatic mouse model. However, one should notice that, first, there was no advantage of the highest dose of 50 mg/kg, and secondly the efficacy of the ABP dendrimer in this model was not as dramatic as its efficacy shown previously in RA and MS mouse models in which the clinical score was reversed almost back to zero [19,20,30]. This can be explained by the difficulty for the ABP dendrimer to cross the skin barrier in sufficient amounts, even if the latter is known to be impaired in psoriatic skin. Nevertheless, consistent with the clinical score, the histopathological and the immune infiltration analyses confirmed the therapeutic benefit of the ABP dendrimer at both doses of 5 and 50 mg/kg. Indeed, all histopathological features of the disease (hyperkeratosis, parakeratosis, the absence of the granular layer at the SC level, acanthosis, spongiosis, and infiltration of immune cells in the dermis) were improved upon treatment with the ABP dendrimer. There again, there was no advantage of the highest dose.

To our knowledge, this is the first time that the therapeutic effect of a dendrimer per se is shown in a mouse model of psoriasis. However, some dendrimers have been used to enhance the delivery of drugs through the skin barrier. As recently as 2003, Chauhan et al. showed that poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers of the fourth generation (G4) that ended with either $–NH_2$ or –OH functions enhanced the skin permeation of the model hydrophobic drug indomethacin [35]. The dendrimers enable this enhancement as they carry the drug molecules to the surface of the skin in a solubilized

form from which indomethacin will partition to the hydrophobic environment of the SC. It is likely that due to their molecular weight (MW, between 14 and 15 kDa) and hydrophilicity, the G4 PAMAM dendrimers used in this study cannot permeate the skin. Later on, it has been shown that G3 and G4 PAMAM dendrimers also enhance skin permeation of 8-methoxypsoralene, an anti-psoriatic drug used in phototherapy of the disease [36]. More recently, a polypropylene imine (PPI) dendrimer of the fifth generation harboring $–NH_2$ functions at its surface was used to deliver the anti-psoriatic drug dithranol more efficiently, and also to protect the drug from light-induced degradation and the skin from irritation, burning sensation, and staining [16]. This delivery system based on a PPI dendrimer was improved by incorporating it in a microsponge-based gel formulation [37]. This strategy was implemented to overcome the troublesome and inconvenient application of dithranol.

The therapeutic efficacy of an anti-psoriatic drug delivered topically is conditioned by its skin permeation capability. Even if the skin barrier function of psoriatic skin is impaired, we acknowledge that only small hydrophobic molecules can efficiently reach the epidermis and dermis. Nevertheless, the heterogeneous structures of the SC, as well as the delivery vehicle itself, are important to predict the skin permeation of a multicomponent system [38]. Interestingly, it has been shown that diverse PAMAM dendrimers varying in size (i.e., generation), surface function (neutral vs. anionic), and concentration can enhance the permeability of skin when they are applied to the skin before topical administration of a model hydrophilic drug such as 5-fluorouracyl [39]. The same property of a low generation G2 PAMAM dendrimer has been proven, as its application to the skin before the topical administration of salicylic acid enhances the partition of the latter to SC [40]. Salicylic acid has been used for a long time because of its keratolytic effect enabling further penetration of anti-psoriatic drugs [41]. More recently, the skin penetration properties of PAMAM dendrimers have been rationalized [42], concluding that the smallest G2 cationic amine-capped dendrimer (MW = 3256 Da) show deeper penetration of the skin. PAMAM dendrimers are fully hydrophilic compounds. On the contrary, we have shown that PPH dendrimers such as the ABP dendrimer adopt a directional conformation in physiological aqueous medium, unexpectedly exposing their hydrophobic core and branched monomers to the environment [29,30]. This three-dimensional particularity, which should be adequate for the ABP dendrimer to exert its anti-inflammatory effects in the psoriatic skin, is probably counterbalanced by the anionic ABP groups gathered on the other side of the molecule, explaining the moderate therapeutic effect of the ABP dendrimer in the IMQ-induced mouse model of psoriasis.

5. Conclusions

Herein, we show for the first time that a dendrimer has anti-psoriatic therapeutic effects by itself in a mouse model of the disease. The anti-inflammatory ABP dendrimer was found to have therapeutic effects in animal models of acute and chronic inflammatory disorders when it was administered either systematically or loco-regionally. Moreover, its preclinical tolerability and safety profiles in various animal models [32,43] make it a promising candidate for chronic inflammatory diseases, including psoriasis. However, the therapeutic efficacy of the ABP dendrimer to treat psoriatic mouse model has to be increased. For this purpose, smart pre-formulation systems have to be designed and evaluated to enhance the penetration of the drug to the epidermis and dermis of the diseased skin.

Author Contributions: Conceptualization, M.B., C.-O.T., and R.P.; methodology, M.B. and E.L.; validation, S.F. and R.P.; formal analysis, S.F. and R.P.; investigation, R.J., E.C., E.L., and S.F.; resources, A.O., M.B., C.-O.T., and A.-M.C.; writing—original draft preparation, R.P.; writing—review and editing, R.J., M.B., C.-O.T., A.-M.C., E.L., and S.F.; visualization, R.J. and S.F.; supervision, M.B., S.F. and R.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: R.J. is funded with a 3 year PhD fellowship from Région Occitanie and University of Toulouse. O.A. and E.C. are funded with 1 year and 2 year post-doctoral fellowships, respectively, from Agence Nationale de la Recherche (ANR) (program ANR-18-CE18-0011). This research was funded by French institutional organisms (Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the University of Toulouse). The APC was funded by institutions.

Acknowledgments: We thank T. Al Saati and F. Capilla from the Histopathology core facility (INSERM and University Paul Sabatier Service Unit 006, Toulouse, France) for advice and discussion regarding histopathological studies.

Conflicts of Interest: C.-O.T. and R.P. are co-founders and shareholders of IMD-Pharma. A.-M.C. is a shareholder of IMD-Pharma. E.L. is a founder and shareholder of Imavita S.A.S. The other authors declare no conflict of interest.

References

1. The World Health Organization. *Global Report on Psoriasis*; WHO Press: Geneva, Switzerland , 2016.
2. Nestle, F.O.; Kaplan, D.H.; Barker, J. Psoriasis. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *361*, 496–509. [CrossRef]
3. Boehncke, W.H.; Schön, M.P. Psoriasis. *Lancet* **2015**, *326*, 983–994. [CrossRef]
4. Hedrich, C.M. Shaping the spectrum—From auto-inflammation to auto-immunity. *Clin. Immunol.* **2016**, *165*, 21–28. [CrossRef] [PubMed]
5. Nestle, F.O.; Di Meglio, P.; Qin, J.Z.; Nickoloff, B.J. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 679–691. [CrossRef] [PubMed]
6. Martin, G.; Guérard, S.; Fortin, M.M.; Rusu, D.; Soucy, J.; Poubelle, P.E.; Pouliot, R. Pathological crosstalk in vitro between T lymphocytes and lesional keratinocytes in psoriasis: Necessity of direct cell-to-cell contact. *Lab. Invest.* **2012**, *92*, 1058–1070. [CrossRef] [PubMed]
7. Cline, A.; Hill, D.; Lewallen, R.; Feldman, S.R. Current status and future prospects for biologic treatment of psoriasis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **2016**, *12*, 1273–1287. [CrossRef] [PubMed]
8. Menter, A.; Papp, K.A.; Gooderham, M.; Pariser, D.M.; Augustin, M.; Kerdel, F.A.; Fakharzadeh, S.; Goyal, K.; Calabro, S.; Langholff, W.; et al. Drug survival of biologic therapy in a large, disease-based registry of patients with psoriasis: Results from the Psoriasis Longitudinal Assessment and Registry (PSOLAR). *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2016**, *30*, 1148–1158. [CrossRef] [PubMed]
9. Bergers, L.I.J.C.; Reijnders, C.M.A.; van den Broeck, L.J.; Spiekstra, S.W.; de Gruijl, T.D.; Weijers, E.M.; Gibbs, S. Immune-competent human skin disease models. *Drug Discov. Today* **2016**, *21*, 1479–1488. [CrossRef]
10. Wagner, E.F.; Schonthaler, H.B.; Guinea-Viniegra, J.; Tschachler, E. Psoriasis: What have we learned from mouse models. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2010**, *6*, 704–714. [CrossRef]
11. van der Fits, L.; Mourits, S.; Voerman, J.S.A.; Kant, M.; Boon, L.; Laman, J.D.; Cornelissen, F.; Mus, A.M.; Florencia, E.; Prens, E.P.; et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 5836–5845. [CrossRef]
12. Buttler, B.; Nestle, F.O. TLRs to cytokines: Mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis. *Eur. J. Immunol.* **2013**, *43*, 3138–3146. [CrossRef]
13. Baek, J.O.; Byamba, D.; Wu, W.H.; Kim, T.G.; Lee, M.G. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. *Arch. Dermatol. Res.* **2012**, *304*, 699–706. [CrossRef] [PubMed]
14. Arif, T.; Adil, M. Nanotechnology - Dermatological perspective. *Int. J. Nanomed. Nanosurg.* **2016**, *2*. [CrossRef]
15. Rahman, M.; Akhter, S.; Ahmad, J.; Ahmad, M.Z.; Beg, S.; Ahmad, F.J. Nanomedicine-based drug targeting for psoriasis: Potentials and emerging trends in nanoscale pharmacotherapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2014**, *12*, 635–652. [CrossRef]
16. Agrawal, U.; Mehra, N.K.; Gupta, U.; Jain, N.K. Hyperbranched dendritic nano-carrier for topical delivery of dithranol. *J. Drug Target.* **2013**, *21*, 497–506. [CrossRef]
17. Fruchon, S.; Poupot, R. Pro-inflammatory versus anti-inflammatory effects of dendrimers: The two faces of immuno-modulatory nanoparticles. *Nanomaterials* **2017**, *7*, 251. [CrossRef]
18. Hayder, M.; Fruchon, S.; Fournié, J.J.; Poupot, M.; Poupot, R. Anti-inflammatory properties of dendrimers per se. *Sci. World J.* **2011**, *11*, 1367–1382. [CrossRef]
19. Hayder, M.; Poupot, M.; Baron, M.; Nigon, D.; Turrin, C.O.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P.; Eisenberg, R.A.; Fournié, J.J.; Cantagrel, A.; et al. A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 81ra35. [CrossRef]
20. Hayder, M.; Varilh, M.; Turrin, C.O.; Saoudi, A.; Caminade, A.M.; Poupot, R.; Liblau, R.S. Phosphorus-based dendrimer ABP treats neuroinflammation by promoting IL-10-producing CD4+ T cells. *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3425–3433. [CrossRef]

21. Fruchon, S.; Caminade, A.M.; Abadie, C.; Davignon, J.L.; Combette, J.M.; Turrin, C.O.; Poupot, R. An azabisphosphonate-capped poly(phosphorhydrazone) dendrimer for the treatment of endotoxin-induced uveitis. *Molecules* **2013**, *18*, 9305–9316. [CrossRef]
22. Fruchon, S.; Poupot, R. The ABP dendrimer, a drug-candidate against inflammatory diseases that triggers the activation of interleukin-10 producing immune cells. *Molecules* **2018**, *23*, E1272. [CrossRef]
23. Fruchon, S.; Poupot, M.; Martinet, L.; Turrin, C.O.; Majoral, J.P.; Fournié, J.J.; Caminade, A.M.; Poupot, R. Anti-inflammatory and immuno-suppressive activation of human monocytes by a bio-active dendrimer. *J. Leukoc. Biol.* **2009**, *85*, 553–562. [CrossRef] [PubMed]
24. Degboé, Y.; Fruchon, S.; Baron, M.; Nigon, D.; Turrin, C.O.; Caminade, A.M.; Poupot, R.; Cantagrel, A.; Davignon, J.L. Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, R98. [CrossRef] [PubMed]
25. Portevin, D.; Poupot, M.; Rolland, O.; Turrin, C.O.; Fournié, J.J.; Majoral, J.P.; Caminade, A.M.; Poupot, R. Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4+ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy. *J. Transl. Med.* **2009**, *7*, 82. [CrossRef]
26. Poupot, M.; Turrin, C.O.; Caminade, A.M.; Fournié, J.J.; Attal, M.; Poupot, R.; Fruchon, S. Poly(phosphorhydrazone) dendrimers: Yin and yang of monocyte activation for human NK cell amplification applied to immunotherapy against Multiple Myeloma. *Nanomedicine* **2016**, *12*, 2321–2330. [CrossRef]
27. Rolland, O.; Turrin, C.O.; Bacquet, G.; Poupot, R.; Poupot, M.; Caminade, A.M.; Majoral, J.P. Efficient synthesis of phosphorus-containing dendrimers capped with isosteric functions of amino-bis(methylene) phosphonic acids. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2078–2082. [CrossRef]
28. Ledall, J.; Fruchon, S.; Garzoni, M.; Pavan, G.M.; Caminade, A.M.; Turrin, C.O.; Blanzat, M.; Poupot, R. Interaction studies reveal specific recognition of an anti-inflammatory polyphosphorhydrazone dendrimer by human monocytes. *Nanoscale* **2015**, *7*, 17672–17684. [CrossRef] [PubMed]
29. Caminade, A.M.; Fruchon, S.; Turrin, C.O.; Poupot, M.; Ouali, A.; Maraval, A.; Garzoni, M.; Maly, M.; Furer, V.; Kovalenko, V.; et al. The key role of the scaffold on the efficiency of dendrimer nanodrugs. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7722. [CrossRef]
30. Hayder, M.; Garzoni, M.; Bochicchio, D.; Caminade, A.M.; Couderc, F.; Ong-Meang, V.; Davignon, J.L.; Turrin, C.O.; Pavan, G.M.; Poupot, R. Three-dimensional directionality is a pivotal structural feature for the bioactivity of azabisphosphonate-capped poly(phosphorhydrazone) nanodrug dendrimers. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 712–720. [CrossRef]
31. Poupot, M.; Griffe, L.; Marchand, P.; Maraval, A.; Rolland, O.; Martinet, L.; L'Faqihi-Olive, F.E.; Turrin, C.O.; Caminade, A.M.; Fournié, J.J.; et al. Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. *FASEB J.* **2006**, *20*, 2339–2351. [CrossRef]
32. Fruchon, S.; Bellard, E.; Beton, N.; Goursat, C.; Oukhrib, A.; Caminade, A.M.; Blanzat, M.; Turrin, C.O.; Golzio, M.; Poupot, R. Biodistribution and biosafety of a poly(phosphorhydrazone) dendrimer, an anti-inflammatory drug candidate. *Biomolecules* **2019**, *9*, E475. [CrossRef] [PubMed]
33. Lin, H.H.; Faunce, D.E.; Stacey, M.; Terajewicz, A.; Nakamura, T.; Zhang-Hoover, J.; Kerley, M.; Mucenski, M.L.; Gordon, S.; Stein-Streilein, J. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in periphery tolerance. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1615–1625. [CrossRef]
34. Shaunak, S. Perspective: Dendrimer drugs for infection and inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *468*, 435–441. [CrossRef] [PubMed]
35. Chauhan, A.S.; Sridevi, S.; Chalasani, K.B.; Jain, A.K.; Jain, S.K.; Jain, N.K.; Diwan, P.V. Dendrimer-mediated transdermal delivery: Enhanced bioavailability of indomethacin. *J. Control. Release* **2003**, *90*, 335–343. [CrossRef]
36. Borowska, K.; Wolowiec, S.; Rubaj, A.; Glowniak, K.; Sieniawska, E.; Radej, S. Effect of polyamidoamine dendrimer G3 and G4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene – In vivo study. *Int. J. Pharm.* **2012**, *426*, 280–283. [CrossRef]
37. Tripathi, P.K.; Gorain, B.; Choudhury, H.; Srivastava, A.; Kesharwani, P. Dendrimer entrapped microsponge gel of dithranol for effective topical treatment. *Heliyon* **2019**, *5*, e01343. [CrossRef]
38. Tsakovska, I.; Pajeva, I.; Al Sharif, M.; Alov, P.; Fioravanzo, E.; Kovarich, S.; Worth, A.P.; Richarz, A.N.; Yang, C.; Mostrag-Szlichtyng, A.; et al. Quantitative structure-skin permeability relationships. *Toxicology* **2017**, *387*, 27–42. [CrossRef]

39. Venuganti, V.V.; Perumal, O.P. Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 2345–2356. [CrossRef] [PubMed]
40. Guo, C.; Zhang, Y.; Sun, M.; Wang, Z.; Fan, A.; Zhao, Y. Modulating topical drug delivery via skin pre-treatment with low-generation poly(amidoamine) dendrimers. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2014**, *24*, 555–557. [CrossRef]
41. Huber, C.; Christophers, E. "Keratolytic" effect of salicylic acid. *Arch. Dermatol. Res.* **1977**, *257*, 293–297. [CrossRef] [PubMed]
42. Venuganti, V.V.; Sahdev, P.; Hildreth, M.; Guan, X.; Perumal, O. Structure-skin permeability relationship of dendrimers. *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 2246–2260. [CrossRef] [PubMed]
43. Fruchon, S.; Mouriot, S.; Thiollier, T.; Grandin, C.; Caminade, A.M.; Turrin, C.O.; Contamin, H.; Poupot, R. Repeated intravenous injections in non-human primates demonstrate preclinical safety of an anti-inflammatory phosphorus-based dendrimer. *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 933–941. [CrossRef] [PubMed]

© 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/).

Partie II : Formulation du dendrimère ABP pour améliorer sa pénétration cutanée

Mise au point bibliographique sur les vésicules de TriCat : Système d'administration cutanée

L'efficacité du dendrimère ABP administré par voie cutanée dans le modèle murin de psoriasis, montrée dans notre première publication, n'a pas été aussi spectaculaire que son efficacité montrée précédemment dans les modèles murins de maladies inflammatoires chroniques, telles que la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaque [130,131]. Comme illustrée dans la partie bibliographique (*cf* Chapitre 1 partie **7.2**), cela peut s'expliquer par les propriétés physico-chimiques du dendrimère qui limitent probablement sa pénétration cutanée en quantité suffisante, limitant ainsi son efficacité thérapeutique. La vectorisation apparait comme une solution pour améliorer la pénétration cutanée du dendrimère. Il existe de nombreux vecteurs médicamenteux déjà utilisés et qui ont montré leur efficacité dans l'administration cutanée de molécules actives (*cf* Chapitre 1 partie **7.3.3**). Toutefois, la plupart de ces vecteurs ont certains inconvénients qui limitent leur utilisation tels que la complexité du procédé de préparation et l'utilisation d'additifs nocifs. Au contraire, les vésicules catanioniques ont un intérêt particulier pour notre étude car il s'agit de tensioactifs biocompatibles, économiquement attractifs et simples à mettre en œuvre.

Un tensioactif catanionique tricaténaire dérivé du lactose, que l'on désignera par la suite TriCat, a été synthétisé et optimisé dans notre équipe aux IMRCP [269,283]. Ce tensioactif catanionique est formé par l'association de deux tensioactifs de charges opposées suite à un échange de protons (**Figure 37**) :

- un tensioactif dérivé de sucre porteur d'un groupement amine, désigné par L-Hyd12, qui est le précurseur de l'amphiphile cationique.

- un tensioactif porteur d'un groupement acide phosphinique, qui est le précurseur de l'amphiphile anionique.

Cet assemblage catanionique résulte donc des interactions électrostatiques entre le cation ammonium (issu du produit A, **Figure 37**) et l'anion phosphinate (issu du produit B, **Figure 37**). Le TriCat (produit C, **Figure 37**) possède une tête polaire dérivée du lactose et 3 chaines hydrophobes à 12 atomes de carbone.

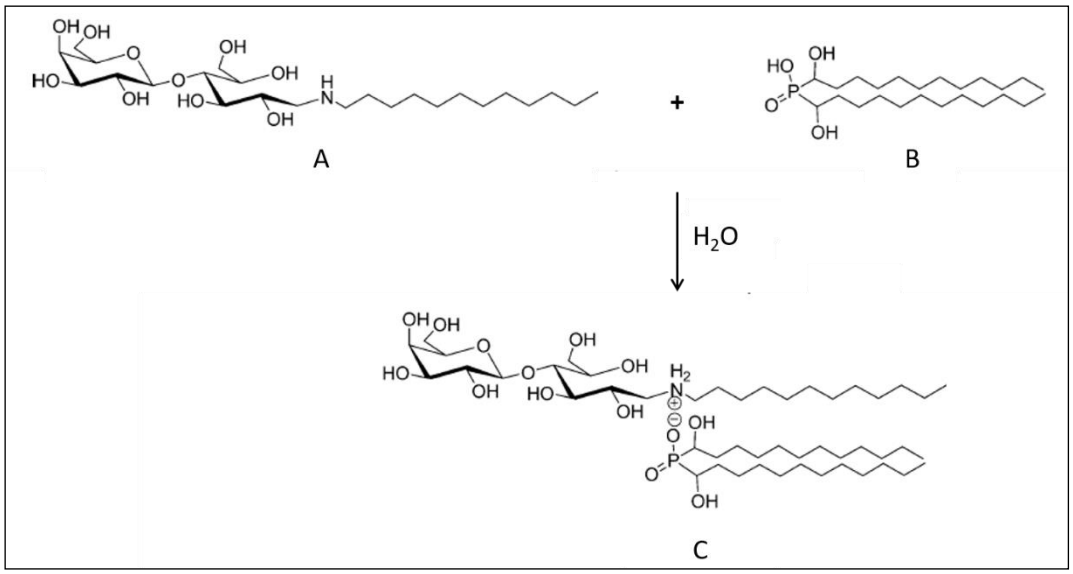


Figure 37. Synthèse du tensioactif catanionique tricaténaire (TriCat). *Une réaction acido-basique dans l'eau entre le précurseur du tensioactif cationique à tête sucre, (A) le 1-N-dodécylamino-1-déoxylactitol (L-Hyd12), et le précurseur du tensioactif anionique, (B) l'acide bis-α-(hydroxydodécyl) phosphinique, permettent la formation du tensioactif catanionique tricaténaire dérivé de sucre, (C) le bis(α-hydroxydodécyl)phosphinate de 1-N-dodécylammonium-1-déoxylactitol (TriCat).*

Une fois qu'il est formé, le TriCat s'auto-associe spontanément en solution aqueuse pour former des vésicules catanioniques (**Figure 38**). Une étape de sonication est effectuée afin d'assurer la reproductibilité et l'homogénéité en taille des vésicules [269].

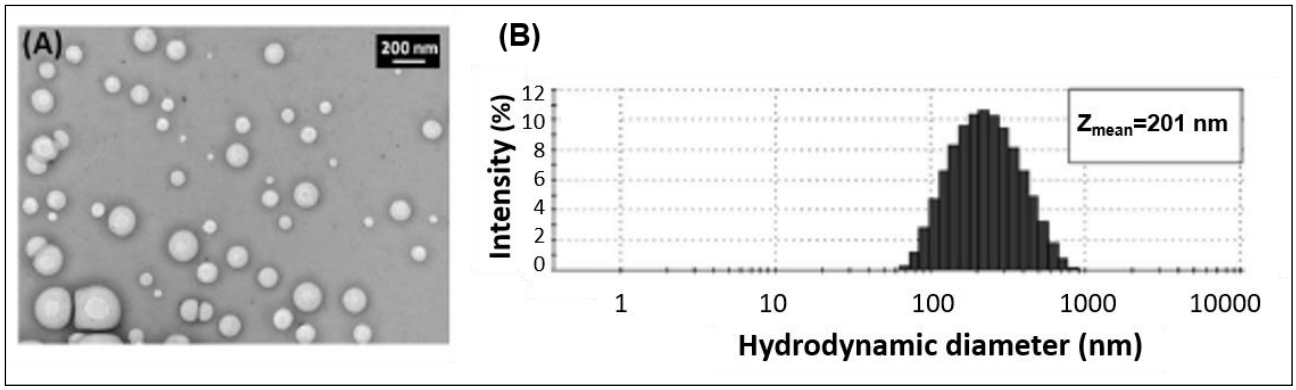


Figure 38. (A) Image de microscopie électronique à transmission et (B) distribution de taille obtenue par DLS pour les vésicules de TriCat dans l'eau [283].

Les vésicules de TriCat ont montré leur polyvalence en tant que système de vectorisation via leur efficacité à encapsuler des principes actifs d'hydrophilie variée. En effet, les vésicules de TriCat peuvent encapsuler des molécules hydrophiles dans leur cœur aqueux, telles que l'arbutine [269] ou le Texas Red [283,287,289], et intégrer des molécules hydrophobes ou amphiphiles dans leur bicouche, telles que la phtalocyanine de chloroaluminium [285], le dipropionate de bétaméthasone (BDP) [289] ou le FluoCat [286].

Lors de travaux précédents réalisés dans notre équipe, ces vésicules catanioniques de TriCat ont montré un fort potentiel dans l'administration de molécules par voie cutanée lorsque leur membrane est à l'état fluide désordonné et donc déformable [289]. Cette fluidité de la membrane des vésicules de TriCat est obtenue lorsque la température est supérieure à la température de transition de phase de leur membrane ($T_{transition}$), aux alentours de 36°C. Afin de mettre en évidence l'apport de la fluidité de la membrane sur l'amélioration de la pénétration cutanée, une sonde fluorescente modèle, le Texas Red a été encapsulée dans les vésicules catanioniques de TriCat. Des études *in vitro* de pénétration cutanée du système TriCat/Texas Red ont été menées en maintenant le système TriCat/Texas Red à 30°C ou 40°C. Lorsque le système est maintenu à 30°C (T < à $T_{transition}$ du TriCat), la quantité de Texas Red retenue dans la peau a été identique que la sonde soit encapsulée ou non dans les vésicules. Cependant, lorsque le système TriCat/Texas Red est maintenu à 40°C (T > à $T_{transition}$ du TriCat), la rétention cutanée et le passage transcutané du Texas Red sont augmentés d'un facteur 2 et d'un facteur 10, respectivement [289] (**Figure 39**). Cette étude montre que l'état

thermodynamique de la membrane des vésicules de TriCat est un facteur essentiel dans l'amélioration de la pénétration cutanée de l'actif. Ces résultats sont cohérents avec ce que nous avons vu dans la partie bibliographique sur l'importance de la fluidité et de l'ultra-déformabilité des vecteurs pour avoir une pénétration cutanée importante.

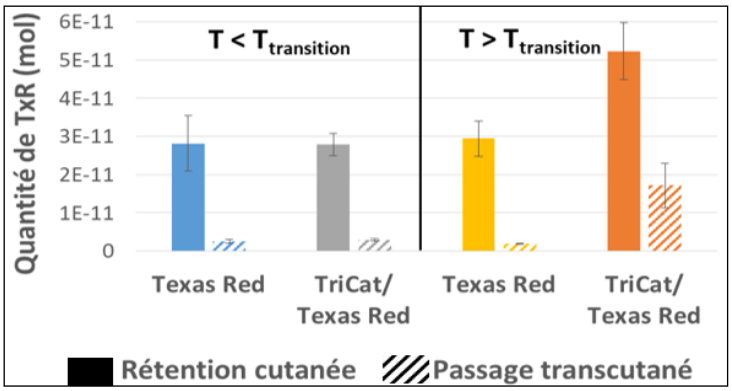


Figure 39. Quantité de Texas Red (TxR) retenue dans la peau (rétention cutanée) et accumulée dans le récepteur (passage transcutané) après 22 heures de l'application de Texas Red libre et encapsulé (TriCat/ Texas Red) à la surface de la peau à une température cutanée inférieure (à gauche) ou supérieure (à droite) à la $T_{transition}$ de la bicouche de TriCat [289].

Notre objectif est donc d'étudier la faisabilité de l'encapsulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat pour améliorer sa pénétration cutanée en s'assurant de la fluidité de la membrane des vésicules à la surface de la peau. Tout d'abord, nous avons mis au point et optimisé les conditions d'encapsulation du dendrimère. Ensuite, nous avons étudié les caractéristiques physico-chimiques de la formulation, notamment la stabilité. Enfin, nous avons étudié la fluidité de la membrane des vésicules.

Résultats :

1. Mise au point et optimisation de la stratégie de formulation d'ABP

Afin d'encapsuler le dendrimère ABP dans les vésicules de TriCat, nous avons envisagé plusieurs méthodes de formulation. Dans les cas où des vésicules catanioniques ont été obtenues, nous avons caractérisé la taille des objets obtenus en diffusion dynamique de la lumière (DLS) et déterminé le taux d'encapsulation.

Méthode A

La première méthode (A) repose sur la formation des vésicules catanioniques par la participation du principe actif à sa propre formulation, concept développé dans notre équipe aux IMRCP avec des AINS et des anti-histaminiques [279,280]. Nous avons donc tenté de remplacer l'acide phosphinique, qui est le précurseur du tensioactif anionique, par le dendrimère, porteur de fonctions acides. Afin de préparer cette association catanionique, un précurseur du dendrimère ABP porteur des groupements acide phosphonique, à la place des groupements phosphonate, nommé **ABP-A** (ABP sous forme acide), a été synthétisé par nos collaborateurs chimistes au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC). L'ABP-A, contrairement à l'ABP, est très peu soluble dans l'eau. Dans cette association catanionique, l'ABP-A est amené à être le précurseur de l'amphiphile anionique, à la place de l'acide phosphinique, et le L-Hyd12 est amené à être le précurseur du tensioactif cationique. Un équivalent d'ABP-A, portant à sa surface 24 groupements acide phosphonique, a été mélangé avec différents équivalents de L-Hyd12, portant à sa surface une fonction amine (1 ; 12 ; 24 et 48 équivalents). Ce protocole n'a pas permis de former une association catanionique efficace entre le L-Hyd12 et l'ABP-A par échange de protons. Ceci est probablement dû à l'auto-agrégation de l'ABP-A seul dans l'eau, d'où sa faible capacité à s'associer au L-Hyd12. Ceci a été confirmé par la présence de plusieurs populations en DLS et par l'observation des agrégats de l'ABP-A seul en solution par microscopie électronique à transmission (résultats non montrés). Ce protocole a donc été abandonné.

Méthode B

Le dendrimère ABP, porteur des groupements de surface phosphonate, est très soluble dans l'eau (solubilité > à 1 g/mL). La méthode B consiste donc à encapsuler l'ABP dans le cœur aqueux des vésicules de TriCat. C'est le protocole général utilisé au laboratoire pour encapsuler des molécules hydrophiles, telle que le Texas Red, dans les vésicules de TriCat [283,287,289]. Ce concept consiste à disperser le TriCat, préalablement formé, dans une solution aqueuse d'ABP à 2 mM. Plusieurs concentrations de TriCat ont été testées dans cette méthode pour optimiser la formation d'objets : 0,1 mM ; 0,25 mM ; 0,5 mM et 1 mM. Les vésicules se forment spontanément en solution aqueuse, mais le milieu est soniqué afin d'uniformiser la taille des vésicules formées. Cependant, les concentrations les plus élevées de TriCat, 0,5 mM et 1 mM, ont conduit à une certaine instabilité des vésicules au cours du

temps et ont donc été abandonnées. Les vésicules encapsulant l'ABP aux concentrations les plus faibles, quant à elles, sont restées stables. Par la suite, le pourcentage d'encapsulation d'ABP dans ces vésicules sera étudié.

Méthode C

La méthode C consiste à augmenter l'efficacité d'encapsulation d'ABP dans les vésicules par la formation de la paire catanionique de TriCat en présence d'ABP. Ainsi, nous mettons en contact l'ABP avec les précurseurs du tensioactif amphiphile, le L-Hyd12 et l'acide phosphinique. Nous avons réussi par cette méthode à augmenter la concentration en TriCat à 1 mM. Des quantités équimolaires de L-Hyd12 et d'acide phosphinique à des concentrations de 1 mM et d'ABP à différents concentrations (2 mM et 0,5 mM) sont dispersées dans l'eau. Nous avons varié la concentration en dendrimère afin de voir son effet sur la formation des vésicules. Les vésicules sont formées selon le protocole décrit dans la partie expérimentale et ont été caractérisées par la suite en termes de taille et de pourcentage d'encapsulation.

Méthode D

Sous forme phosphonates de sodium, l'ABP est hydrosoluble à pH neutre alors que l'ABP-A (forme acide) est très peu soluble. Cette faible hydrosolubilité d'ABP-A peut-être un atout pour l'insertion du dendrimère dans la bicouche des vésicules. La méthode D consiste à maximiser les contacts entre les différents constituants de la formulation mais également à insérer l'ABP non seulement dans le cœur aqueux des vésicules mais également dans la bicouche hydrophobe des vésicules catanioniques [289]. Ainsi, nous avons formé la paire catanionique à 1 mM en présence du précurseur d'ABP, ABP-A, afin de lui permettre de s'insérer dans la bicouche hydrophobe des vésicules. Les vésicules formées ont été caractérisées par la suite en termes de taille et de pourcentage d'encapsulation.

Le **tableau 3** ci-dessous permet de résumer les concentrations des différents composés utilisés dans les différentes méthodes de formulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat.

Méthode de formulation	[TriCat]	[L-Hyd12]	[Acide phosphinique]	[ABP]	[ABP-A]	Stabilité des vésicules formées
Méthode B	0,1 mM	-	-	2 mM	-	stable
	0,25 mM					stable
	0,5 mM					Pas stable
	1 mM					Pas stable
Méthode C	-	1 mM	1 mM	0,5 mM	-	stable
				2 mM		stable
Méthode D	-	1 mM	1 mM	-	0,5 mM	stable

Tableau 3. Récapitulatif des différentes méthodes de formulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat.

Les vésicules catanioniques formées par les méthodes B, C et D ont été comparées en terme de taille par une étude en DLS. La **figure 40** indique la taille et l'intensité du signal en DLS des vésicules formées suivant les différentes méthodes. Dans les cas où la taille des vésicules est du même ordre, l'intensité du signal en DLS peut être utilisée comme un indicateur de leur nombre relatif.

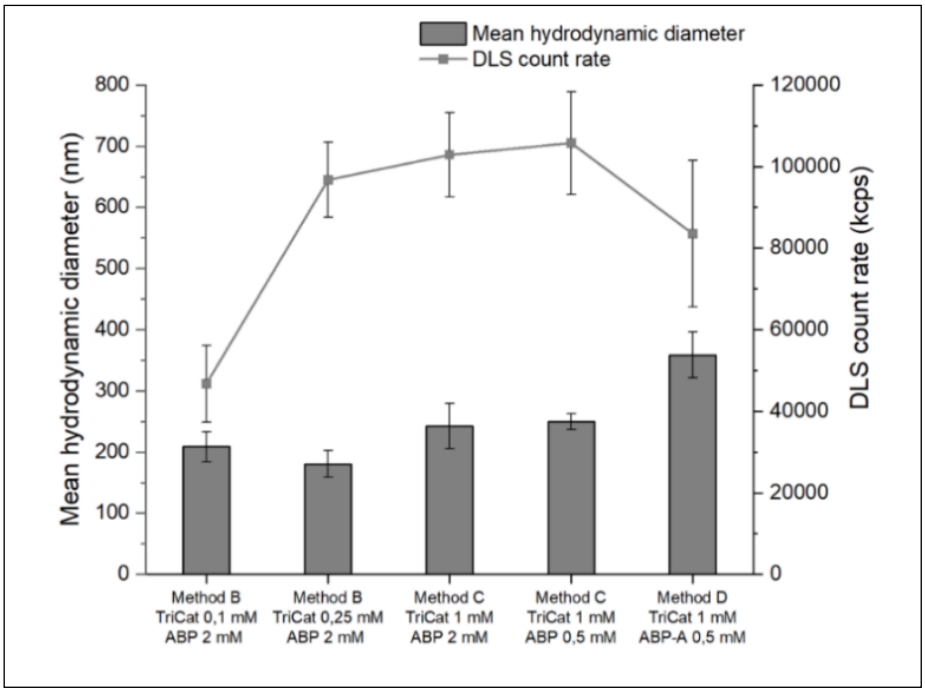


Figure 40. Diamètres hydrodynamiques moyens (nm) et intensité en DLS (kcps) des vésicules encapsulant le dendrimère. *Les vésicules sont préparées dans l'eau selon les méthodes de formulation B, C ou D avec des concentrations variables de TriCat et de dendrimère. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SD (standard deviation) d'au moins 3 échantillons indépendants.*

Les vésicules de TriCat/ABP obtenues par les méthodes de formulation B et C, que ce soit à 2 mM (méthode B et C) ou 0,5 mM (méthode C) en ABP, présentent une taille moyenne similaire, aux alentours de 220 nm (SD= 32). Dans un premier temps, nous pouvons conclure que la concentration d'ABP n'a pas affecté de façon spectaculaire la taille des vésicules formées. Par ailleurs, le diamètre obtenu est cohérent avec le diamètre moyen des vésicules de TriCat vides et des vésicules de TriCat encapsulant le Texas Red, qui est de l'ordre de 200 à 230 nm [283,284]. Ceci montre que le dendrimère ABP étant très soluble dans l'eau est encapsulé à l'intérieur du cœur aqueux des vésicules sans perturber leur formation. Si l'on compare l'intensité diffusée en DLS, une augmentation du nombre d'objets est obtenue en augmentant la concentration en TriCat de 0,1 mM à 0,25 mM par la méthode B et à 1 mM par la méthode C.

Par contre, les vésicules formées par la méthode D sont plus grandes avec un diamètre moyen de 350 nm. Ceci est en accord avec les travaux antérieurs qui ont montré une augmentation de la taille des vésicules lors de la synthèse du TriCat en présence d'un principe actif

hydrophobe, la BDP [289]. Ce comportement différent pour les vésicules de TriCat obtenues par la méthode D, par rapport à celles formées par la méthode B et C, laisse penser que l'ABP-A s'insère dans la bicouche des vésicules, modifiant ainsi leurs propriétés physico-chimiques. Cette insertion d'ABP-A dans la bicouche des vésicules nécessitera d'autres caractérisations, présentées ultérieurement, pour qu'on puisse la confirmer.

Nous avons ensuite déterminé l'efficacité d'encapsulation qui va nous permettre de sélectionner la formulation la plus pertinente pour le dendrimère ABP.

2. Efficacité d'encapsulation

Afin de déterminer l'efficacité d'encapsulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat obtenues selon la méthode B, C ou D, plusieurs techniques ont été envisagées, notamment afin de séparer la partie non encapsulée de la partie encapsulée. La technique retenue pour les méthodes B et C est l'ultracentrifugation alors que celle retenue pour la méthode D est la séparation de la partie non encapsulée par filtration. Le choix de ces méthodes sera justifié dans la partie suivante.

<u>Méthode B et C</u>

Plusieurs techniques ont été testées afin de séparer l'ABP non encapsulé des vésicules. La dialyse, quant à elle, a été abandonnée vu que le dendrimère libre diffuse partiellement et d'une manière non reproductible à travers la membrane de dialyse. Nous avons ensuite réussi à séparer l'ABP non encapsulé par ultracentrifugation à l'aide de filtres à centrifuger avec un seuil de coupure de 100 KDa où l'ABP traverse facilement la membrane. Les vésicules de TriCat sont retenues sur le filtre et leur stabilité a été vérifiée par DLS. La quantité totale d'ABP dans la solution vésiculaire avant ultracentrifugation et la quantité non encapsulée d'ABP dans le surnageant obtenue après ultracentrifugation nous a permis de calculer le % d'encapsulation par un dosage spectrophotométrique (Les mesures de spectroscopie UV-Visible ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-visible à barrette de diodes Analytik Jena Specord 600 à λ=280,5 nm) (**Tableau 4**).

Méthode de formulation	[TriCat]	[L-Hyd12]	[Acide phosphinique]	[ABP]	EE (%) ± SD
Méthode B	0,1 mM	-	-	2 mM	11 ± 2
	0,25 mM				14 ±2
Méthode C	-	1 mM	1 mM	0,5 mM	31 ± 2
				2 mM	19 ± 6

Tableau 4. Efficacité d'encapsulation (EE) de l'ABP dans les vésicules de TriCat préparées selon les méthodes B et C. *Les valeurs sont les moyennes ± SD de 3 échantillons indépendants.*

Méthode D

Afin de calculer le taux d'encapsulation du dendrimère formulé selon la méthode D, une méthode de dosage a été mise en place par spectrofluorimétrie. En effet, nous avons tiré profit des propriétés fluorescentes d'un analogue fluorescent de l'ABP-A, désigné ci-après ABP-A-NIR (*cf* **figure 69** chapitre 3), vu que le dosage par fluorimétrie est plus sensible que celui par spectrométrie UV-Visible. Tout d'abord, nous avons vérifié que les vésicules de TriCat encapsulant l'analogue fluorescent ont des caractéristiques de taille identique à la formulation du dendrimère non fluorescent, montré un peu plus loin (voir **partie 4**).
Ensuite, nous avons essayé de séparer la partie non encapsulée du dendrimère par ultracentrifugation. Cependant, l'ultracentrifugation de la solution contrôle d'ABP-A seul dans l'eau a montré que la majorité du dendrimère reste retenue au niveau de filtre dû à la faible solubilité d'ABP-A ce qui rend la séparation par ultracentrifugation non adaptée.

Afin d'éliminer la majorité du dendrimère non encapsulé, la filtration avec un seuil de 1,2 µm a été retenue. En effet, la filtration de la solution contrôle d'ABP-A seul permet d'éliminer la quasi-totalité du dendrimère d'une façon reproductible. Ce protocole a été également utilisé dans les travaux antérieurs pour éliminer la BDP, qui comme l'ABP-A, est très peu soluble dans l'eau [289]. Ce protocole nous a permis ainsi de séparer la partie non encapsulée sans altérer les caractéristiques des vésicules.
La quantité de l'ABP-A-NIR totale dans la solution vésiculaire avant filtration a été mesurée après destruction des vésicules par du méthanol. Après filtration de l'échantillon vésiculaire, la quantité de l'ABP-A-NIR encapsulée a été également mesurée après dilution dans du méthanol (**Figure 41**). On en déduit ainsi une efficacité d'encapsulation pour les vésicules

catanioniques de 79% (± 12%). Ceci montre que la concentration du dendrimère encapsulé dans les vésicules de TriCat est de l'ordre de 0,4 mM. Il est important de noter que cette concentration est 20 à 200 fois plus élevée que les concentrations actives du dendrimère déterminées *in vitro* sur les monocytes.

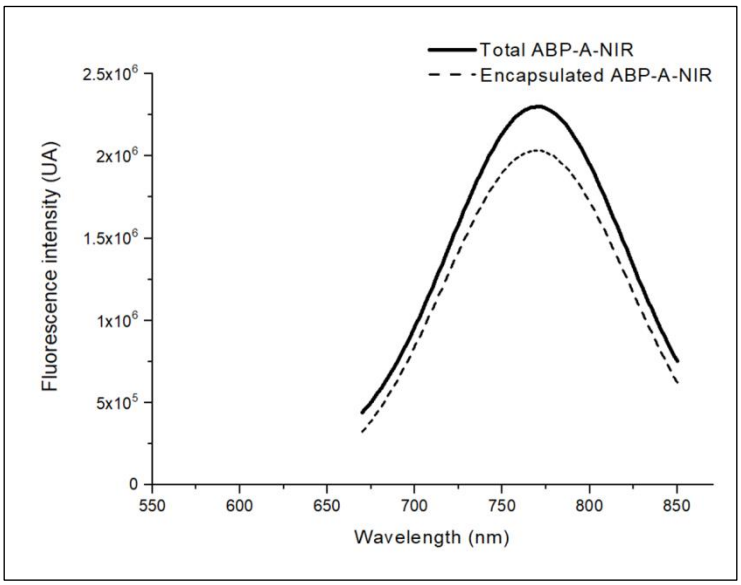


Figure 41. Spectres d'émission de fluorescence de l'ABP-A-NIR encapsulés (courbe pointillé) et de l'ABP-A-NIR totales (courbe continu) dans la solution vésiculaire après solubilisation dans le méthanol (λex: 632 nm).

L'encapsulation du dendrimère dans les vésicules catanioniques est donc obtenue avec un rendement beaucoup plus élevé avec la méthode D. En effet, dans la méthode B et C, le principe actif est utilisé sous sa forme neutre qui est très soluble dans l'eau et qui donc se met principalement dans un environnement qui lui est favorable, la cavité hydrophile et le volume extérieur des vésicules. Étant donné que le volume externe est beaucoup plus élevé que le volume interne des vésicules, nous avons une faible encapsulation dans le cœur aqueux des vésicules.

Ensuite, en comparant la formulation du dendrimère à 2 mM par la méthode B (11 à 14 %) à celle de C (19 %), un rendement légèrement plus élevé est obtenue en faveur de la méthode C ce qui est cohérent avec la méthode de formulation. En effet, quand l'ABP est mis en contact avec le système au début de la synthèse de la paire catanionique et donc au moment de la formation de la bicouche des vésicules (méthode C), une quantité du dendrimère ABP, dû à son cœur hydrophobe, peut s'insérer dans la bicouche. En formulant le dendrimère selon la

méthode C à une concentration 4 fois moins élevée, à 0,5 mM, un % d'encapsulation de 31% est obtenu. Ceci correspond à une concentration d'ABP encapsulée égale à 0,16 mM qui est 2,4 fois inférieure à celle obtenue en formulant le dendrimère à 2 mM (concentration encapsulée égale à 0,38 mM). Ceci montre que le taux d'encapsulation n'est pas concentration dépendante. Ceci suppose qu'une quantité supplémentaire ajoutée du dendrimère ne s'incorpore pas dans les vésicules.

Le taux d'incorporation le plus élevé dans les vésicules de TriCat a été obtenu avec la méthode D. Ceci s'explique par le fait que l'ABP-A hydrophobe et insoluble est davantage incorporé dans les bicouches des vésicules. Par ailleurs, un taux d'incorporation élevé dans les vésicules de TriCat a été obtenu pour la phtalocyanine de chloroaluminium (92 ± 2%), une molécule hydrophobe [285]. Des mesures calorimétriques seront présentées, dans la suite de ce manuscrit, pour étudier l'interaction d'ABP-A avec la bicouche de tensioactifs et confirmer son positionnement au niveau de la bicouche catanionique.

En conclusion, la formulation TriCat/ABP-A obtenue selon la méthode D est la formulation la plus efficace. Elle a donc été sélectionnée et sa caractérisation physico-chimique plus précise a été entreprise.

3. Caractérisation physico-chimiques de la formulation TriCat/ABP-A

3.1. Morphologie de la formulation TriCat/ABP-A

La morphologie et la distribution de taille des vésicules de TriCat/ABP-A ont été observées en microscopie électronique à balayage (MEB) et en DLS (**Figure 42**).

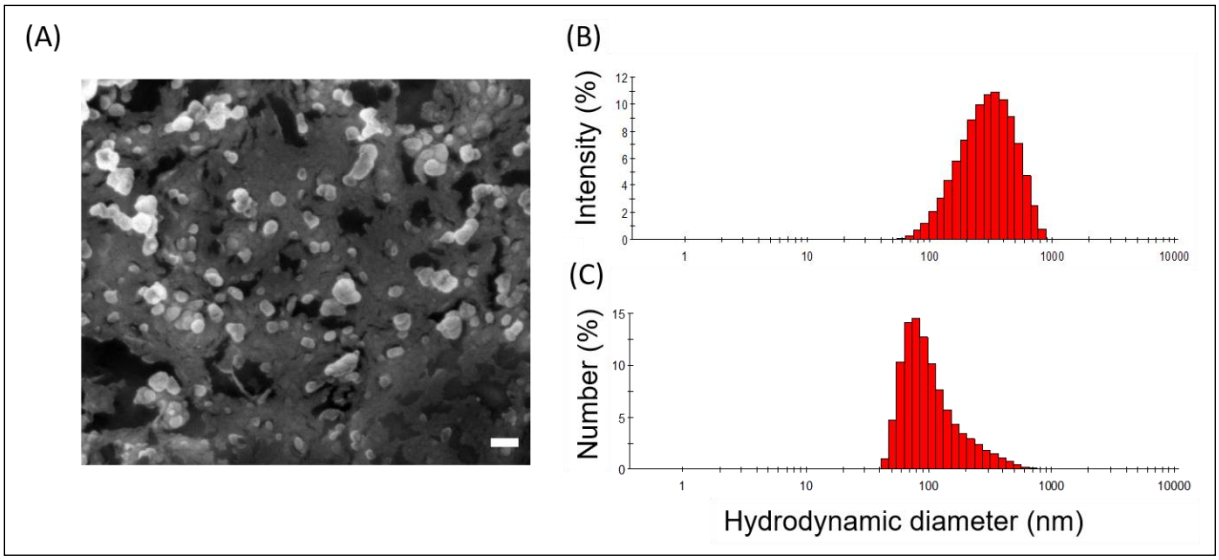


Figure 42. (A) Image de MEB, (B) distribution de taille exprimée en intensité et (C) distribution de taille exprimée en nombre des vésicules de TriCat/ABP-A préparées dans l'eau. *(A) La barre d'échelle représente 200 nm.*

L'image de microscopie électronique de la formulation TriCat/ABP-A montre la présence de nombreux objets de forme sphérique (A). En DLS, le diamètre des vésicules varie approximativement entre 80 et 700 nm avec un diamètre moyen d'environ 350 nm (B). L'indice de polydispersité (PDI) est de l'ordre de 0,3 (0,25 ± 0,04). Cependant, comme les grosses particules diffusent beaucoup plus de lumière que les petites particules, l'aire des pics (B) n'est pas proportionnelle à la quantité de particules dans l'échantillon. C'est pour cela que, afin de visualiser la taille des vésicules la plus prépondérante, une distribution de la taille exprimée en nombre (C) a été calculée par le logiciel de la DLS à partir de celle exprimée en intensité. Cette distribution est obtenue en fixant l'indice de réfraction des vésicules à 1,67 [289]. Cette distribution montre une présence abondante des vésicules de taille aux alentours de 100 nm (C), ce qui est en corrélation avec ce que nous observons en MEB. Bien que la distribution de taille exprimée en nombre soit représentative de la taille des particules en solution, la valeur approximative de l'indice de réfraction des vésicules catanioniques rend son utilisation non appropriée dans notre étude. Ainsi, nous présenterons dans la suite de nos travaux, la distribution de taille exprimée en intensité qui est plus correcte.

3.2. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A

3.2.1. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A au cours du temps

Afin de vérifier la stabilité des vésicules de TriCat/ABP-A à +4°C, nous avons suivi l'évolution dans le temps de leur taille et de leur potentiel zêta.

La **figure 43** montre que le diamètre hydrodynamique moyen des vésicules est conservé au cours du temps. De même, il n'y a pas de modification d'intensité de signal au cours du temps, ce qui suggère que le nombre des vésicules varie très peu. Ces résultats nous montrent que la formulation TriCat/ABP-A conserve son intégrité et que les vésicules conservent leur taille pendant plus de deux mois lorsqu'elles sont stockées à 4°C en solution.

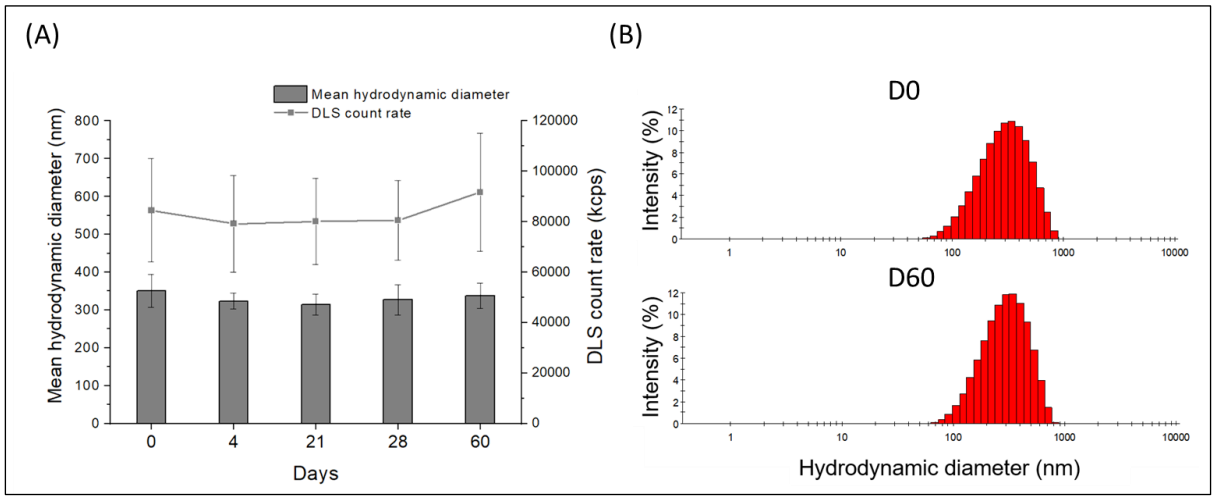


Figure 43. Stabilité dans le temps de la formulation TriCat/ABP-A. *(A) Évolution dans le temps du diamètre hydrodynamique moyen de la formulation TriCat/ABP-A à +4°C. Les résultats à chaque temps sont représentés par la moyenne ± SD de 6 formulations indépendantes. (B) Distribution de taille de la formulation de TriCat/ABP-A à t=0 (D0) et après 60 jours (D60).*

Lorsque des vésicules de TriCat vides sont formulées dans l'eau selon la méthode de formulation D, elles présentent un diamètre hydrodynamique moyen de l'ordre de 180 nm, inférieure à la taille des vésicules formées en présence d'ABP-A. Cependant, une précipitation macroscopique de l'échantillon intervient le jour qui suit leur formation, confirmée en DLS par la présence d'agrégats de l'ordre de plusieurs micromètres de diamètre. La stabilité dans le temps du système TriCat/ABP-A par rapport au système TriCat seul renforce l'hypothèse qu'une interaction entre l'ABP-A et les tensioactifs de TriCat stabilise fortement les vésicules. Nous avons également vérifié la stabilité des vésicules de TriCat/ABP-A en terme de potentiel zêta. En effet, le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre les vésicules et

donc de leur stabilité. Si les particules en suspension (les vésicules) ont un potentiel zêta important, généralement > 30 mV en valeur absolue, elles auront tendance à se repousser et limiter ainsi leur agrégation. Cependant, si les particules ont des valeurs de potentiel zêta faibles, les forces attractives deviennent alors dominantes et les particules s'agrègent [290]. Dans notre cas, les analyses du potentiel zêta ont permis de voir que pour les vésicules de TriCat/ABP-A cette valeur est fortement négative, à -53 ± 3 mV. Nous avons également montré que le potentiel zêta de la formulation TriCat/ABP-A reste stable durant 14 jours (**Figure 44**). Cela traduit la grande stabilité de la formulation, la forte charge négative de surface empêche l'agrégation des vésicules de TriCat/ABP-A par répulsion électrostatique.

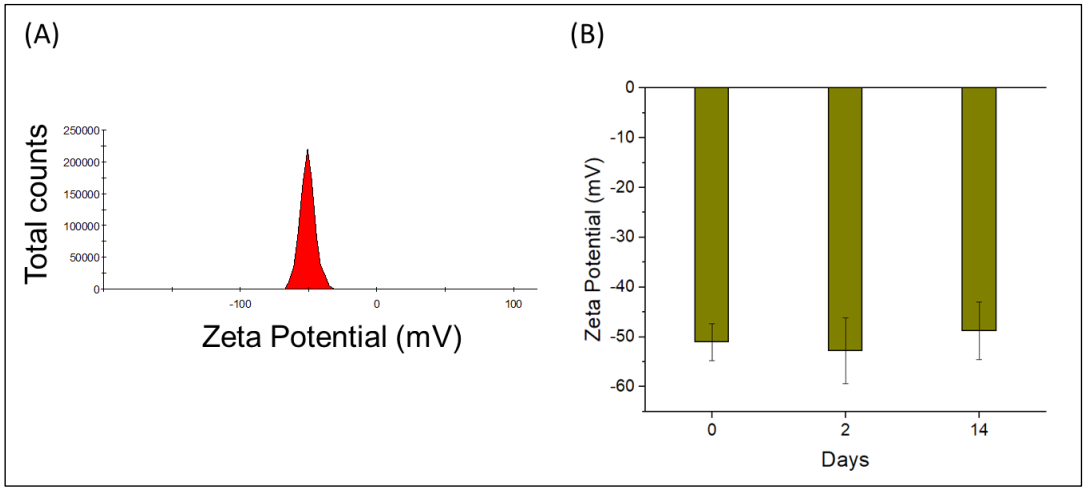


Figure 44. Potentiel Zêta de la formulation TriCat/ABP-A. *(A) Distribution du potentiel zêta des vésicules de TriCat/ABP-A à J0. (B) Stabilité dans le temps du potentiel zêta des vésicules de TriCat/ABP-A stockées à + 4°C. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SD de 3 échantillons indépendants.*

3.2.2. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A à -20°C

Afin de garantir une efficacité maximale de la formulation, nous avons également suivi la stabilité de la formulation dans des conditions de stockage à -20°C. La **figure 45** montre que la congélation/décongélation n'altère pas l'intensité du signal en DLS, ni l'intégrité et la taille des vésicules de TriCat/ABP-A. Ceci nous nous a permis donc d'envisager une longue conservation de la formulation de TriCat/ABP-A à -20°C pour utilisation ultérieure.

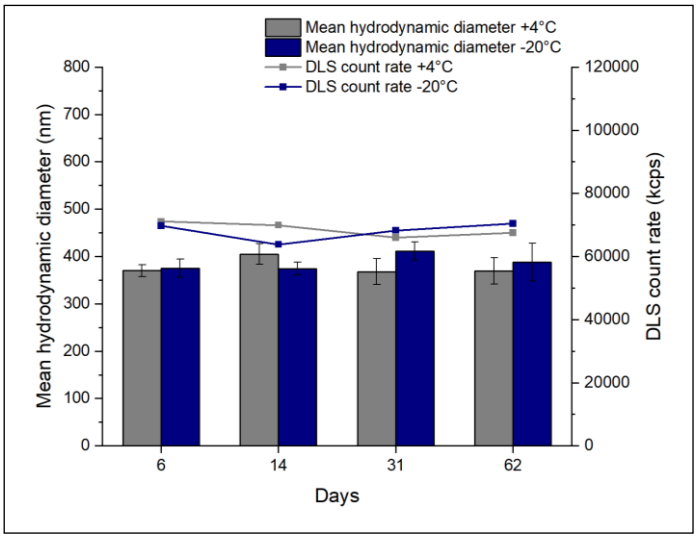


Figure 45. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A à -20°C. *Diamètres hydrodynamiques moyens et intensités en DLS de la formulation TriCat/ABP-A mesurés à 25°C après un stockage à +4°C et à -20°C pendant 6, 14, 31 ou 62 jours. Les résultats sont représentés par la moyenne de 4 mesures ± SD effectuées sur un échantillon représentatif.*

3.2.3. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A au pH cutané et à la dilution

Le pH de la formulation TriCat/ABP-A est d'environ 2,8. Ce pH acide est dû aux groupements de surface de type phosphonique du dendrimère ABP-A.

Comme la formulation est destinée à une application cutanée, nous avons évalué la stabilité de la formulation TriCat/ABP-A au pH de la peau, qui est proche de 5. Les analyses de DLS montrent que les vésicules sont stables en taille, ce qui est indispensable pour s'assurer de l'intégrité des vésicules sur le site d'application (**Figure 46A**). Nous avons également montré la stabilité de la formulation à la dilution dans l'eau (**Figure 46B**).

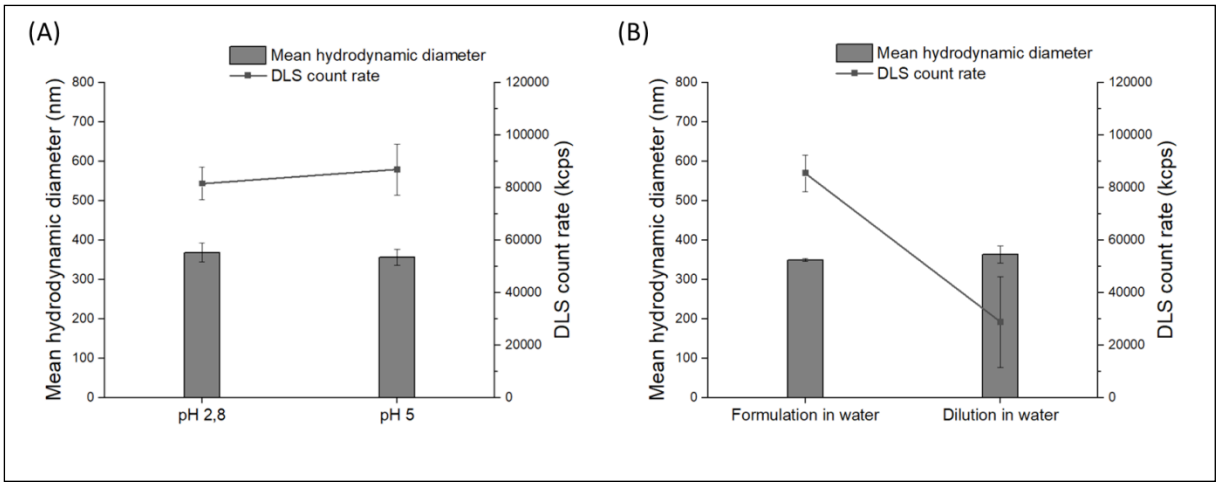


Figure 46. Stabilité de la formulation au pH cutané et à la dilution dans l'eau. *(A) Diamètres hydrodynamiques moyens et intensités en DLS des vésicules de TriCat/ABP-A au pH de la formulation (2,8) et au pH proche de celui de la peau (5), ajusté par l'ajout de NaOH. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SD de 3 échantillons indépendants pour chaque pH. (B) Diamètres hydrodynamiques moyens et intensités en DLS des vésicules de TriCat/ABP-A formulées à 1 mM en TriCat dans l'eau puis dilués au 1/5ème dans l'eau. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SD de 2 échantillons indépendants.*

4. Caractérisation de la formulation TriCat/ABP-A-NIR

4.1. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A-NIR

Afin de quantifier le dendrimère dans la peau par spectrofluorimétrie et d'étudier sa profondeur de pénétration cutanée par microscopie confocale (partie III), des analogues fluorescents d'ABP (ABP-NIR) et d'ABP-A (ABP-A-NIR) ont été utilisés. Ces analogues fluorescents ont l'avantage d'émettre un signal de fluorescence dans le proche infrarouge, dans une gamme de longueur d'onde supérieure à celle de l'auto-fluorescence de la peau. Afin d'envisager l'utilisation de la formulation du dendrimère fluorescent pour des expériences biologiques, nous avons voulu en vérifier les caractéristiques physico-chimiques. Afin d'étudier le comportement de l'analogue fluorescent ABP-A-NIR dans les vésicules de TriCat, la formulation a été préparée selon le même protocole que celui précédemment décrit pour le dendrimère non fluorescent (méthode D). La formulation, désignée par TriCat/ABP-A-NIR, a été ensuite caractérisée par DLS. Afin que la détermination de la taille des vésicules en DLS ne soit pas affectée par la fluorescence du dendrimère [291], nous avons dilué la formulation TriCat/ABP-A-NIR au 1/5ème dans l'eau. Comme montré dans les vésicules de

TriCat/ABP-A, nous considérons que la dilution dans l'eau n'affecte pas la stabilité des vésicules de TriCat/ABP-A-NIR.

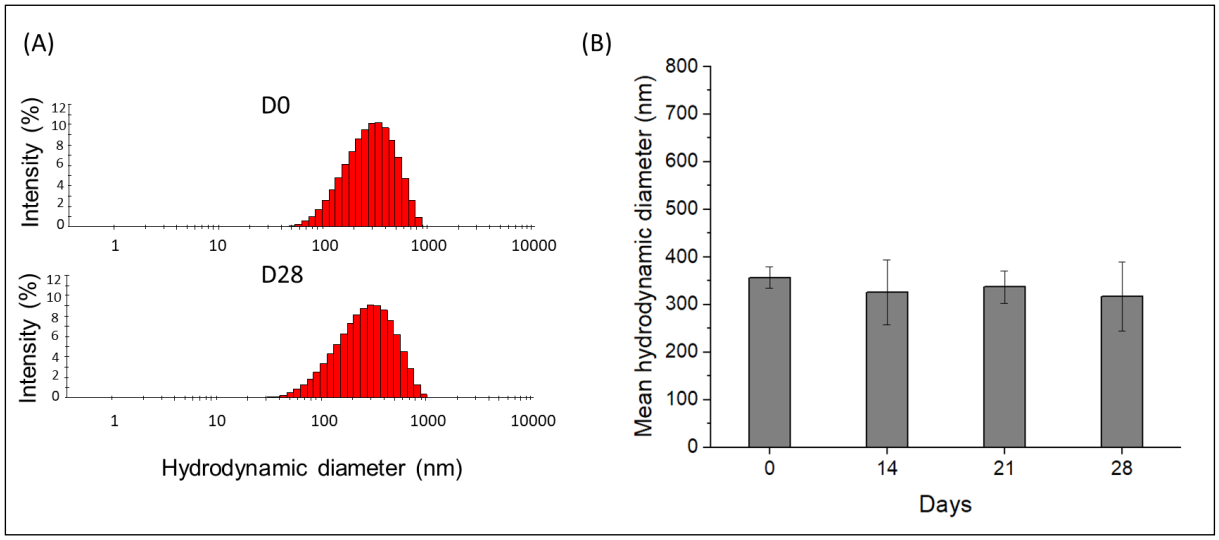


Figure 47. Stabilité dans le temps de la formulation TriCat/ABP-A-NIR. *(A) Distribution de taille de la formulation TriCat/ABP-A-NIR à t=0 (D0) et après 28 jours (D28). (B) Évolution dans le temps du diamètre hydrodynamique moyen de la formulation TriCat/ABP-A-NIR stockées à +4°C. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SD de 4 formulations indépendantes.*

La **figure 47A** montre que la formulation TriCat/ABP-A-NIR présente une distribution de taille similaire à celle de la formulation TriCat/ABP-A. Le diamètre hydrodynamique moyen est de l'ordre de 350 nm et la distribution en taille est relativement variable (PDI 0,24 ± 0,01). Comme les vésicules de TriCat/ABP-A, cette formulation est stable au moins un mois lorsqu'elle est stockée à + 4°C (**Figure 47B**).

Enfin, nous avons également confirmé que la formulation est stable après un stockage à -20°C (**Figure 48**).

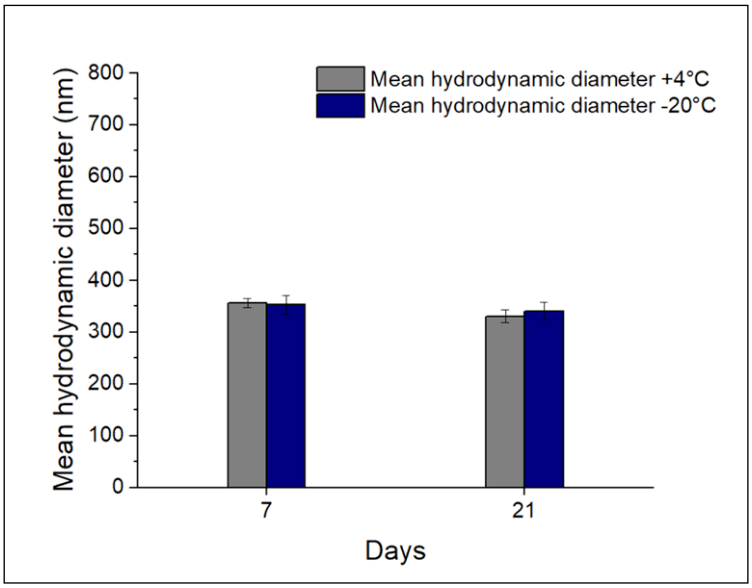


Figure 48. Stabilité de la formulation TriCat/ABP-A-NIR à -20°C. *Diamètres hydrodynamiques moyens de TriCat/ABP-A-NIR mesurés à 25°C après un stockage à +4°C et à -20°C pendant 7 et 21 jours. Les résultats sont représentés par la moyenne des 4 mesures ± SD effectuées sur un échantillon représentatif.*

Ces résultats montrent que les vésicules encapsulant les dendrimères ABP-A et ABP-A-NIR sont similaires en termes de taille et de stabilité. Nous avons également vérifié que le dendrimère fluorescent a les mêmes propriétés biologiques que le dendrimère non fluorescent *in vitro* (voir partie IV). Ceci valide donc la possibilité d'utiliser la formulation TriCat/ABP-A-NIR pour suivre son devenir lors des expériences biologiques, notamment pour les études de pénétration cutanée *ex vivo*.

4.2. Fluorescence de la formulation TriCat/ABP-A-NIR

L'ABP-A-NIR, comme l'ABP-A, est très peu soluble dans l'eau. Ainsi le spectre d'émission de fluorescence enregistré (λex = 632 nm) est de faible intensité pour une solution aqueuse de ce dendrimère. La comparaison des spectres d'intensité de fluorescence du dendrimère ABP-A-NIR libre en solution aqueuse et celui formulé dans les vésicules de TriCat montre une très nette augmentation de l'intensité de fluorescence émise dans la solution correspondant aux vésicules de TriCat/ABP-A-NIR (**Figure 49**). Ceci permet de renforcer l'hypothèse de la présence du dendrimère dans un environnement qui lui est favorable, c'est-à-dire un environnement hydrophobe, dans ce cas la bicouche des vésicules de TriCat.

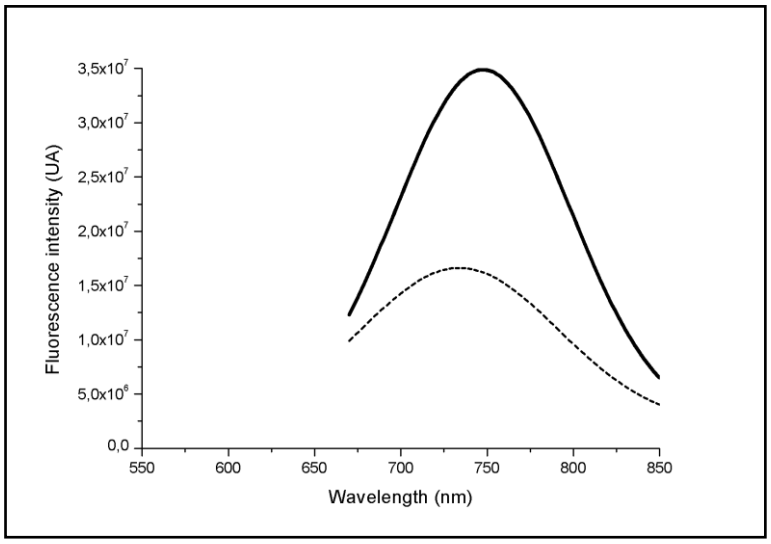


Figure 49. Spectres d'intensité de fluorescence (λex: 632 nm) de l'ABP-A-NIR libre en solution aqueuse (courbe pointillé) et de l'ABP-A-NIR formulé dans les vésicules de TriCat (courbe continu).

5. Fluidité de la membrane

Après avoir étudié la stabilité des vésicules de TriCat/ABP-A, nous avons évalué l'influence d'ABP-A sur la bicouche de TriCat par calorimétrie différentielle à balayage (DSC). En effet, la DSC permet d'étudier l'effet de l'incorporation d'une substance sur les propriétés thermodynamiques de la bicouche lipidique. Cette substance peut interagir avec les parties lipophiles (les chaines hydrocarbonées) de la bicouche, provoquant un désordre au niveau des chaînes grasses et aboutissant à une modification de la température de transition de phase des chaines grasses de la bicouche de l'état gel ordonné à l'état fluide désordonné [292].

Afin de pouvoir visualiser correctement la transition de phase de la bicouche des vésicules, il est nécessaire de travailler en système relativement concentré. Ainsi, les bicouches de TriCat ont été préparées à la concentration de 10 mM pour les études de DSC. Cependant, nous n'avons pas pu augmenter la concentration en ABP-A à cause de sa très faible hydrosolubilité (méthode D). Nous avons donc gardé dans un premier temps la concentration en ABP-A fixe à 0,5 mM. Nous avons ainsi pu comparer l'effet de l'ABP à 0,5 mM sur la bicouche des vésicules en fonction des différentes méthodes de formulation.

La **figure 50** et le **tableau 5** montrent, respectivement, les thermogrammes et les valeurs des paramètres calorimétriques (température de début de transition T_{onset}, température qui correspond au pic de transition T_{peak} et flux de chaleur normalisé à la quantité de matière ΔH_{norm}) obtenus pour **TriCat seul**, **TriCat/ABP-A** (méthode D) et **TriCat/ABP** (méthode B et C). Pour rappel, les méthodes B et C consistent à encapsuler l'ABP, la forme hydrosoluble. Dans la méthode B, l'ABP est ajouté au TriCat préalablement formé alors que dans la méthode C, il est ajouté au système au moment de la synthèse de la paire catanionique de TriCat.

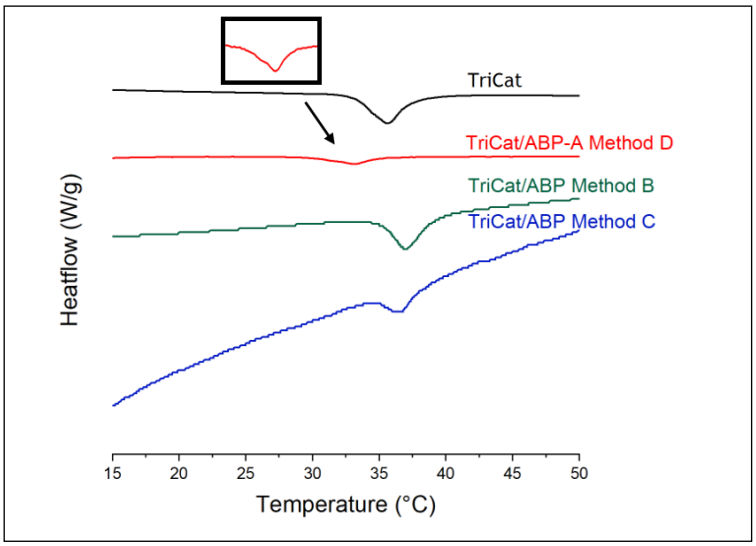


Figure 50. Les thermogrammes obtenus par DSC de TriCat seul (A), de TriCat/ABP-A (méthode D) (rouge), de TriCat/ABP (méthode B) (vert) et de TriCat/ABP (méthode C) (bleu) à la concentration de 0,5 mM en dendrimère après 4 cycles thermiques.

Les thermogrammes obtenus montrent clairement que la température de début de transition décroit de 33,5°C (T_{peak} = 36°C) à 30,8°C (T_{peak} = 33°C) avec TriCat/ABP-A. Cette diminution de la température de transition est accompagnée d'une diminution de ΔH_{norm} de 0,12 J/g à 0,03 J/g, traduit par un pic petit et large. Ce décalage de la température de transition montre que la membrane se trouve à l'état fluide désordonné à plus basse température. De plus, la diminution de la quantité d'énergie absorbée au cours de cette transition illustre que moins de molécules de TriCat subissent cette transition et donc le reste est déjà à l'état fluide sur tout l'intervalle de température. Ces données confirment l'hypothèse de l'insertion d'ABP-A au sein de la bicouche des tensioactifs. Cette insertion altère l'ordre des molécules de

tensioactifs et perturbe ainsi la transition des chaines qui ne subissent pas la transition à la même température.

Contrairement à l'ABP-A, la température de transition de phase des chaines de TriCat n'est que légèrement affectée par la présence d'ABP, que l'ABP soit formulé par les méthodes B ou C. En effet, le pic de transition varie très peu, de moins d'un degré, avec TriCat/ABP. Ceci permet de confirmer l'hypothèse qu'une faible fraction d'ABP, forme hydrosoluble, pourrait s'insérée dans la bicouche de tensioactifs. Quant au flux de chaleur, il n'est pas affecté significativement par la méthode B alors qu'une diminution significative est obtenue avec la méthode de formulation C de 0,12 J/g pour TriCat seul à 0,08 J/g pour TriCat/ABP. Ceci est cohérent vu que, dans la méthode C, l'ABP est mis en contact avec le système au début de la synthèse de la paire catanionique et donc c'est logique qu'une plus grande quantité interagisse avec les molécules de tensioactifs et soit insérée dans la bicouche.

Système de formulation		**T_{onset} (°C)**	**T_{peak} (°C)**	**Flux de chaleur ΔH_{norm} (J/g)**
TriCat seul		*33,5 ± 0,2*	*36 ± 0,2*	*0,12*
TriCat + ABP 0,5 mM	***Méthode B***	*35 ± 0,1*	*37*	*0,14 ± 0,01*
	Méthode C	*34,9 ± 0,1*	*36,8 ± 0,2*	*0,075 ± 0,002*
TriCat + ABP-A 0,5 mM	***Méthode D***	*30,8 ± 0,2*	*33 ± 0,1*	*0,026 ± 0,004*

Tableau 5. Paramètres calorimétriques déterminés par DSC pour le TriCat seul (A) et pour le TriCat avec le dendrimère selon les méthodes de formulation B, C et D.

Dans le but de mieux étudier les interactions existantes au sein de la bicouche entre le TriCat et le dendrimère ABP-A, nous avons fait varier dans un second temps la concentration d'ABP-A de 0,05 mM à 0,8 mM pour une concentration en TriCat constante fixée à 10 mM. En effet, cela devrait nous permettre de révéler l'effet de la concentration de l'actif encapsulé sur les propriétés de la membrane.

Les extraits de thermogrammes de concentrations croissantes d'ABP-A encapsulés dans les vésicules de TriCat sont présentés dans la **figure 51** suivante.

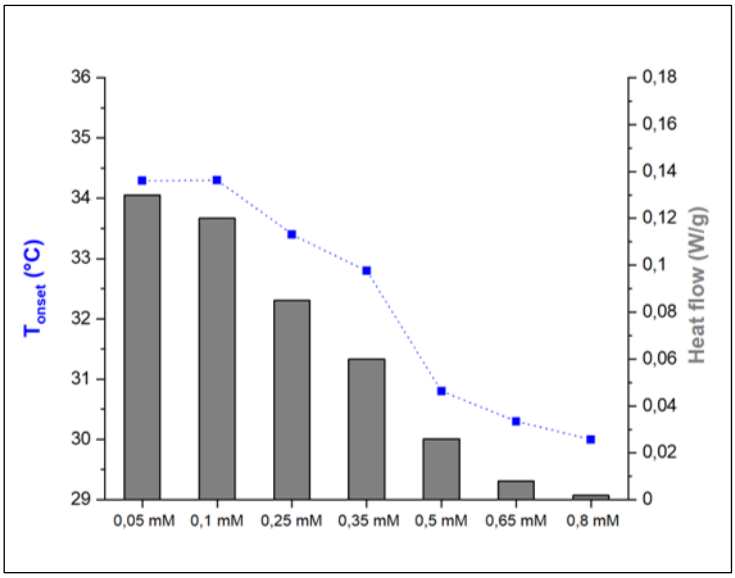


Figure 51. Température de début de transition de phase et intensité du flux de chaleur normalisé à la quantité de matière (en valeur absolue) au cours de la transition des échantillons de TriCat/ABP-A en fonction de la [ABP-A]. *Ces résultats sont extraits des thermogrammes correspondants.*

La **figure 51** montre que les effets thermiques de l'ABP-A sur la bicouche des tensioactifs dépendent de sa concentration. En effet, nous avons observé une diminution progressive de la température de début de transition de 34,3°C (T_{peak} = 35,5°C) jusqu'à 30°C (T_{peak} = 32,2°C) pour des concentrations croissantes en ABP-A allant de 0,05 mM à 0,8 mM. En parallèle, la variation d'enthalpie diminue de 0,13 J/g à 0,002 J/g devenant très faible jusqu'à devenir immesurable à 0,8 mM et au-delà. Il est important de noter qu'à des concentrations supérieures à 0,65 mM, les intégrations des thermogrammes sont rendues difficiles dû à la très faible transition qui devient même invisible à 1 mM en ABP-A. Ces résultats permettent de montrer que la diminution de la température de transition dépend de la concentration en dendrimère validant ainsi que le dendrimère s'incorpore dans la bicouche des vésicules.

Discussion et conclusion

L'objectif de cette partie était d'optimiser la formulation du dendrimère dans les vésicules catanioniques de TriCat afin de pouvoir améliorer sa pénétration cutanée et de maximiser ainsi son effet anti-psoriasique.

Nous avons tout d'abord réussi à mettre au point une stratégie d'encapsulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat avec un fort rendement d'encapsulation (d'environ 80%). Cette stratégie optimisée repose sur la synthèse de la paire catanionique du TriCat en présence du précurseur sous forme acide du dendrimère ABP, ABP-A, très peu soluble dans l'eau. Conformément à l'étude de Castagnos *et al.* [285], ce rendement d'encapsulation élevé qui a été également obtenu avec une molécule photo-sensibilisatrice hydrophobe, la phthalocyanine de chloroaluminium, met en évidence l'incorporation du dendrimère ABP-A au sein de la bicouche de tensioactifs et pas seulement dans le cœur aqueux des vésicules de TriCat.

Nous avons ensuite étudié les caractéristiques physico-chimiques de la formulation TriCat/ABP-A. Après l'encapsulation de l'ABP-A, nous avons obtenu des vésicules sphériques présentant un diamètre moyen autour de 350 nm avec un indice de polydispersité (PDI) d'environ 0,3, indiquant une homogénéité acceptable des systèmes vésiculaires [293]. L'augmentation de la taille des vésicules de TriCat/ABP-A, par rapport aux vésicules vides et aux vésicules de TriCat/ABP, est en accord avec l'étude de Tah *et al.* qui ont également montré une augmentation de la taille des vésicules catanioniques SDS/CTAB lorsque l'insuline, protéine de masse moléculaire proche de celui du dendrimère (5800 Da), s'incorpore dans leur membrane [294]. Ensuite, les analyses du potentiel zêta ont permis de montrer que la charge superficielle des vésicules de TriCat/ABP-A était fortement négative avec un potentiel zeta à -53 mV, ce qui est supérieur à la valeur obtenue pour des vésicules de TriCat vides qui est autour de -30 mV. Cette augmentation de la charge négative à la surface des vésicules de TriCat/ABP-A peut s'expliquer par la contribution des groupements anioniques du dendrimère à la charge de ce système. Pour l'application envisagée pour ces vésicules, ces résultats sont prometteurs car plusieurs études ont montré qu'un système vésiculaire ayant un potentiel zêta négatif favorise la pénétration cutanée [295–297].

Comme la stabilité du système de vectorisation est un paramètre essentiel pour garantir son utilisation pour une application cutanée, nous avons vérifié que ces vésicules de TriCat/ABP-A présentent une très grande stabilité en présence du dendrimère inséré dans leur structure (plus de deux mois à + 4°C). Cette grande stabilité physique des vésicules de TriCat/ABP-A, contrairement à celle des vésicules de TriCat vides préparées par cette méthode, peut être expliquée d'une part par la présence d'une charge de surface négative plus élevée et donc à

des forces de répulsions électrostatiques plus élevées qui empêchent l'agrégation et la fusion des vésicules entre elles. Ceci est en accord avec l'étude de Yang *et al.* qui ont montré la stabilité pendant 6 mois de la formulation des gypénosides dans des nanoparticules lipidiques nanostructurées (NLC) ayant un potentiel zêta négatif élevé (-56,0 ± 3,4 mV) [298]. D'autre part, cette stabilité pourrait également être due à l'existence d'une interaction forte entre le dendrimère et les tensioactifs de TriCat qui renforce la stabilité de la formulation.

Nous avons également montré la stabilité de la formulation TriCat/ABP-A au pH de la peau qui est proche de 5, en moyenne de 4,7 [299], ce qui nous parait essentiel pour garantir l'intégrité de la formulation sur le site d'application. Cependant, une instabilité de la formulation TriCat/ABP-A a été observée à des pH > 6 avec une augmentation du diamètre moyen de 350 nm à 500 et 700 nm environ (donnée non représentée). Par ailleurs, un gradient de pH existe à travers la peau, passant de valeurs acides à la surface de la peau à un pH presque neutre autour de 7,4 dans l'épiderme viable [300–302]. Néanmoins, cette instabilité de la formulation à pH élevée pourrait être un avantage pour une application cutanée car elle pourrait commencer à déstabiliser et à libérer le dendrimère dans l'épiderme viable pour exercer ses effets thérapeutiques après avoir traversé la barrière cutanée, le *stratum corneum*.

Nous avons ensuite étudié les interactions qui existaient entre le dendrimère ABP-A et les bicouches de tensioactifs de TriCat. Nous avons observé une diminution de la température de transition de phase des chaines de TriCat en présence d'ABP-A et nous avons montré que cette diminution est concentration-dépendante. Ceci s'explique par l'insertion d'ABP-A au sein de la bicouche perturbant ainsi les interactions entre les molécules de tensioactifs. Ceci nous a permis de confirmer la présence d'une interaction forte entre l'ABP-A et la bicouche de TriCat qui pourrait contribuer à la stabilité de la formulation. Ce résultat est effectivement cohérent avec l'étude de Richard *et al.* qui ont montré une diminution de la T_{peak} de 36 à 31 °C et à 32,5 °C suite à l'insertion d'éthanol et de BDP (hydrophobe), respectivement, dans la bicouche de TriCat [288,289]. Castangia *et al.* ont également montré une diminution de la température de transition des chaines grasses de liposomes de 54°C à 50°C suite à l'intercalation du diclofénac dans leur membrane [303]. On peut conclure que l'ABP-A est capable de modifier la fluidité de la membrane en s'insérant au sein de la bicouche de TriCat grâce à sa faible hydrosolubilité. Ainsi, l'ABP-A rend la membrane des vésicules de TriCat plus fluide et désordonnée à la

température de la peau (T_{peau} variant entre 33 et 35°C). C'est une caractéristique importante en faveur de la pénétration cutanée. En effet, cela permet de limiter l'utilisation d'additifs modulant la fluidité de la bicouche des vésicules, tels que l'éthanol dans le cas des éthosomes. En conclusion, les caractéristiques physico-chimiques de la formulation TriCat/ABP-A en termes de taille, de potentiel zêta, d'efficacité d'encapsulation, de fluidité membranaire à la surface cutanée ainsi que leur grande stabilité traduisent leur pertinence en tant que système de vectorisation du dendrimère. Une étude de pénétration cutanée a donc été menée dans la partie III sur différents modèles de peaux *ex vivo* afin de valider la performance de notre formulation.

Partie III : Étude de la pénétration cutanée de la formulation *ex vivo*

Après avoir caractérisé la formulation la plus efficace pour l'encapsulation du dendrimère, nous avons réalisé des études de pénétration cutanée. L'objectif de ces études était d'évaluer la capacité des vésicules catanioniques à améliorer la pénétration du dendrimère dans les couches profondes de la peau en vue d'une application dans la prise en charge du psoriasis par voie cutanée.

Choix du modèle d'étude de pénétration cutanée

L'absorption cutanée d'un principe actif se fait par plusieurs étapes : la pénétration à travers le *stratum corneum* puis la diffusion à travers les différentes couches de l'épiderme viable et du derme et le passage ensuite vers la circulation sanguine. Cette pénétration cutanée peut être étudiée par différentes techniques *in vivo* et *ex vivo*. Les études *in vivo* sont idéales car elles présentent l'avantage d'étudier la pénétration cutanée des principes actifs dans leur conditions d'utilisation réelles mais sont souvent exclues pour des raisons éthiques et pratiques [304]. Pour cela, les modèles *ex vivo* sur peaux humaines, issues de chirurgies plastiques abdominales, ou animales sont les plus couramment utilisés. Les modèles animaux incluent le porc, la souris, le rat et le cochon d'inde [304]. L'inconvénient majeur des rongeurs est que leur peau présente des propriétés histologiques et barrières différentes de celles de l'homme. La peau d'oreille de cochon, quant à elle, est décrite comme le modèle le plus représentatif de la peau humaine [305–307]. En effet, la peau d'oreille de cochon est histologiquement similaire à la peau humaine au niveau de l'épaisseur du *stratum corneum*, de sa composition lipidique, de la densité pileuse, de la structure dermique et de la morphologie générale (**Figure 52**) [305]. De plus, des similitudes entre la peau porcine et la peau humaine ont été signalées au niveau des propriétés immunohistochimiques [308]. En plus d'avoir une structure similaire à la peau humaine, la peau d'oreille de cochon est également pratique à obtenir et a été largement utilisée dans les études de pénétration cutanée [304,309].

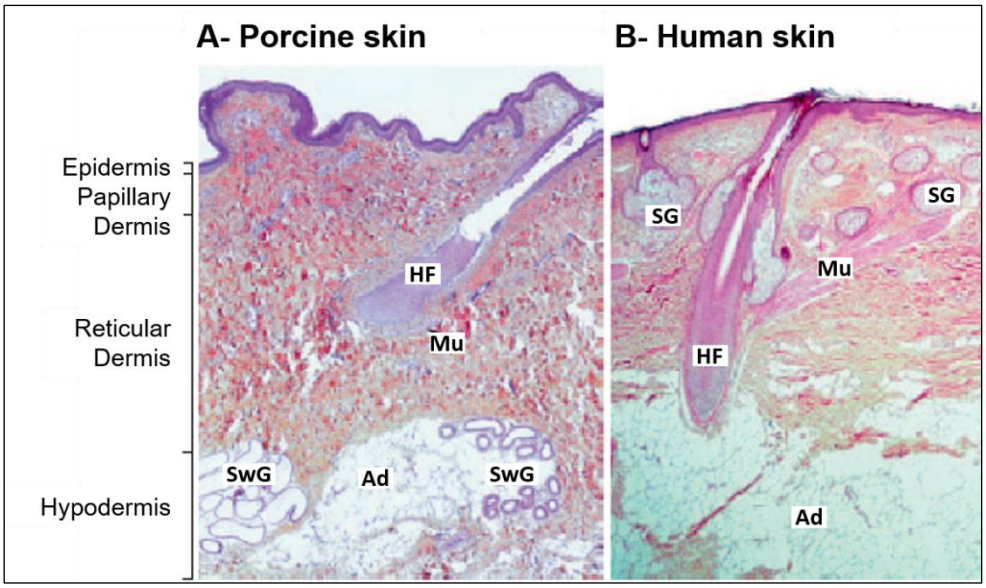


Figure 52. Aspect histologique comparable entre la peau d'oreille de cochon (A) et la peau humaine (B) (Coloration Hémalun-Eosine-Saffron). *HF : follicules pileux ; SwG : glandes sudoripares ; SG : glande sébacées ; AD : adipocytes ; Mu: muscle [308].*

La cellule de diffusion de Franz (**Figure 53**) est la technique la plus utilisée pour des études de perméation cutanée *ex vivo* [310]. La cellule de Franz comprend un compartiment donneur qui est séparé du compartiment récepteur par une membrane d'origine synthétique, animale ou humaine. La formulation est déposée dans le compartiment donneur, à la surface du *stratum corneum*, et va diffuser à travers les différentes couches de la peau vers le compartiment récepteur. Ces deux compartiments sont contrôlés en terme de température par une double enveloppe à courant d'eau. La composition du récepteur doit présenter une solubilité adéquate pour le principe actif et être biocompatible pour ne pas altérer la barrière cutanée [311]. Pour les principes actifs hydrosolubles, une solution tamponnée (pH= 7,4) est considérée comme le meilleur choix pour mimer la circulation sanguine. Après 24 heures, le passage transcutané ainsi que la rétention cutanée sont mesurés. En effet, le passage transcutané correspond à la quantité de principe actif dans le milieu récepteur. Cela traduit donc la quantité de principe actif qui a pu traverser la peau et atteindre la circulation systémique grâce à la vascularisation du derme. La rétention cutanée, quant à elle, correspond à la quantité de principe actif qui a été retenue dans l'épiderme et le derme après l'étape de diffusion et l'élimination de l'excédent de la formulation à la surface de la peau.

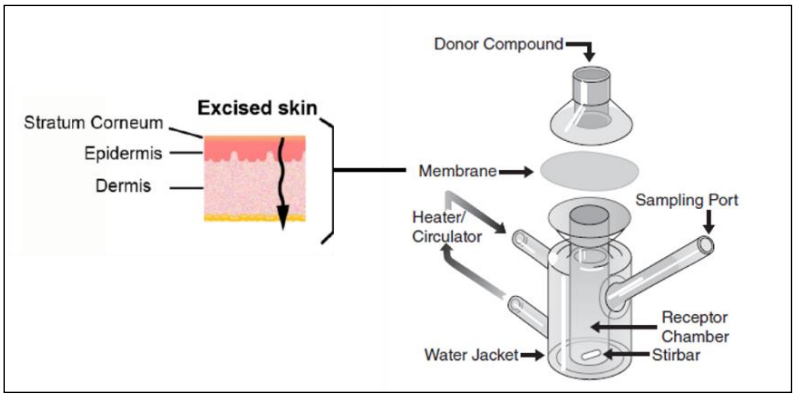


Figure 53. Schéma représentatif de la Cellule de Franz. *Adaptée de [311].*

Résultats :

1. Quantification de la rétention d'ABP-NIR dans la peau porcine

Dans notre étude, nous avons utilisé, dans un premier temps, le modèle de la peau d'oreille de cochon sur cellule de Franz pour évaluer le potentiel de pénétration cutanée de la formulation.

Nous avons récupéré les peaux d'oreilles de cochon aux abattoirs de Montauban. Les peaux ont été ensuite excisées, dégraissées afin d'éliminer le tissu adipeux, puis congelées afin de les conserver pour une utilisation ultérieure. En ce qui concerne l'effet de la congélation sur la pénétration cutanée des actifs, des études ont montré qu'aucune différence significative n'a été observée entre la peau fraiche et la peau congelée pendant une période au-delà d'un an [312,313].

Nous avons tiré profit des propriétés fluorescentes de l'ABP-NIR et de l'ABP-A-NIR pour quantifier par fluorimétrie le dendrimère retenu dans la peau et présent dans le milieu récepteur (PBS). Vu que nous formulons le dendrimère sous sa forme acide, nous avons donc voulu évaluer la pénétration cutanée des deux formes libres du dendrimère, neutre et acide. Le dendrimère a été donc appliqué à la surface de la peau sous ses formes libres et formulée à la même concentration afin de voir l'apport des vésicules. La température à la surface de la peau est maintenue à 35°C, car elle varie généralement entre 33 et 35°C en fonction de plusieurs facteurs (l'âge, le sexe, l'état sanitaire, l'activité physique et la région du corps)

[314]. Au contact de la surface cutanée, la membrane des vésicules devrait passer à l'état fluide désordonné.

Après 24 heures, nous n'avons rien détecté dans le compartiment récepteur que ce soit avec le dendrimère sous ses formes libres ou sous sa forme formulée. Cela pourrait être dû, soit à l'absence d'une pénétration à travers la peau, soit à la pénétration d'une très faible quantité non détectable due à la sensibilité de la technique. En ce qui concerne la rétention cutanée (**Figure 54**), la quantité de dendrimère retenue dans la peau après une administration d'ABP-A-NIR libre est légèrement supérieure à celle après l'application de l'ABP-NIR libre (1% ± 0,1 et 2% ± 0.2 de la dose appliquée de l'ABP-NIR et de l'ABP-A-NIR, respectivement). Cependant, cette augmentation n'est pas statistiquement significative (p>0,05). Cette légère augmentation peut être expliquée par la plus grande hydrophobie du dendrimère ABP-A-NIR. Lorsque la peau est traitée par la formulation TriCat/ABP-A-NIR, la quantité de dendrimère retenue dans la peau est significativement augmentée d'un facteur 2/3 (3,5% ± 0,3) (**Figure 54**). Cela montre clairement l'efficacité des vésicules catanioniques dans l'amélioration de la pénétration cutanée du dendrimère. De plus, la formulation démontre sa capacité à cibler le site cutané sans passage par voie systémique qui pourrait être à l'origine d'effets indésirables suite à une utilisation à long terme.

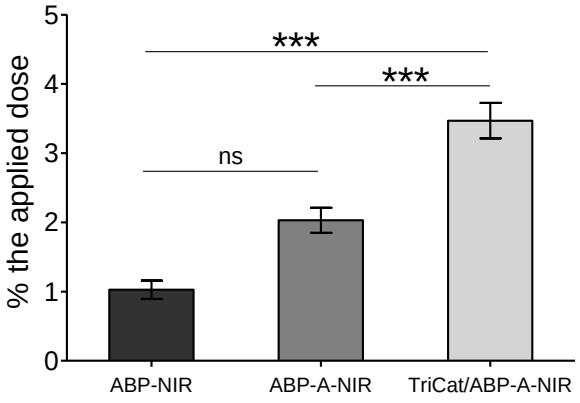


Figure 54. Pourcentage de dendrimère retenue dans la peau d'oreille de cochon (épiderme + derme) après 24 heures de l'application des solutions suivantes sur la surface de la peau : ABP-NIR (n=4), ABP-A-NIR (n=9) et formulation TriCat/ABP-A-NIR (n=15). *Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM (standard error mean). Après évaluation de la normalité des données par un test Shapiro-Wilk, les analyses statistiques ont été effectuées par un test One Way ANOVA suivi du test Tukey pour comparer les trois groupes entre eux. ***p <0,001 ; ns = non significatif p >0,05.*

2. Évaluation de la profondeur de pénétration cutanée par microscopie confocale

2.1. Évaluation de la profondeur de pénétration sur peau porcine

Après avoir montré que la formulation TriCat/ABP-A-NIR a permis d'augmenter significativement la rétention cutanée du dendrimère, nous avons voulu évaluer par microscopie confocale la profondeur de pénétration. Comme l'expérience précédente, nous avons comparé la profondeur de pénétration cutanée du dendrimère sous sa forme formulée, TriCat/ABP-A-NIR, à celle du dendrimère sous ses deux formes libres, ABP-NIR et ABP-A-NIR. Après 24 heures de traitement, les échantillons de peaux d'oreille de cochon ont été démontés des cellules de Franz, lavés au PBS, bien séchés puis congelés. Des cryo-coupes de 10 µm ont été faites pour la visualisation de la profondeur de pénétration dans la peau par un microscope confocal. La fluorescence de l'ABP-NIR est codée en rouge. Une peau contrôle traitée au PBS a été utilisée pour évaluer l'auto-fluorescence de la peau dans le canal de l'ABP-NIR (**Figure 55A**).

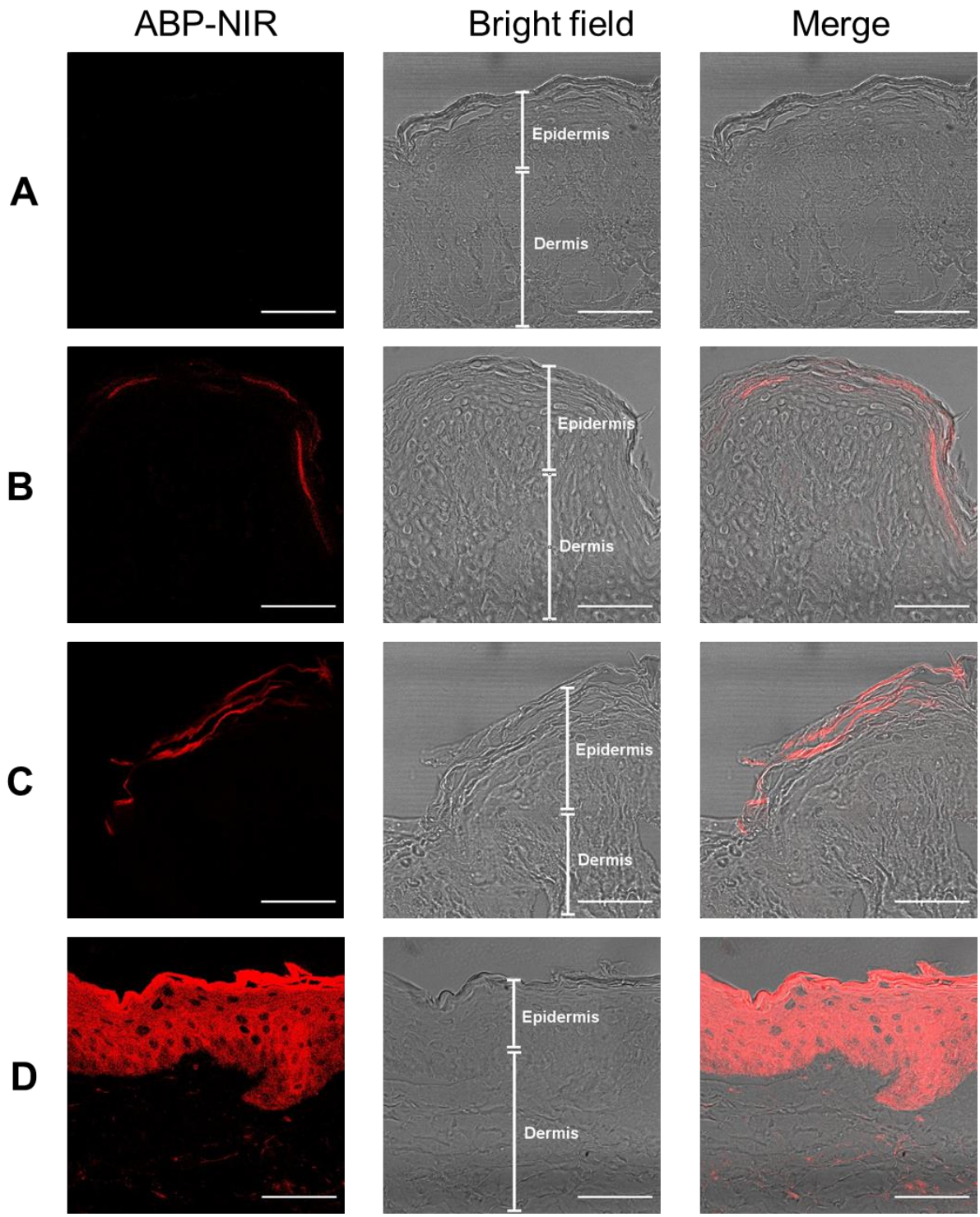


Figure 55. Observation de la profondeur de pénétration cutanée ex vivo sur peau porcine. *Images représentatives de microscopie confocale de coupes de peau de 10 µm d'épaisseur obtenues après la diffusion de PBS (contrôle) (A), d'ABP-NIR libre (B), d'ABP-A-NIR libre (C) et de la formulation TriCat/ABP-A-NIR (D) dans la peau d'oreille de cochon après 24h à 35 °C. La barre d'échelle représente 50 µm.*

La **figure 55** montre que les peaux d'oreilles de cochon traitées par les dendrimères libres, ABP-NIR (B) et ABP-A-NIR (C), présentent une fluorescence rouge répartie uniquement dans les couches de *stratum corneum* et absente dans les couches profondes de la peau (épiderme viable + derme). Cependant, lorsque le dendrimère ABP-A-NIR est formulé dans les vésicules de TriCat (D), une distribution plus large de la fluorescence rouge a été observée dans le *stratum corneum* et également plus profondément dans l'épiderme viable. De plus, la fluorescence rouge du dendrimère apparaît aussi dans des zones du derme. En conclusion, cette étude permet de montrer que le dendrimère ne pénètre profondément dans la peau que lorsqu'il est formulé dans les vésicules de TriCat, sinon il reste dans le *stratum corneum.*

2.2. Évaluation de la profondeur de pénétration sur peau humaine

Afin de valider ce résultat, nous avons également évalué la pénétration cutanée sur des explants de peaux humaines issues de chirurgies plastiques abdominales (société Genoskin®). La diffusion des échantillons dans la peau humaine a été faite selon le protocole précédemment décrit. Dans cette étude, nous avons comparé la pénétration de l'ABP-NIR libre à l'ABP-A-NIR formulé dans les vésicules de TriCat. L'ABP-A-NIR sous forme libre n'a pas été testée pour deux raisons ; d'une part, car les deux formes libres ont montré un comportement similaire sur peau porcine, et d'autre part, nous n'avons pas eu assez des explants de peaux humaines et donc nous avons choisi de limiter notre étude à la forme neutre du dendrimère libre.

L'explant de peau humaine traité par du PBS montre l'absence d'auto-fluorescence de la peau dans le canal de l'ABP-NIR (**Figure 56A**). La **figure 56B** a permis de montrer qu'après 24 heures d'application, le dendrimère non formulé est accumulé dans les premières couches du *stratum corneum.* La formulation, quant à elle, a permis une pénétration plus profonde de dendrimère dans le *stratum corneum*, dans l'épiderme viable et également dans des zones du derme (**Figure 56C**). Ces résultats confirment ce que nous avons obtenus avec les études de pénétration sur peau porcine.

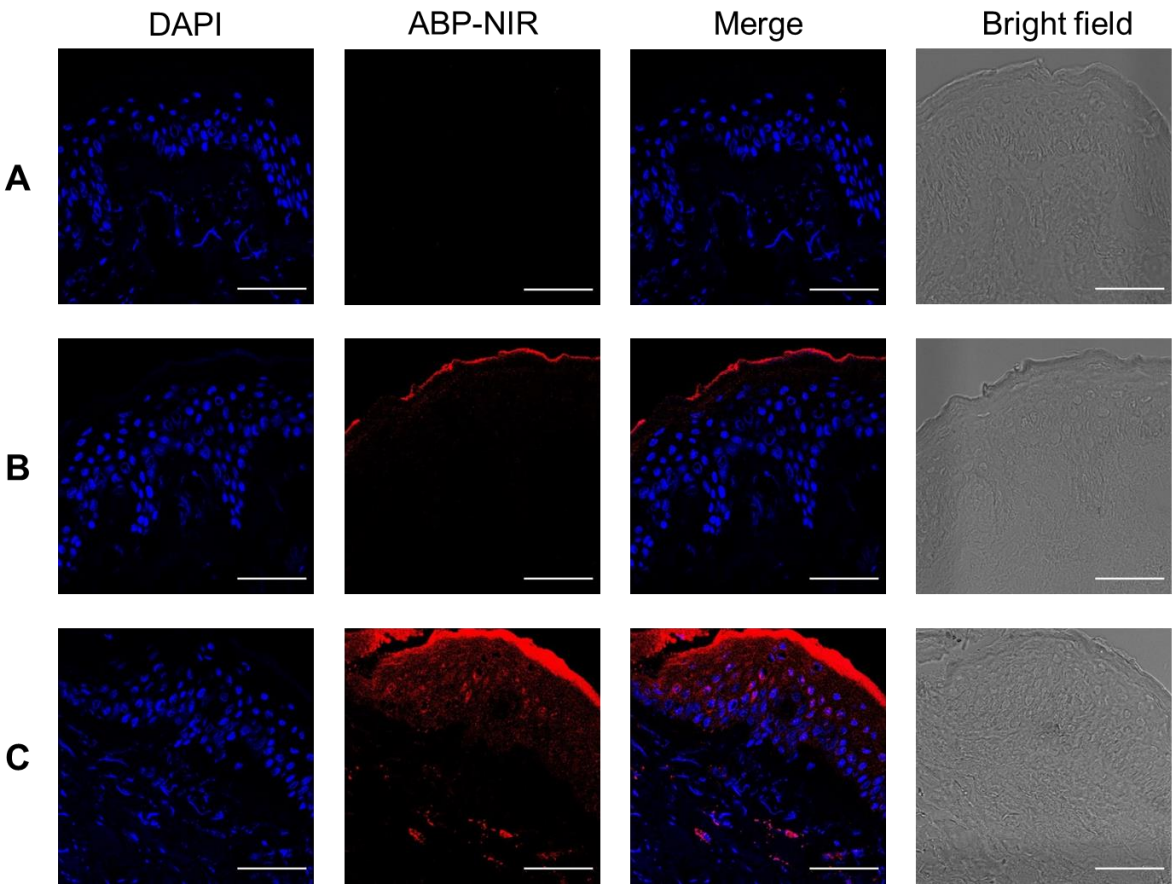


Figure 56. Observation de la profondeur de pénétration cutanée ex vivo sur peau humaine. *Images représentatives de microscopie confocale de coupes de peau de 10 µm d'épaisseur obtenues après la diffusion de PBS (contrôle) (A), d'ABP-NIR libre (B) et de la formulation TriCat/ABP-A-NIR (C) dans la peau humaine après 24h à 35 °C. Le DAPI a été utilisé pour la coloration des noyaux (bleu). La barre d'échelle représente 50 µm.*

2.3. Évaluation de la profondeur de pénétration sur peau murine psoriasique induite par l'IMQ

Pour compléter notre étude de l'évaluation de la profondeur de pénétration cutanée du dendrimère ABP-A-NIR formulé dans les vésicules du TriCat, nous avons choisi d'utiliser une peau psoriasique murine induite par l'IMQ (*cf* chapitre 1 partie **6**), vu que la formulation est destinée pour la prise en charge du psoriasis. Bien que la peau porcine soit une alternative bien reconnue à la peau humaine pour les études de pénétration, il n'existe toujours pas de modèle de peau porcine développé pour simuler les lésions psoriasiques.

2.3.1. Caractérisation des lésions cutanées induites par IMQ

Afin d'induire une inflammation cutanée comparable à la peau psoriasique selon le protocole décrit par van der Fits *et al.,* nous avons appliqué chaque jour la crème d'Aldara crème (5% IMQ) sur le dos rasé et épilé des souris Balb/c pendant 7 jours. Nous avons appliqué dans les mêmes conditions la vaseline, qui est utilisée dans la majorité des études comme contrôle, et également le xanthane qui est l'un des excipients neutres présent dans la crème d'Aldara. À J7, les souris ont été sacrifiées et les peaux traitées ont été récupérés pour les analyses histologiques et les études de pénétration cutanée *ex vivo.*

L'analyse histologique au dernier jour montre que les souris traitées par la vaseline présentent une légère inflammation par rapport à celles traitées par le xanthane. En effet, la **figure 57B** montre que les souris traitées par la vaseline présentent un épiderme plus épais et plus d'infiltrat immunitaire dans le derme que les souris traitées par le xanthane. Cette différence est moins évidente au niveau macroscopique (**Figure 57A**). Ceci nous a conduits à abandonner l'utilisation de la vaseline comme contrôle dans les prochaines expériences. Cependant, pour les souris traitées avec l'IMQ, l'observation macroscopique met bien en évidence la présence des lésions cutanées érythémateuses, squameuses et épaisses. Cette observation est confirmée par une analyse histologique qui montre le développement des caractéristiques histopathologiques du psoriasis : l'acanthose, l'hyperkératose, la parakératose, l'absence de la couche granuleuse, la spongiose (œdème intercellulaire qui élargit les espaces interkératinocytaires de l'épiderme), la présence d'un infiltrat immunitaire dense et la formation des micro-abcès de Munro (**Figure 57B**).

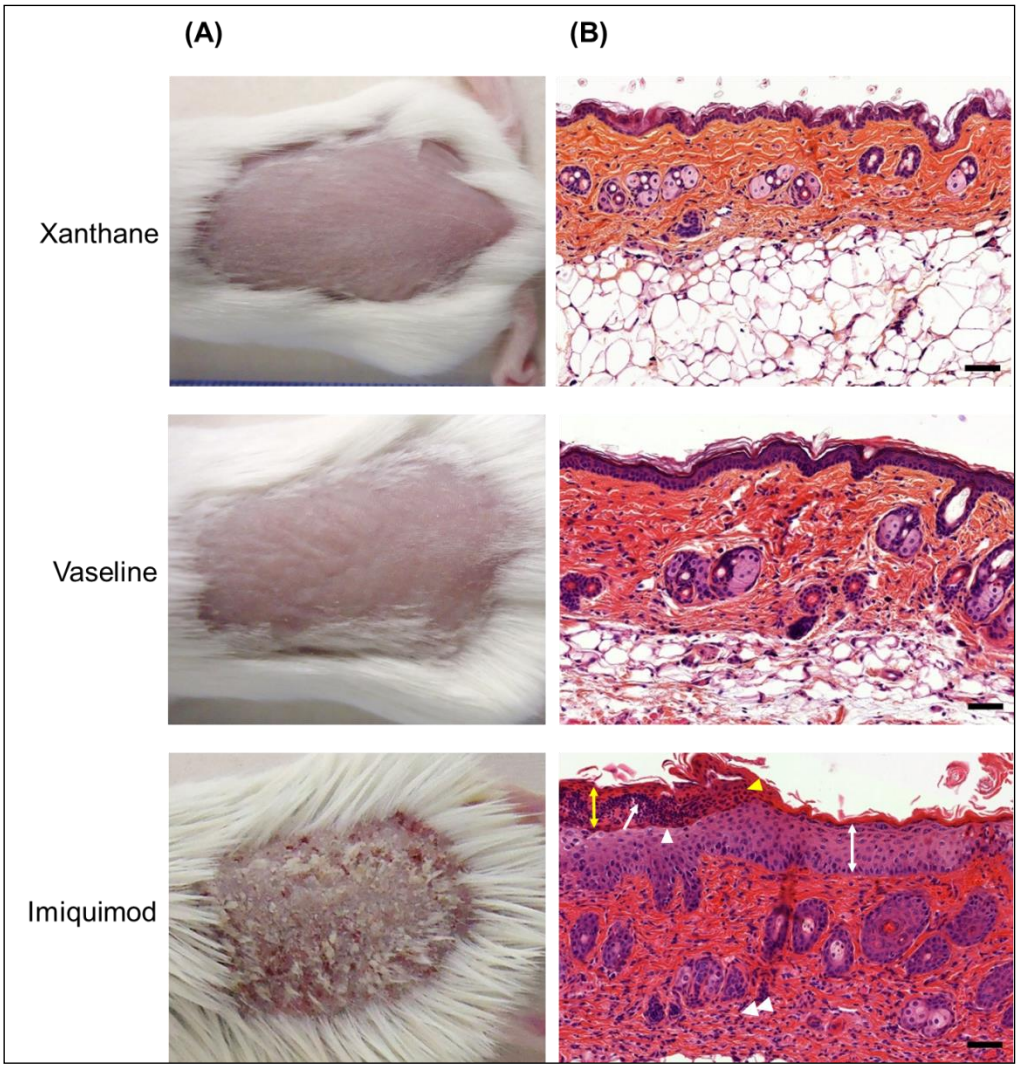


Figure 57. Observations macroscopiques et microscopiques de la peau du dos des souris Balb/c traitées quotidiennement par le xanthane, la vaseline ou l'imiquimod. *(A) Phénotype des souris à J7. (B) Coupes histologiques représentatives de la peau du dos des souris après coloration HE à J7. La barre d'échelle représente 50 µm. Les flèches à deux pointes, blanche et jaune, indiquent l'acanthose et l'hyperkératose, respectivement, la flèche blanche à pointe unique représente le micro-abcès de Munro, les triangles blanc et jaune montrent l'absence de la couche granuleuse et la parakératose, respectivement, et le double triangle blanc montre l'infiltrat immunitaire.*

Donc, on peut conclure que l'application journalière d'IMQ a permis d'obtenir une inflammation cutanée ayant les principales caractéristiques du psoriasis, ce qui est en accord avec l'étude de van der Fits *et al.*

2.3.2. Étude de pénétration cutanée *ex vivo*

Afin d'étudier la pénétration cutanée de la formulation *ex vivo* sur peau psoriasique induite par l'IMQ, les peaux traitées par l'IMQ ont été montées sur cellule de Franz puis traitées par le dendrimère sous ses formes libres et formulée selon le protocole précédemment décrit.

La distribution de la fluorescence du dendrimère dans la peau de la souris psoriasique traitée par le dendrimère sous formes libres et formulée est illustrée dans la **figure 58** (B, C et D). Afin de déterminer si l'auto-fluorescence de la peau psoriasique interfère avec l'intensité de florescence de l'ABP-NIR, une peau psoriasique contrôle a été utilisée et a permis de montrer l'absence de signal de florescence dans le canal d'ABP-NIR, comme illustrée dans la **figure 58A**. Les **figures 58B** et **58C** montrent la distribution d'ABP-NIR dans les peaux traitées par les deux formes libres du dendrimère, neutre et acide, respectivement. Une intensité de fluorescence élevée est observée dans les couches profondes du *stratum corneum* qui diminue progressivement dans l'épiderme viable et le derme. Pour chacune des deux conditions, les deux images représentatives de la même coupe de peau montrent une hétérogénéité de la fluorescence de pénétration tout le long de la coupe. Lorsque le dendrimère est encapsulé dans les vésicules, une intensité de fluorescence plus élevée est observée dans le *stratum corneum* et surtout dans les couches plus profondes de l'épiderme viable et dans des zones du derme. Cette intensité de fluorescence est homogène le long de la coupe comme l'illustre la **figure 58D**. Afin de mieux comparer la pénétration des différents groupes, une analyse quantitative de la fluorescence dans la peau par spectrofluorimétrie, comme décrit dans la partie 1, serait intéressante à réaliser. Cependant, cette quantification en microscopie confocale n'est pas possible vu que le dendrimère formulé et non formulé ne fluorescent pas de la même manière et nous n'avons pas pour le moment d'informations sur la forme du dendrimère dans la peau s'il existe sous sa forme libre ou toujours en association avec les constituants vésiculaires.

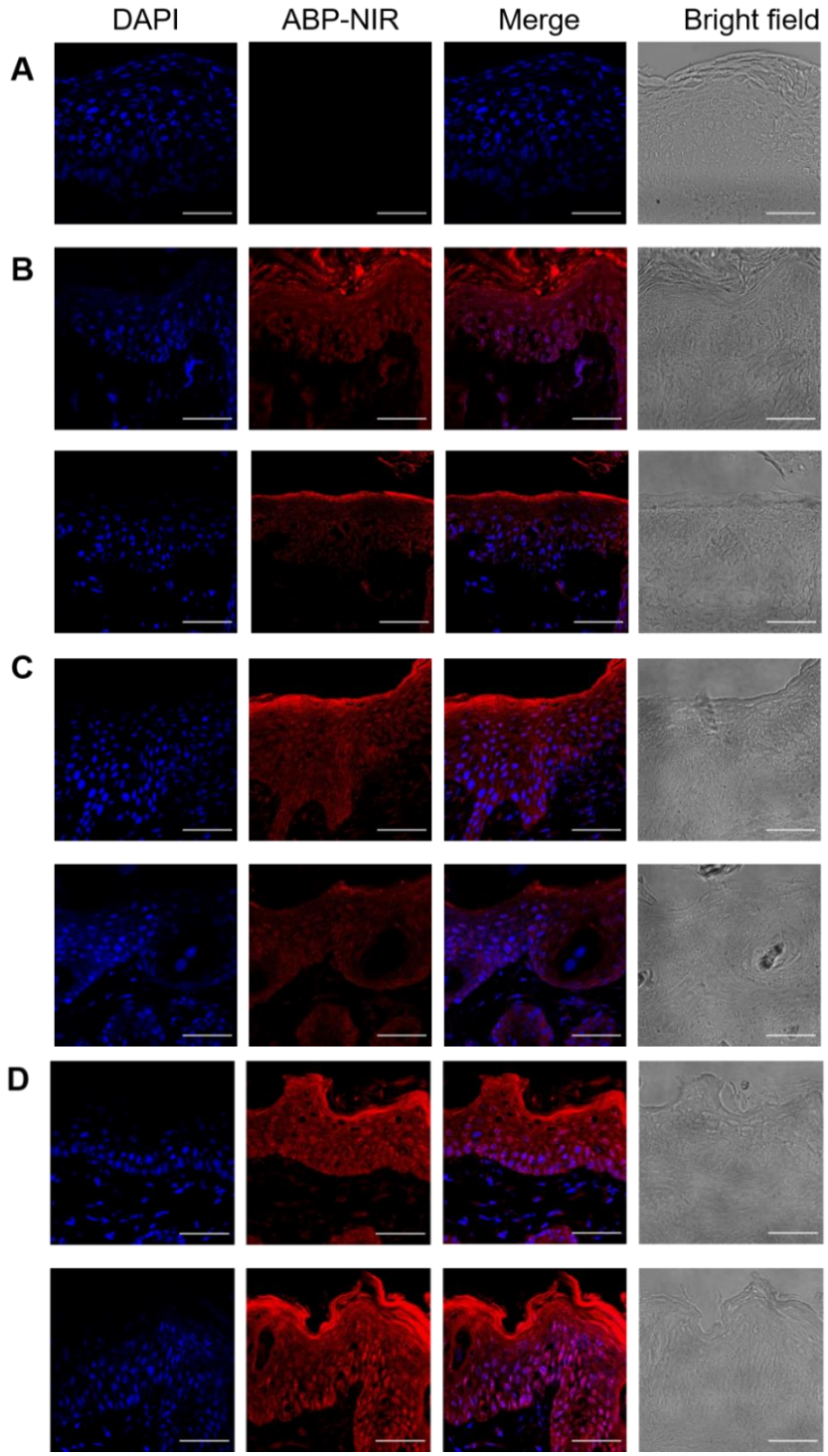


Figure 58. Observation de la profondeur de pénétration cutanée ex vivo sur peau psoriasique murine induite par l'IMQ. *Images représentatives de microscopie confocale de coupes de peau de 10 µm d'épaisseur obtenues après la diffusion de PBS (contrôle) (A), d'ABP-NIR libre (B), d'ABP-A-NIR libre (C) et de la formulation TriCat/ABP-A-NIR (D) dans la peau psoriasique induite par l'IMQ après 24h à 35 °C (deux images par coupe pour chacune des conditions). Le DAPI a été utilisé pour la coloration des noyaux (bleu). La barre d'échelle représente 50 µm.*

Pour résumer, les dendrimères non formulés, ABP-NIR et ABP-A-NIR, pénètrent dans l'épiderme et le derme de la peau psoriasique induite par l'IMQ. Ce résultat a déjà été observé dans notre première publication où nous avons montré que la pénétration du dendrimère dans la peau psoriasique est à l'origine de son effet anti-psoriasique (*cf* partie **I**). Ce comportement de pénétration des dendrimères libres dans la peau psoriasique semble être différent de leurs comportements dans les peaux porcine et humaine saines, ce qui est logique vu que d'une part, la peau murine est plus perméable que les peaux humaine et porcine, et d'autre part, il est connu que la peau murine psoriasique présente une fonction barrière altérée par rapport aux peaux porcine et humaine saines. L'hétérogénéité de l'intensité de fluorescence observée avec les dendrimères non formulés pourrait être due à la présence de zones de la peau plus ou moins altérées, donc plus ou moins perméables à la pénétration des dendrimères.

Discussion et conclusion

L'objectif de cette troisième partie était d'évaluer l'aptitude de la formulation TriCat/ABP-A-NIR à améliorer la pénétration du dendrimère ABP dans les couches cutanées profondes. Nous avons étudié la pénétration cutanée durant 24 heures *ex vivo* sur différents modèles de peaux en utilisant les cellules de diffusion de Franz. Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier la pénétration cutanée de la formulation TriCat/ABP-A-NIR sur la peau d'oreille de cochon qui est le modèle le plus représentatif de la peau humaine [307,315] et qui est recommandé par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE). Nous avons premièrement montré que la formulation TriCat/ABP-A-NIR favorise la rétention du dendrimère dans la peau d'oreille de cochon de manière significative par rapport aux formes libre du dendrimère. En effet, les études par microscopie confocale ont démontré que les deux formes libres du dendrimère, neutre et acide, sont retenues dans les couches superficielles de l'épiderme, le *stratum corneum*. Par contre, la formulation TriCat/ABP-A-NIR est capable d'améliorer significativement la pénétration du dendrimère jusqu'à l'épiderme viable et le derme.

Dans un second temps, nous avons évalué la pénétration cutanée sur des explants de peaux humaines. Nous avons démontré que, comme pour la peau d'oreille de cochon, la formulation TriCat/ABP-A-NIR permet une pénétration plus importante du dendrimère jusqu'au derme.

Vu que la formulation est destinée au traitement du psoriasis par voie cutanée, nous avons évalué, dans un troisième temps, la pénétration cutanée du dendrimère sous ses formes libres et formulée sur un modèle de peau psoriasique induite par l'IMQ. Nous avons démontré par la suite que les deux formes libres du dendrimère pénètrent dans la peau malade contrairement à ce que nous avons observé dans la peau saine. En effet, le *stratum corneum*, comme déjà vu, est la principale barrière qui s'oppose à la pénétration des actifs. Cette altération du *stratum corneum* dans la peau murine psoriasique induite par l'IMQ a considérablement réduit les propriétés barrières de la peau et a favorisé par la suite la pénétration du dendrimère. Nos résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Lin *et al.* qui ont montré une augmentation de la rétention de médicaments anti-psoriasiques dans la peau psoriasique induite par l'IMQ par rapport à la peau normale. En effet, la rétention cutanée de l'acide 5-aminolévulinique (log P= -1,5), de calcipotriol (log P= 3,88), et de l'acide rétinoique (log P= 6,3) a été augmenté d'un facteur de 5,61, de 8,08 et de 1,66, respectivement [316]. Sun et *al.* ont également montré une amélioration significative de la pénétration de la 5-fluouracile (log P= -0,95) et de l'indométacine (log P= 4,27) dans la peau murine psoriasique induite par l'IMQ par rapport à la peau normale [317]. De plus, nous avons également montré que la formulation, contrairement à l'hétérogénéité de l'intensité de fluorescence dans les peaux traitées par les dendrimères libres, induit une répartition de l'intensité de fluorescence élevée et homogène dans les coupes de peaux malades. Ceci indique bien que la formulation TriCat/ABP-A-NIR favorise la pénétration cutanée du dendrimère, y compris au niveau des zones cutanées les moins altérées.

En plus des études sur peaux porcine, humaine et murine psoriasique, des études sont en cours dans nos équipes en collaboration avec l'unité de différenciation épidermique et autoimmunité rhumatoïde (UDEAR), dans le cadre de l'ANR TANDANSS (Agence nationale de la recherche), pour évaluer le pouvoir de pénétration de la formulation sur des épidermes humains reconstruits (RHE, Reconstituted Human Epidermis) produits *in vitro* à partir de kératinocytes isolés de biopsie de peaux humaines (un autre modèle cutané).

L'ensemble de ces résultats permettent de démontrer l'apport indéniable de notre formulation en tant que système d'administration par voie cutanée. Cette amélioration de la

pénétration du dendrimère pourrait être très efficace pour le traitement du psoriasis en raison de la pénétration de l'actif dans l'épiderme viable et le derme (sites d'action). La fluidité de la membrane des vésicules à la température de la peau semble être responsable de cette meilleure pénétration cutanée du dendrimère [289]. A l'instar de la fluidité et la déformabilité de la membrane des transfersomes (suite à l'insertion d'un Edge Activator EA) et des éthosomes (suite à l'insertion d'éthanol), la fluidité de la membrane des vésicules catanioniques suite à l'insertion d'ABP-A pourrait permettre aux vésicules à traverser les espaces intercellulaires étroits du *stratum corneum* et libérer par la suite le dendrimère encapsulé dans l'épiderme viable. En effet, des travaux antérieurs réalisés dans notre équipe ont permis de démontrer qu'une interaction entre des vésicules catanioniques de TriCat et des vésicules unilamellaires géantes (GUV), utilisées comme modèles de membranes cellulaires, peut conduire à la fusion spontanée des membranes lipidiques des deux systèmes [287,318]. Ceci pourrait aussi expliquer la capacité des vésicules catanioniques à interagir avec les lamelles lipidiques intercellulaires du *stratum corneum* facilitant ainsi leurs propres voies à travers le *stratum corneum* vers l'épiderme viable.

Partie IV : Évaluation des propriétés anti-inflammatoires de la formulation *in vitro*

Grâce à la formulation TriCat/ABP-A que nous avons mise au point et optimisée, nous avons obtenu des vésicules encapsulant le dendrimère jusqu'à 80% environ, fluides à la surface cutanée et présentant une grande stabilité dans le temps. De plus, nous avons validé l'efficacité de cette formulation à améliorer la pénétration du dendrimère vers les couches profondes de la peau.

Dans la suite de notre étude, nous avons voulu évaluer l'effet biologique du dendrimère formulé *in vitro.* En effet, nous avons voulu voir si la formulation pourrait empêcher ou modifier la capacité du dendrimère à induire son activité anti-inflammatoire *in vitro.* Nous avons également voulu évaluer si le vecteur lui-même (vésicules vides) présente un effet biologique *in vitro.* Le dendrimère ABP, comme illustré dans le chapitre 1 partie **5.2.2**, présente des propriétés biologiques de type anti-inflammatoires et immuno-modulatrices envers différentes cellules immunitaires. Dans cette partie, nous avons choisi de nous focaliser sur l'effet du dendrimère formulé sur l'activité anti-inflammatoires des monocytes humains primaires *in vitro*, qui est la cible du dendrimère la plus étudiée *in vitro* [124,127,138,319]. Le dendrimère ABP, comme illustré dans la partie bibliographique, se lie spécifiquement et rapidement (en quelques secondes) à la surface des monocytes suivie d'une internalisation rapide (en quelques minutes) dans les monocytes [127]. Cette internalisation est l'un des mécanismes permettant à l'ABP d'induire une activité anti-inflammatoire sur les monocytes. Cette activité anti-inflammatoire est révélée par des changements morphologiques (une augmentation de la taille et la granulosité des monocytes) et une diminution de l'expression des marqueurs à sa surface tels que celle de HLA-DR (molécules de CMH classe II) (au niveau phénotypique) [127].

Dans cette partie, nous avons d'abord vérifié que l'ABP et son analogue fluorescent ABP-NIR présentent une activité biologique similaire. Nous avons ensuite étudié l'effet anti-inflammatoire du dendrimère formulé sur les monocytes humains *in vitro*. Pour cela, nous avons évalué, dans un premier temps, l'effet de la formulation TriCat/ABP-A-NIR sur l'internalisation du dendrimère par les monocytes humains, et dans un deuxième temps, nous

avons évalué la capacité du dendrimère formulé à induire une activation des monocytes vers un phénotype anti-inflammatoire.

Résultats

1. Évaluation des propriétés anti-inflammatoires d'ABP-NIR

Nous avons voulu d'abord vérifié que l'analogue fluorescent d'ABP, ABP-NIR, récemment synthétisé au LCC, est biologiquement actif de la même façon qu'ABP, comme déjà montré avec les autres analogues fluorescents d'ABP émettant dans le vert, l'ABP-FITC et l'ABP-julolidine [124,127]. Nous avons donc comparé l'activité d'ABP et d'ABP-NIR sur monocytes humains aux niveaux morphologique et phénotypique. Les monocytes ont été purifiés à partir des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de donneurs sains. Les monocytes purifiés sont ensuite mis en culture en présence d'ABP et d'ABP-NIR à des concentrations croissantes (0,2, 2 ou 20 µM) pour 3 jours à 37°C afin de visualiser les changements morphologiques et l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes. La **figure 59A** montre que l'ABP-NIR induit des modifications morphologiques des monocytes d'une façon comparable à l'ABP et que ces modifications sont dépendantes de la concentration (inactif à 0,2 µM, activité à 2 µM et une forte activité à 20 µM). Au niveau phénotypique, l'ABP-NIR, comme l'ABP, diminue également l'expression de HLA-DR à partir de 2 µM (**Figure 59B)**. De plus, cette étude par cytométrie en flux permet de montrer que les monocytes sont marqués par l'ABP-NIR et que ce marquage est concentration-dépendante (**Figure 59C**). Afin de confirmer que ce marquage est dû à l'internalisation d'ABP-NIR dans les monocytes, comme ce que nous avons observé avec les autres analogues fluorescents d'ABP (ABP-FITC et ABP-Julolidine), une étude par microscopie confocale sera réalisée dans la partie suivante.

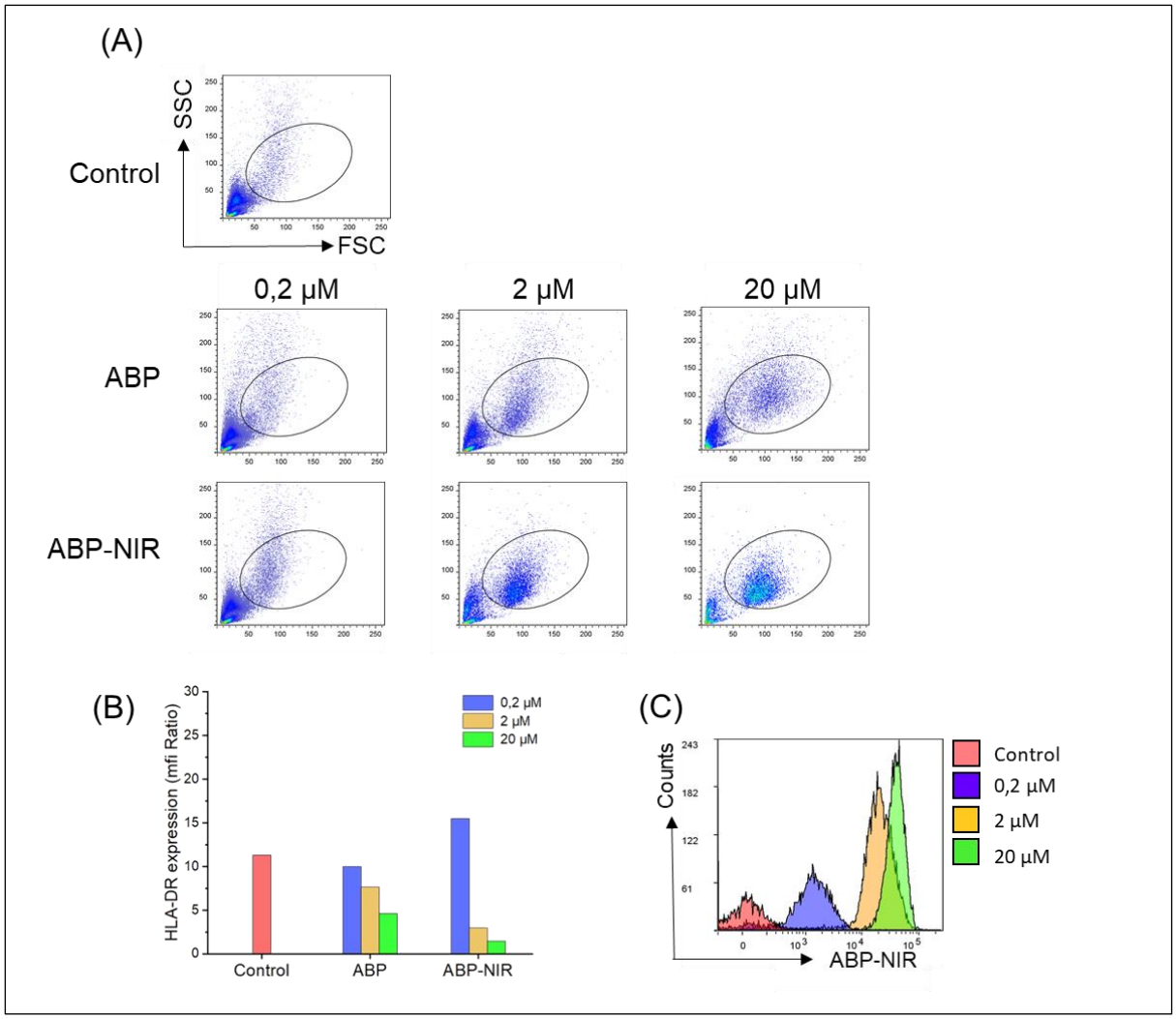


Figure 59. Comparaison de l'activité anti-inflammatoire d'ABP et d'ABP-NIR sur monocytes humains à 0,2 ,2 ou 20 µM par cytométrie en flux. *(A) Analyse des changements morphologiques, la taille (FSC, Forward Scatter) et la granulosité (SSC, Side Scatter), des monocytes (l'éllipse) incubés pendant 3 jours en présence de H_2O (contrôle), d'ABP et d'ABP-NIR. (B) Analyse de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes. (C) Superposition de l'intensité de fluorescence des monocytes contrôle et des monocytes marqués à l'ABP-NIR (canal APC-Cy7) à des concentrations croissantes. Résultats d'1 donneur représentatif de 7.*

L'ensemble de ces résultats démontrent que le dendrimère ABP et son analogue fluorescent, l'ABP-NIR, présentent une activité anti-inflammatoire similaire, ce qui permet de valider l'utilisation d'ABP-NIR pour les expériences biologiques.

2. Internalisation du dendrimère par les monocytes humains

Nous avons étudié l'internalisation du dendrimère non formulés et formulé par les monocytes humains. Des monocytes seuls (contrôle négatif), ainsi que des monocytes incubés avec le

dendrimère sous ses formes libres et formulée à la même concentration (20 µM) pour 1 heure à 37°C ont été visualisés par microscopie confocale. Le contrôle négatif comportant les monocytes seuls (A) a montré l'absence de l'auto-fluorescence cellulaire dans le canal d'ABP-NIR (A). Les monocytes traités par le dendrimère sous ses formes libres, ABP-NIR (B) et ABP-A-NIR (C), ainsi qu'avec le dendrimère formulé TriCat/ABP-A-NIR (D), ont permis de visualiser la fluorescence d'ABP-NIR dans le compartiment intracellulaire (**Figure 60**).

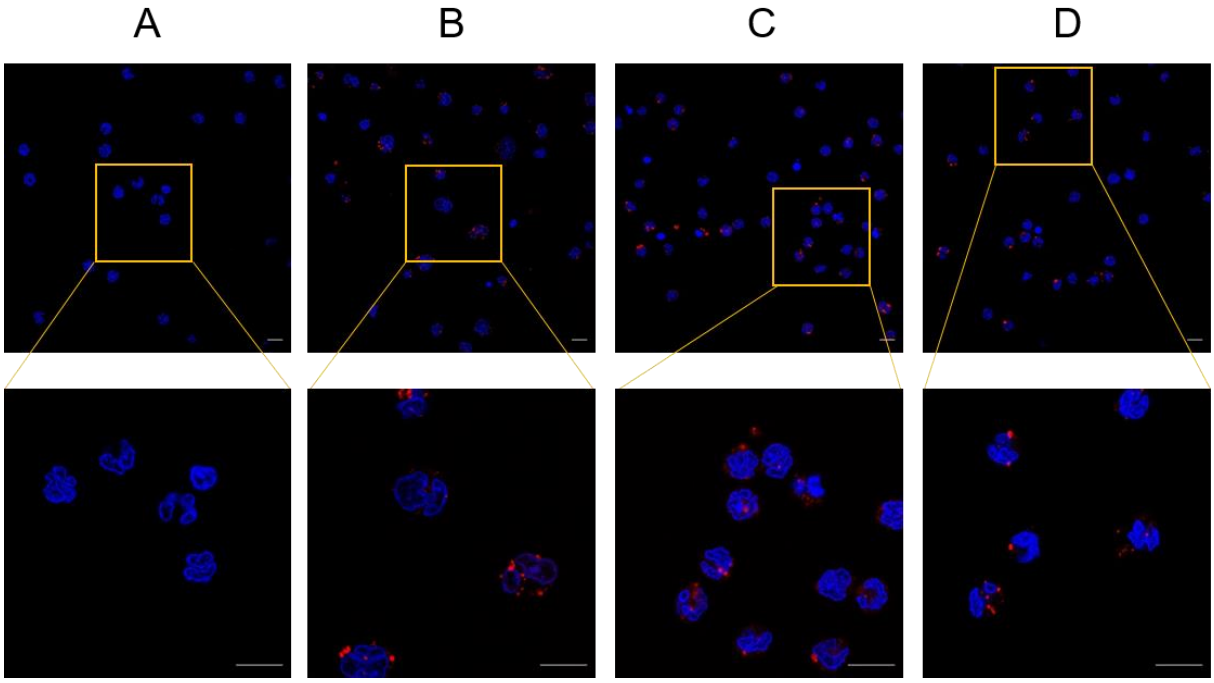


Figure 60. Observation de l'internalisation du dendrimère par les monocytes humains par microscopie confocale. *Images représentatives de monocytes humains (contrôle négatif) (A) incubés pendant 1h à 37°C en présence d'ABP-NIR (B), d'ABP-A-NIR (C) et de la formulation TriCat/ABP-A-NIR (D). Le noyau des monocytes est marqué par le DAPI et l'ABP-NIR est codé en rouge. Les images en bas correspondent au grossissement x3 de celles en haut. La barre d'échelle représente 10 µm.*

Ces résultats confirment d'une part que l'ABP-NIR, comme les autres analogues fluorescents d'ABP, l'ABP-FITC et l'ABP-Julolidine [124,127], est internalisé par les monocytes humains. D'autre part, ces résultats démontrent que la formulation du dendrimère dans les vésicules de TriCat n'empêche pas son internalisation par les monocytes humains. Nous avons étudié par la suite la capacité du dendrimère internalisé à induire une activation anti-inflammatoire des monocytes *in vitro*.

3. Activation anti-inflammatoire des monocytes humains

À travers des analyses morphologiques et de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes, les effets biologiques sur monocytes humains du dendrimère formulé et non formulé, ainsi que celui du vecteur seul (TriCat vides) ont été comparés. Nous avons d'abord visualisé la morphologie des monocytes, en termes de taille et de granulosité, incubés avec le dendrimère sous ses formes libres et formulée à des concentrations en dendrimère comprises entre 0,2 µM et 20 µM (**Figure 61A**). Après 5 jours de culture, sans aucune stimulation, le nombre de monocytes (contrôle négatif) a diminué car la majorité des cellules sont mortes ou mourantes (diminution de la FSC et une augmentation de la SSC) (A). Au niveau morphologique, le dendrimère sous ses deux formes libres (b et c) induisent une activation des monocytes, illustrée par une augmentation progressive de la taille des cellules à partir de 2 µM. L'augmentation de la granulosité par rapport au contrôle, quant à elle, n'a pas pu être observée d'une façon nette car les monocytes seuls après 5 jours de culture sont mourants, taille petite et granulosité très augmentée. Ceci masque donc l'observation en cytométrie de l'augmentation de la granulosité des cellules induite par l'ABP. Le dendrimère formulé (d) induit également un changement morphologique des monocytes. Contrairement au dendrimère sous ses formes libres et formulée, le TriCat seul (e), aux concentrations correspondantes à celles dans la formulation, n'induit aucun changement morphologique et donc n'active pas les monocytes.

Selon le stimulus qu'ils reçoivent, les monocytes s'orientent vers une activation pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Afin de confirmer donc que cette activation induite par le dendrimère formulé n'est pas modifiée et est anti-inflammatoire, comme celle induite par le dendrimère non formulé, nous avons évalué l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes dans les différentes conditions à la concentration de 20 µM en dendrimère et 40 µM en TriCat. Nous avons détecté que le dendrimère sous ses formes libres ainsi que celui sous sa forme formulée induisent une diminution significative de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes alors que le TriCat ne modifie pas son expression (**Figure 61B**). L'ensemble de ces résultats permettent de montrer que d'une part, la formulation n'empêche pas le dendrimère à induire son effet anti-inflammatoire *in vitro* et d'autre part, que le TriCat seul est inactif et ne présente pas d'activité biologique sur monocytes.

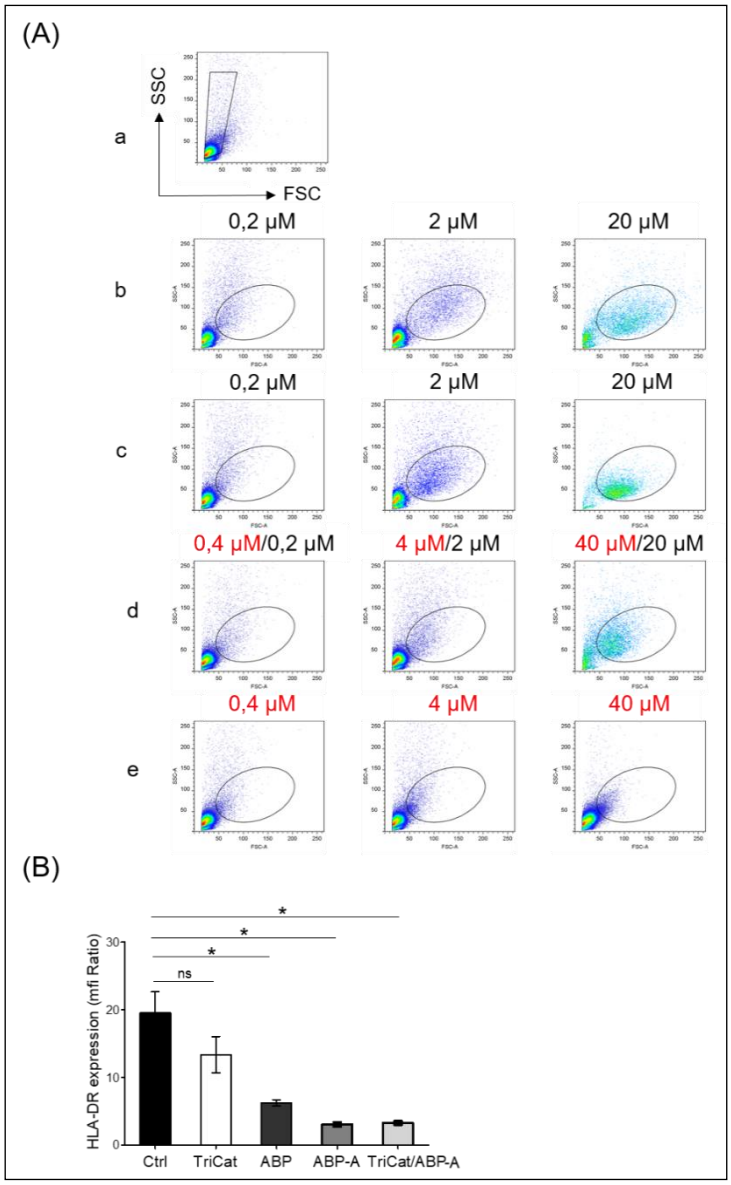


Figure 61. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des monocytes humains in vitro par cytométrie en flux. *(A) Analyse des changements morphologiques, la taille (FSC, Forward Scatter) et la granulosité (SSC, Side Scatter), des monocytes incubés pendant 5 jours en présence de H_2O (contrôle) (a), d'ABP (b), d'ABP-A (c), de la formulation TriCat/ABP-A (d) et de TriCat vides (e) à différentes concentrations (en rouge : [TriCat] ; en noir : [dendrimère]). La fenêtre polygonale en (a) correspond aux monocytes morts et mourants et l'éllipse en b, c, d et e correspond aux monocytes activés. Résultats d'1 donneur représentatif de 4. (B) Analyse de l'expression de HLA-DR à la surface des monocytes en présence de 20 µM en dendrimère. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM de 4 expériences indépendantes. Les analyses statistiques ont été effectuées par un test Mann-Whitney. *p <0,05 ; ns = non significatif.*

Les résultats de la **figure 61** montrent qu'au bout de 5 jours, lorsque les monocytes ne sont pas activés, il y a une forte mortalité. Nous avons donc répété cette expérience sur une durée

plus courte de 2 jours. Après 2 jours de culture, les monocytes (contrôle négatif) sont vivants et une augmentation de la taille ainsi que de la granulosité est visible pour les cellules incubées avec le dendrimère sous ses formes libres ainsi que sous sa forme formulée à la concentration de 20 µM (**Figure 62A**). Au niveau phénotypique (**Figure 62B**), nous avons également observé une diminution de l'expression de HLA-DR à la concentration de 20 µM avec le dendrimère formulé et non formulés par rapport au contrôle, ce qui n'est pas observée avec le TriCat seul. Ces résultats confirment que le dendrimère formulé, comme les formes libres, oriente les monocytes vers une activation anti-inflammatoire. Cependant, si on compare l'expression de HLA-DR sur les monocytes incubés avec la formulation au bout de 2 jours et au bout de 5 jours, nous remarquons qu'il y a une tendance vers une diminution plus marquée de l'expression de HLA-DR au bout de 5 jours. Cela pourrait peut-être s'expliquer par un effet retardé du dendrimère formulé dû à son encapsulation dans les vésicules. Ce résultat préliminaire suggère que le dendrimère est internalisé sous forme encapsulée par les monocytes.

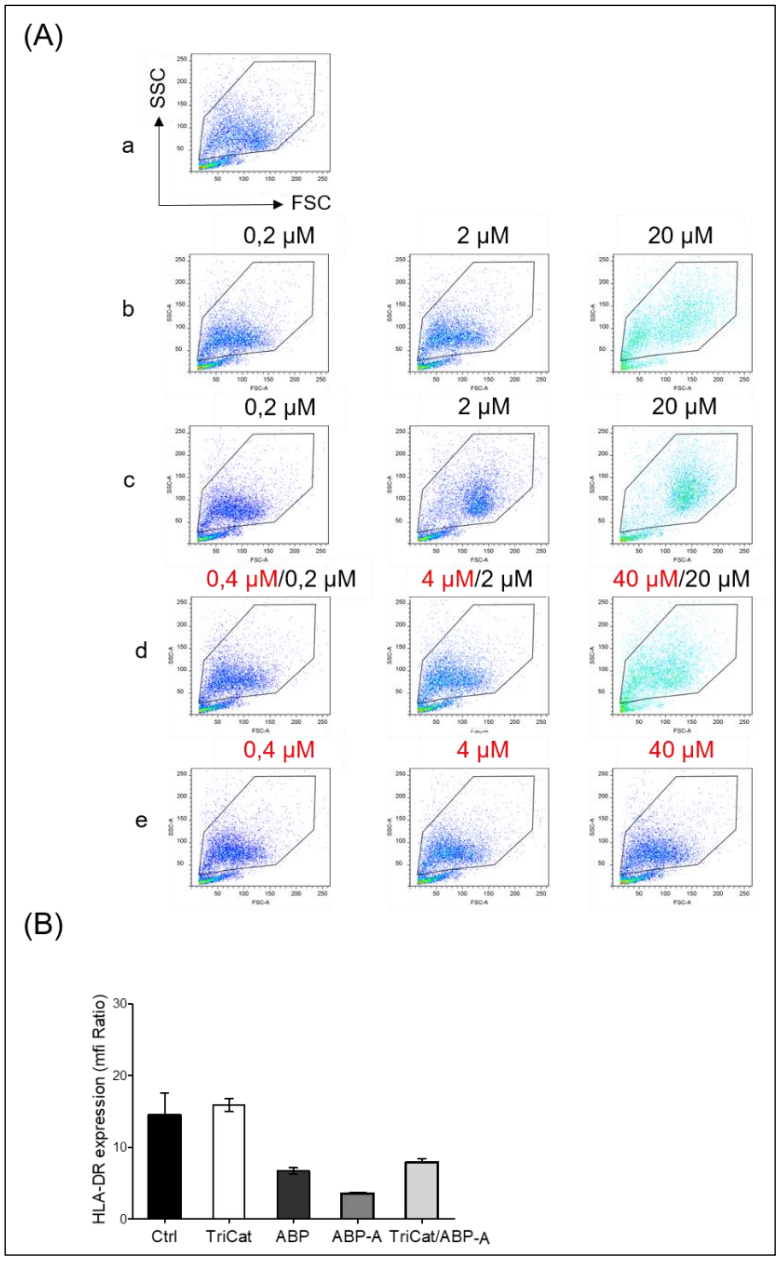


Figure 62. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire des monocytes humains in vitro par cytométrie en flux. *(A) Analyse des changements morphologiques des monocytes incubés pendant 2 jours en présence de H_2O (contrôle) (a), d'ABP (b), d'ABP-A (c), de la formulation TriCat/ABP-A (d) et de TriCat vides (e) à différentes concentrations (en rouge : [TriCat] ; en noir : [dendrimère]). La fenêtre hexagonale correspond aux monocytes. Résultats d'1 donneur représentatif de 2. (B) Analyse de l'expression du marqueur HLA-DR à la surface des monocytes à la concentration de 20 µM en dendrimère. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM de 2 expériences indépendantes.*

Discussion et conclusion

Notre objectif était d'évaluer si le dendrimère formulé est toujours capable d'induire une activité anti-inflammatoire *in vitro.* Parmi les cellules du système immunitaire, le dendrimère ABP cible principalement les monocytes/macrophages. En fonction du stimulus qu'ils reçoivent, les monocytes ont la possibilité de s'activer vers un phénotype pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire. Le dendrimère ABP, quant à lui, induit une activation anti-inflammatoire des monocytes *in vitro* [98].

Nous avons d'abord démontré que le dendrimère formulé dans les vésicules est également internalisé par les monocytes après une incubation d'1 heure à 37°C. Cela nous a permis de prouver que les vésicules n'empêchent pas le dendrimère d'être internaliser par les monocytes. Afin d'évaluer ensuite l'activité anti-inflammatoire du dendrimère formulé dans les vésicules, des monocytes humains ont été placés en culture avec le dendrimère formulé à 37°C. Après 2 ou 5 jours de culture, nous avons observé que le dendrimère formulé dans les vésicules de TriCat est toujours capable d'induire une activité anti-inflammatoire des monocytes révélés par une modification morphologique des monocytes et une diminution significative de l'expression de HLA-DR à leur surface.

En résumé, ces résultats démontrent que le dendrimère formulé dans les vésicules de TriCat est toujours capable d'induire une activité anti-inflammatoire des monocytes sans que son activité soit perturbée par les vésicules. Dans la partie suivante, nous allons évaluer l'efficacité thérapeutique de la formulation dans le modèle d'inflammation cutanée induite par l'IMQ, afin d'évaluer l'apport d'une meilleure pénétration cutanée du dendrimère sur son activité anti-inflammatoire *in vivo*.

Partie V : Preuve d'efficacité thérapeutique de la formulation dans un modèle murin de psoriasis

Dans cette dernière partie, nous avons voulu évalué l'effet anti-psoriasique de la formulation TriCat/ABP-A dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ.

Résultats

Au cours de cette étude, avant d'évaluer l'effet anti-psoriasique de la formulation dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ, nous avons d'abord mis au point au laboratoire une optimisation de ce modèle. Comme le dendrimère et l'IMQ sont appliquées tous les deux par voie cutanée, nous n'avons pas voulu que l'application de l'un affecte l'action de l'autre. Dans un premier temps, nous avons appliqué la crème d'Aldara (5% IMQ), le matin, sur le dos rasé et épilé des souris. Puis, la solution de dendrimère est appliquée pendant l'après-midi après un rinçage du dos des souris à l'eau pour éliminer les traces de la crème. Dans ces conditions, nous avons remarqué que l'inflammation induite par l'IMQ sur les souris contrôles non traitées est faible, probablement suite au rinçage du dos des souris seulement 5 heures après l'application de la crème. Dans un deuxième protocole, nous avons donc inversé les deux applications. Nous avons appliqué l'IMQ en fin d'après-midi, afin qu'il puisse être totalement absorbé durant la nuit. Le traitement (eau, ABP libre ou formulé) est appliqué le lendemain matin, après rinçage du dos des souris afin d'éliminer la crème d'Aldara résiduelle. En adoptant ce protocole, nous avons réussi à avoir un effet plus marqué de l'IMQ sur les souris contrôle non traitées.

1. Évaluation de l'efficacité de la formulation *in vivo*

1.1. Effet de la formulation TriCat/ABP-A sur le phénotype psoriasique induit par l'IMQ

Afin d'évaluer son effet dans le modèle du psoriasis induit par l'IMQ, la formulation a été administrée à la dose de 13 mg/kg/jour en dendrimère chez les souris. La dose de 13 mg/kg est conditionnée par le volume d'application du traitement sur le dos rasé de la souris (100

µL). En parallèle, les souris ont été traitées par l'eau (contrôle malade) et par le dendrimère libre aux doses de 13 mg/kg/jour et de 50 mg/kg/jour. La dose de 50 mg/kg a été rajoutée dans cette étude comme une dose de référence efficace dont l'effet thérapeutique a déjà été observé dans la première étude que nous avons publiée. L'IMQ est appliqué en fin d'après-midi et les traitements sont administrés le lendemain matin sur le site rasé de la peau du dos de souris une fois par jour pendant 7 jours consécutifs. Le protocole d'application de l'IMQ et des traitements est schématisé dans la **figure 63** ci-dessous.

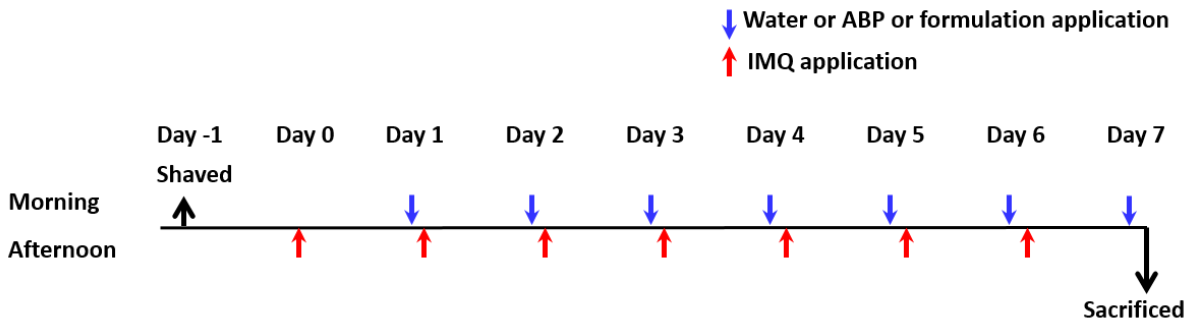


Figure 63. Protocole d'application topique (voie cutanée) des dendrimères libre et formulé dans le modèle de psoriasis induit par l'IMQ chez les souris.

Des souris traitées quotidiennement avec le xanthane et des souris non traitées n'ayant pas reçu d'application cutanée d'IMQ ont été utilisées comme contrôle des souris saines. L'évaluation clinique de la sévérité de la maladie a été basée sur l'évaluation quotidienne des variations de l'érythème, de la desquamation et de l'épaississement de la peau dans tous les groupes. Le cumul de ces trois paramètres nous a permis de calculer un score clinique global de la sévérité de la maladie, proche du score PASI utilisé chez l'homme.

Les souris traitées avec du xanthane, ainsi que les souris non traitées n'ont présenté aucun signe inflammatoire pendant les 7 jours. Ceci montre que le xanthane, contrairement à la vaseline (*cf* partie III **2.3.1**), est un excipient neutre dans la crème d'Aldara et peut être utilisé comme contrôle. Les souris traitées avec l'IMQ, quant à elles, présentent une inflammation cutanée qui évolue progressivement à partir de J1 pour atteindre un maximum à J5 (score clinique total de **9,5 ± 0,5**) et reste constant jusqu'à J7 (**Figure 64B**). En effet, l'érythème commence à apparaître à partir de J1 et continue à augmenter jusqu'à J7. Dès J2, un épaississement de la peau du dos ainsi que des squames apparaissent et évoluent

progressivement jusqu'à J7 (**Figure 64A**). Comme attendu, l'application cutanée d'ABP dans l'eau à la dose de 50 mg/kg a significativement diminué l'inflammation cutanée induite par l'IMQ à partir de J5 jusqu'à atteindre un score clinique total de **4,8 ± 0,5** à J7 (**Figure 64B**). Cette amélioration a été observée au niveau des trois paramètres cliniques (**Figure 64A**). En ce qui concerne l'effet du dendrimère ABP appliqué à la dose de 13 mg/kg, un effet plus précoce est apparu à partir de J4-J5 (effet significatif à J4-J5 par rapport au groupe IMQ). À partir de J6, le score clinique total a ré-augmenté progressivement pour atteindre un score clinique total de **6,8 ± 0,7** à J7, supérieure à celui observé avec la dose de 50 mg/kg. Malgré cette augmentation du score clinique, la différence à J6-J7 est toujours significative par rapport au groupe IMQ. Ceci montre que les deux doses d'ABP, 13 et 50 mg/kg, sont efficaces. Ce comportement différent observé entre les deux doses suggère une légère irritation cutanée de la forte dose au début puis un effet plus bénéfique de cette dernière au dernier jour (J7) où la maladie devient plus sévère et donc une quantité plus élevée du dendrimère dans la peau serait plus avantageuse. Le meilleur effet thérapeutique est observé avec la formulation TriCat/ABP-A. En effet, une amélioration remarquable de l'érythème, de la desquamation et de l'épaississement de la peau a été observée dans le groupe IMQ + TriCat/ABP-A à la dose de 13 mg/kg (**Figure 64A**). Par ailleurs, le sore clinique avait la même tendance que celle observée avec le groupe IMQ + ABP 50 mg/kg. En effet, les lésions ont significativement diminué par rapport au groupe IMQ à partir de J5 pour atteindre un score clinique total de **3 ± 0,3** à J7 (**Figure 64B**), inférieure à celui observé avec les deux doses de dendrimère. Cette différence à J7 est statistiquement significative par rapport au groupe IMQ + ABP 13 mg/kg, montrant que l'effet thérapeutique du dendrimère formulé est supérieur à celui du dendrimère libre à la dose de 13 mg/kg. Comme l'illustre la **figure 64B**, l'effet de la formulation est tardif et n'apparait qu'à partir de J5 alors que l'effet du dendrimère libre 13 mg/kg apparait à J4 (**Figure 64B**). Ceci pourrait être dû à l'effet de libération retardée du dendrimère par la formulation. Bien que les courbes des effets de la formulation sont situées sous les courbes du dendrimère libre à la dose de 50 mg/kg (J5 jusqu'à J7), il n'y a pas de différence significative entre les deux groupes de souris.

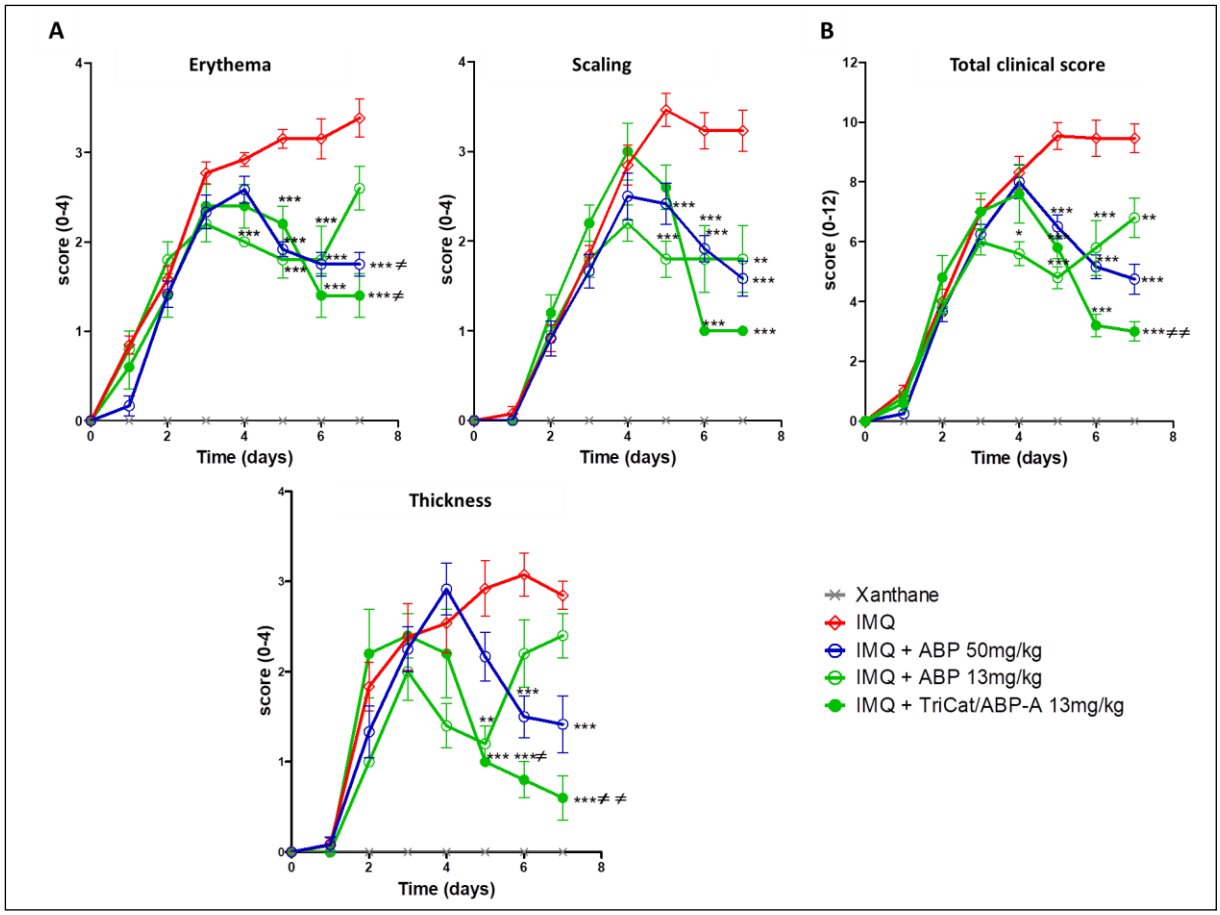


Figure 64. Les effets du dendrimère sous ses formes libre (ABP) et formulée dans les vésicules de TriCat (TriCat/ABP-A) sur le phénotype psoriasique induit par l'IMQ. *(A) Les scores cliniques de l'érythème, des squames et de l'épaisseur de la peau du dos ont été déterminés quotidiennement sur une échelle de 0 à 4. L'épaisseur de la peau du dos a été mesurée quotidiennement par un pied à coulisse. (B) Un score clinique total (érythème + squames + épaisseur) est représenté sur une échelle de 0 à 12. Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM (n=9 ; n=13 ; n=12 ; n=5 et n= 5 dans les groupes Xanthane, IMQ, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et IMQ + TriCat/ABP-A 13 mg/kg, respectivement). Les analyses statistiques ont été effectuées par un test One Way ANOVA suivi par un post-test Tukey pour comparer les groupes entre eux. *p<0,05, **p<0,01, ***p <0,001 par rapport au groupe IMQ. ‡p<0,05, ‡‡p<0,01 par rapport au groupe IMQ + ABP 13 mg/kg.*

Ces résultats sont confirmés par la simple observation visuelle du dos des souris. La **figure 65** permet de montrer les photos représentatives du dos des souris dans les différents groupes aux jours 4, 5, 6 et 7 où les différences macroscopiques entre les différents traitements apparaissent. Les observations ont été faites par rapport au groupe contrôle traité avec le xanthane. La **figure 65** montre que les lésions cutanées ont été améliorées dans les groupes IMQ + ABP 50 mg/kg et IMQ + TriCat/ABP-A à partir de J5 alors qu'elles ont commencé à ré-augmenter dans le groupe IMQ + ABP 13 mg/kg à partir de J6. Malgré cette reprise de la maladie, les lésions dans le groupe IMQ + ABP 13 mg/kg restent moins fortes que celles dans

le groupe IMQ. Afin de bien visualiser l'aspect macroscopique de la peau dans les différents groupes à J7, des agrandissements sont présentés en dernière ligne de la **figure 65**.

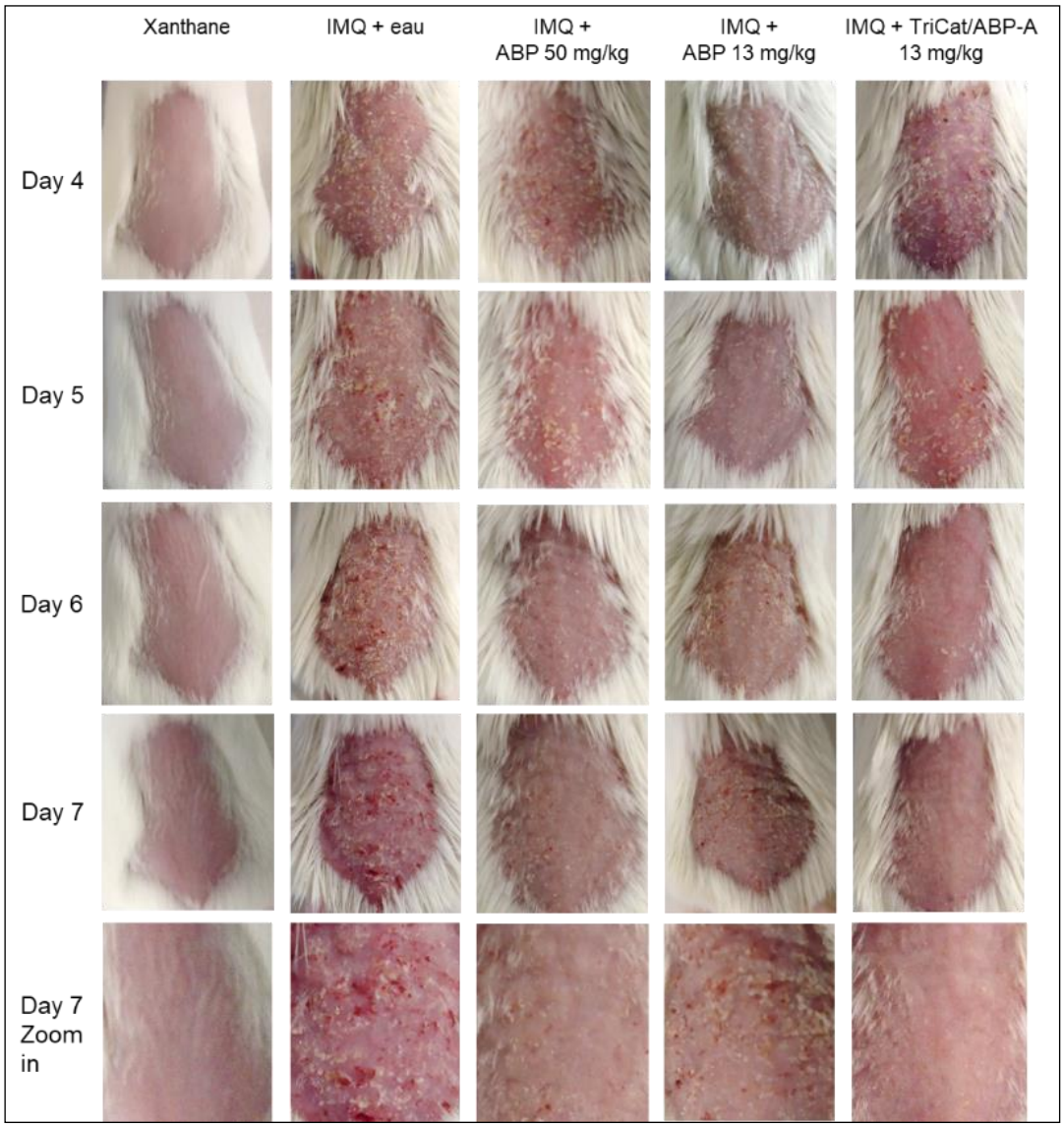


Figure 65. Observation macroscopique de la peau du dos des souris traitées quotidiennement avec le xanthane (groupe contrôle), IMQ + eau, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et IMQ + TriCat/ABP-A 13 mg/kg aux jours 4, 5, 6 et 7. *Un grossissement de la peau dorsale après 7 jours de traitement est représenté à la fin de la figure.*

1.2. Effet de la formulation TriCat/ABP-A sur les altérations histologiques du psoriasis induites par l'IMQ

Les colorations HE (Hémalun-Eosine) des coupes de peaux de différents groupes sont illustrées dans la **figure 66**. Le groupe traité avec le xanthane ou celui qui n'a reçu aucune

application cutanée montrent un épiderme et un derme murin normaux. Au contraire, les souris traitées avec l'IMQ développent une altération histologique de la peau caractérisée par un épiderme acanthosique associé à une parakératose, à une hyperkératose, à une diminution de la couche granuleuse et à une spongiose. De plus, une infiltration dense de cellules inflammatoires est observée dans le derme et des micro-abcès de Munro ont été observés dans la couche cornée. Comme l'illustre la **figure 66,** les altérations histologiques induites par l'IMQ ont été significativement atténuées dans les deux groupes traités avec l'ABP libre, avec un effet plus important de l'ABP à la plus forte dose (50 mg/kg). Comme au niveau clinique, le meilleur effet thérapeutique, au niveau histologique, a été observé dans le groupe de la formulation TriCat/ABP-A, dans lequel la structure histologique de la peau est plus proche de celle dans les groupes contrôles (Blank et xanthane).

D'une façon plus détaillée, l'administration de l'ABP à dose la plus faible de 13 mg/kg a montré une diminution significative de l'hyperkératose par rapport au groupe IMQ (**Figure 67A**)**.** En comparant l'ABP libre à celui formulé à la dose de 13 mg/kg, une différence significative au niveau de la majorité des paramètres histopathologiques a été observée en faveur du groupe IMQ + TriCat/ABP-A. De même, l'ABP 50 mg/kg réduit significativement l'acanthose, la spongiose et l'infiltrat inflammatoire par rapport à l'ABP 13 mg/kg. Comme le montre le score histologique total, qui représente la somme de tous les paramètres histopathologiques, la formulation TriCat/ABP-A (7,4 ± 0,5) et l'ABP à la dose de 50 mg/kg (9,8 ± 0,7) réduisent significativement le score histologique total par rapport à l'ABP libre à la dose de 13 mg/kg (14 ± 1,4) (**Figure 67B**). Cela confirme que l'effet du dendrimère libre est dépendant de la dose et que la formulation a permis de renforcer l'effet thérapeutique du dendrimère libre (13 mg/kg).

Ces premiers résultats mettent en avant l'efficacité de la formulation TriCat/ABP-A pour renforcer l'effet anti-psoriasique du dendrimère en améliorant sa pénétration cutanée.

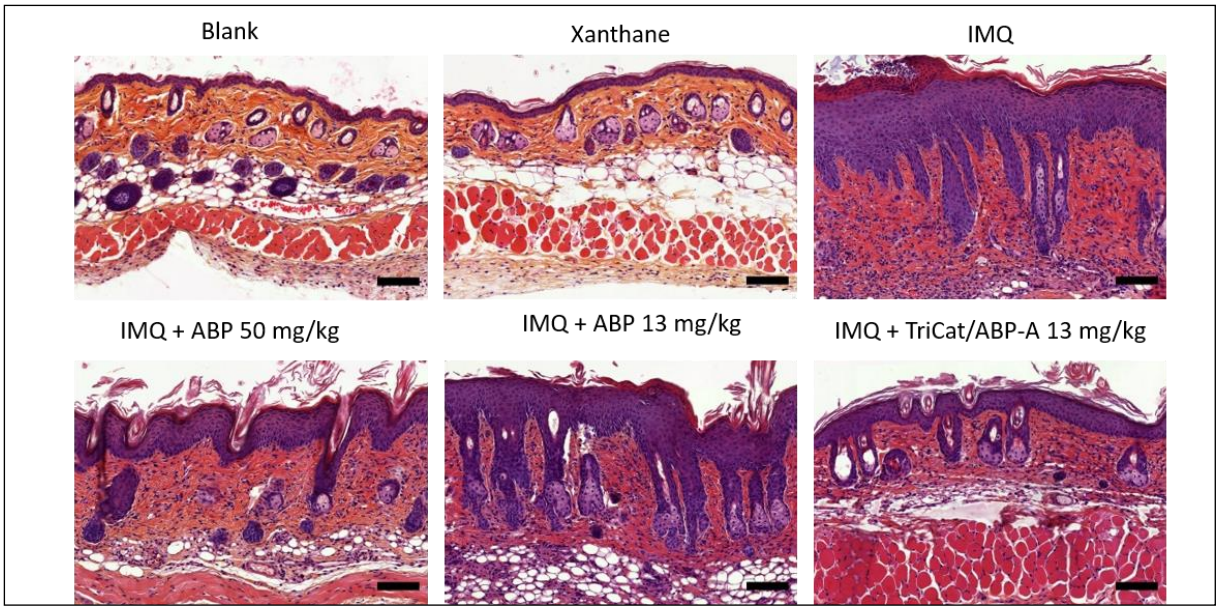


Figure 66. Observation des coupes de peau du dos des souris non traitées (blank) et traitées quotidiennement par le xanthane, IMQ, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et TriCat/ABP-A 13 mg/kg. *Coupes histologiques représentatives de la peau du dos des souris après coloration HE à J7. La barre d'échelle représente 100 µm.*

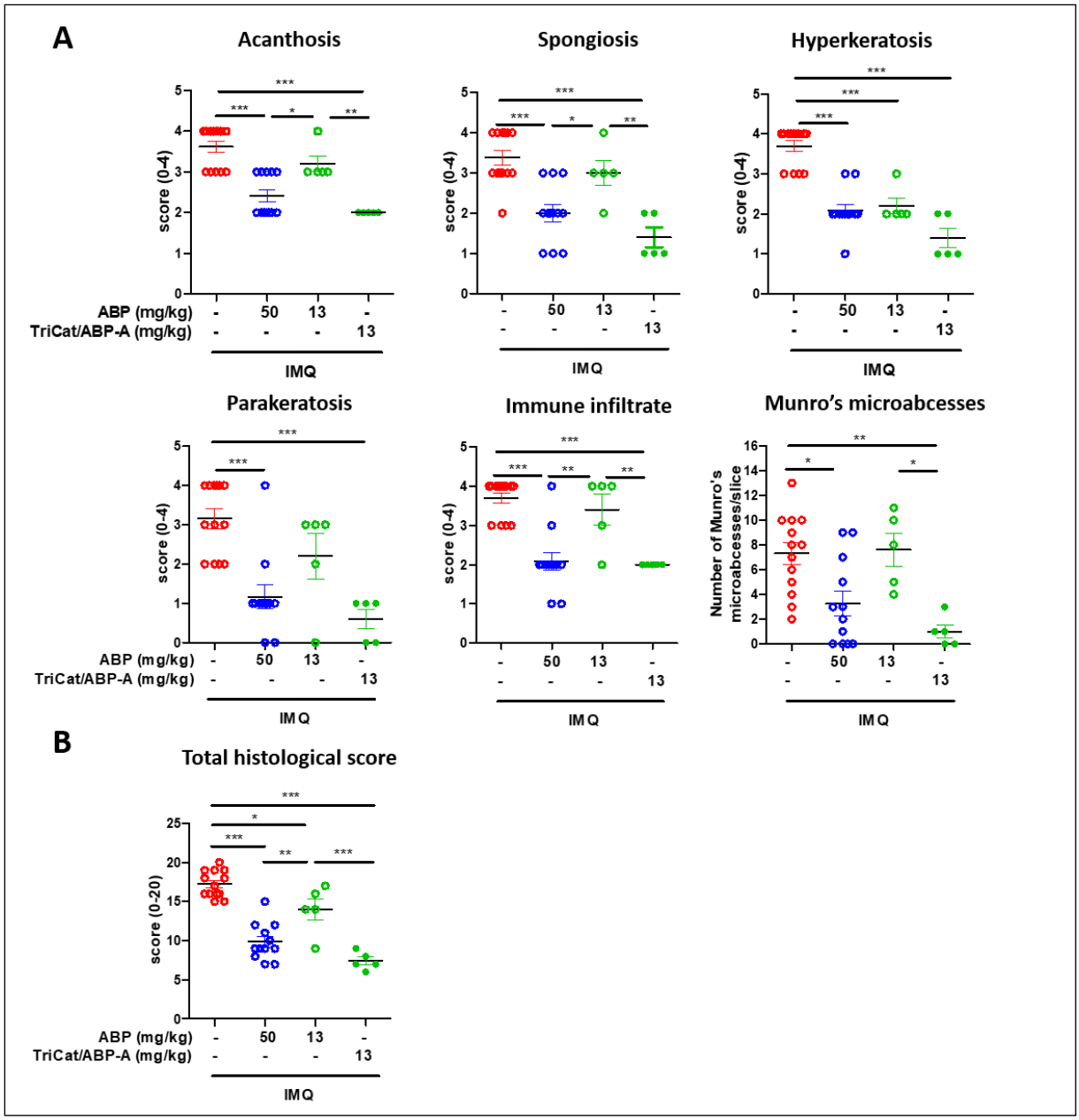


Figure 67. Évaluation du score histologique de la peau du dos des souris après 7 jours de traitement quotidien par IMQ, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et TriCat/ABP-A 13 mg/kg. *(A) Les scores de l'acanthose, de la spongiose, de l'hyperkératose, de la parakératose et de l'infiltrat immunitaire ont été déterminés sur une échelle de 0 à 4 sur les coupes histologiques colorées à l'HE à J7. Le nombre de micro-abcès de Munro a été compté sur la totalité de la coupe de peau. (B) Un score histologique total est représenté sur une échelle de 0 à 20 (somme des scores de tous les paramètres histologiques). Les résultats sont représentés par la moyenne ± SEM (n=13 ; n=12 ; n=5 et n=5 dans les groupes IMQ, IMQ + ABP 50 mg/kg, IMQ + ABP 13 mg/kg et IMQ + TriCat/ABP-A 13 mg/kg, respectivement). Les analyses statistiques des scores histologiques ont été effectuées par un test One Way ANOVA suivi par un post-test Tukey pour comparer les groupes entre eux. *p<0,05, **p<0,01, ***p <0,001.*

Discussion et conclusion

Après avoir démontré de manière concluante l'efficacité de la formulation dans l'administration cutanée d'ABP, nous avons voulu évaluer l'effet thérapeutique de la formulation TriCat/ABP-A dans le psoriasis en utilisant le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ. Depuis 2009, le modèle de psoriasis induit par l'IMQ est l'un des modèles les plus utilisé pour étudier l'efficacité de divers médicaments et formulations dans le psoriasis expérimental chez la souris par l'application cutanée répétée d'IMQ [320].

Nous avons montré l'apport des vésicules catanionique de TriCat pour renforcer l'effet anti-psoriasique d'ABP libre en améliorant la pénétration du dendrimère dans les couches profondes de la peau. Cette amélioration significative des lésions psoriasiques se manifeste à la fois aux niveaux clinique et histologique, à l'aide de la formulation TriCat/ABP-A par rapport à l'ABP libre à la même dose (13 mg/kg). L'effet de la formulation TriCat/ABP-A à la dose de 13 mg/kg est par ailleurs comparable à celui de l'ABP libre à la dose de 50 mg/kg, soit une dose 4 fois moins importante de principes actifs. Cela permet de réduire les effets secondaires qui pourraient être associés (irritation cutanée). Au dernier jour de l'étude, nous avons pu détecter que l'effet anti-inflammatoire d'ABP libre est dose-dépendante aux niveaux clinique et histologique (effet thérapeutique 50 > 13 mg/kg). Cependant, cet effet dose du dendrimère libre n'a pas été observé dans notre première étude publiée entre la dose de 50 et de 5 mg/kg. Cela pourrait être expliqué par la faible inflammation induite par l'IMQ chez les souris non traitées dans le premier protocole (utilisé dans l'étude que nous avons publiée). Il était donc difficile de détecter une différence entre les souris traitées avec les deux doses de dendrimère libre (5 et 50 mg/kg), toutes les deux étant suffisantes pour contrôler les lésions peu sévères induites par l'IMQ dans ce protocole.

Nos données *in vivo* permettent de montrer également que l'effet de la formulation est légèrement tardif par rapport au dendrimère libre ce qui suggère un effet retard de la formulation à libérer le dendrimère dans la peau. Ceci montre l'intérêt d'évaluer l'efficacité de la formulation pendant une durée plus longue. Cependant, le phénotype psoriasique induit par l'IMQ est clairement aigu, ce qui constitue une limitation à l'évaluation de l'efficacité de la formulation à plus long terme. L'évaluation de son efficacité sur un modèle chronique du psoriasis, tels que les modèles de souris transgéniques de psoriasis (*cf* chapitre 1 **partie 6**), serait donc pertinente.

Outre l’effet anti-inflammatoire du dendrimère en diminuant l’infiltration des macrophages dans la peau présentant un phénotype psoriasique, des expériences dans nos laboratoires en collaboration avec l’UDEAR (dans le cadre de l’ANR TANDANSS) sont en cours pour évaluer l’effet biologique du dendrimère libre et formulé sur les kératinocytes en culture (2D) et dans un modèle de RHE psoriasique (3D). Ceci pourrait nous aider à mieux comprendre le mécanisme d’action du dendrimère dans le traitement de psoriasis.

En conséquence, l’ensemble de ces résultats ont démontré l’efficacité thérapeutique et l’apport de la formulation TriCat/ABP-A dans l’amélioration des lésions psoriasiques induites par l’IMQ. L'utilisation d'un traitement anti-psoriasique standard (par exemple le propionate de clobétasol) est envisagée dans la suite de notre étude pour comparer l'efficacité de notre formulation.

Conclusion générale

Le psoriasis est une dermatose chronique incurable. Il se produit principalement en raison d'une dérégulation du système immunitaire conduisant à une différenciation anormale et une prolifération rapide des kératinocytes. Bien que la plupart des stratégies thérapeutiques actuelles soient efficaces, leurs effets secondaires peuvent entraîner l'arrêt du traitement, limitant ainsi leur efficacité thérapeutique. Afin d'améliorer la qualité de vie des patients, il est urgent et nécessaire de développer de nouveaux médicaments efficaces et présentant un meilleur profil de sécurité que ceux utilisés couramment en thérapie. Parmi les types de macromolécules capables de rééquilibrer le système immunitaire en contrôlant l'inflammation, les dendrimères apparaissent comme une nouvelle alternative grâce à leur caractère multivalent. Parmi ceux-ci, un dendrimère de première génération de type polyphosphorhydrazone (PPH) et à surface azabisphosphonate, nommé ABP, a montré des propriétés anti-inflammatoires *in vitro*. Grâce à ces activités anti-inflammatoires envers différentes cellules inflammatoires, le dendrimère a fait preuve d'une efficacité remarquable pour le traitement de maladies inflammatoires chroniques dans des modèles animaux. De plus, des études précliniques ont montré la sécurité du dendrimère ABP.

Dans la première partie de notre travail, nous avons donc évalué les propriétés anti-inflammatoires d'ABP dans le traitement de psoriasis. Vu que la physiopathogenèse du psoriasis est principalement localisée au niveau de la peau, nous avons évalué l'administration cutanée d'ABP dans un modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ. Nous avons d'abord montré qu'ABP diminue d'une façon significative les lésions cutanées psoriasiques induites par l'IMQ chez la souris. Cela s'est manifesté par une diminution significative des scores cliniques et histologiques psoriasiques chez les souris traitées avec l'ABP par rapport aux souris non traitées. Nous avons également démontré qu'un des mécanismes à l'origine de cet effet anti-psoriasique est la diminution significative de l'infiltration des monocytes/macrophages dans la peau. Nos résultats ont donc montré l'efficacité prometteuse du dendrimère ABP, sans aucune formulation particulière, pour le traitement de psoriasis par voie cutanée.

Cependant, le principal inconvénient associé à l'ABP administré par voie cutanée est sa faible pénétration à travers la peau en raison de son hydrosolubilité et de sa masse moléculaire élevée, limitant ainsi son efficacité thérapeutique. Par conséquent, il est nécessaire de

développer une formulation topique de dendrimère pour améliorer sa pénétration cutanée et maximiser ainsi son effet thérapeutique.

La deuxième partie de notre travail de recherche a donc consisté à encapsuler le dendrimère ABP dans un vecteur pour améliorer sa pénétration au niveau de l'épiderme viable et du derme qui représentent les sites d'action des substances médicamenteuses pour la prise en charge du psoriasis. Nous avons formulé le dendrimère ABP dans des vésicules catanioniques de TriCat, développées par notre laboratoire pour assurer une quantité suffisante du dendrimère dans la peau et qui soit capable d'induire un meilleur effet thérapeutique. Notre choix s'est porté sur ces vésicules de TriCat car elles sont formées de tensioactifs biocompatibles et se forment spontanément dans l'eau. De plus, la fluidité de leur membrane et donc leur déformabilité sont des propriétés essentielles pour une meilleure pénétration dans les couches profondes de la peau, permettant à l'actif encapsulé d'avoir un meilleur effet thérapeutique (comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, *cf* chapitre 1 **partie 7.3.3**). Nous avons mis au point une stratégie de formulation d'ABP dans les vésicules catanioniques, facile à mettre en œuvre. Cette stratégie repose sur la synthèse de la paire catanionique du TriCat en présence du précurseur acide du dendrimère, nommé ABP-A, très peu soluble dans l'eau, ce qui permet d'obtenir une efficacité d'encapsulation élevée d'environ 80%, grâce à l'insertion d'ABP-A au sein de la bicouche des vésicules. En s'insérant dans la bicouche des vésicules, l'ABP-A rend la membrane des vésicules plus fluide à la température cutanée, et ceci sans l'utilisation d'additifs.

Des études *ex vivo* ont été par la suite menées sur des explants de peaux montées en cellule de diffusion de Franz afin d'évaluer l'aptitude de la formulation TriCat/ABP-A à améliorer la pénétration cutanée du dendrimère. Nous avons montré que la formulation TriCat/ABP-A multiplie d'un facteur 2 à 3 la rétention du dendrimère dans la peau d'oreille de cochon par rapport aux formes libres du dendrimère. Ces résultats ont été validés par microscopie confocale, non seulement sur peau porcine mais également sur peau humaine, dans laquelle nous avons démontré l'aptitude de la formulation à favoriser la pénétration du dendrimère jusqu'à l'épiderme viable et le derme. Nous avons également montré que la formulation TriCat/ABP-A induit une pénétration du dendrimère d'une façon homogène par rapport aux formes libres du dendrimère dans la peau murine psoriasique. L'ensemble de ces résultats permettent de démontrer l'efficacité de la formulation dans l'administration du dendrimère

dans les couches cutanées profondes grâce à sa formulation dans des vésicules catanioniques, pour espérer libérer le dendrimère dans l'épiderme viable et le derme et y exercer son effet thérapeutique anti-inflammatoire.

Comme l'effet anti-inflammatoire du dendrimère dans la peau pourrait être dépendant des vésicules catanioniques qui le transportent, nous avons étudié l'effet anti-inflammatoire du dendrimère formulé *in vitro* sur monocytes humains. Nous avons ainsi montré que le dendrimère formulé conserve ses propriétés anti-inflammatoires sans qu'elles soient perturbées par les vésicules.

Enfin, pour évaluer l'apport de la formulation TriCat/ABP-A dans la prise en charge du psoriasis, notre formulation a fait l'objet d'une étude *in vivo* sur le modèle murin de psoriasis induit par l'IMQ. Les résultats obtenus mettent en évidence une activité anti-psoriasique améliorée lorsque le dendrimère est formulé dans les vésicules de TriCat, notamment au niveau histologique. La formulation permet également de diminuer les doses de dendrimère utilisées. Par ailleurs, l'effet de la formulation *in vivo* est légèrement plus tardif que celui du dendrimère libre ce qui pourrait montrer l'effet retard de la formulation à libérer le dendrimère dans la peau.

En conclusion, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de mettre au point une nouvelle approche thérapeutique pour la prise en charge du psoriasis par voie cutanée basée sur la formulation du dendrimère ABP dans des vésicules catanioniques.

Des études supplémentaires doivent être envisagées pour une meilleure compréhension du mécanisme d'action du dendrimère contre le psoriasis. En effet, la diminution de l'acanthose, de la parakératose et de l'hyperkératose observée dans les groupes traités avec le dendrimère formulé laisse penser que le dendrimère cible également les kératinocytes. Afin d'évaluer donc l'effet du dendrimère sur la prolifération et la différenciation des kératinocytes dans le modèle murin de psoriasis, des expériences complémentaires de marquage seraient intéressantes à réaliser sur les coupes de peaux de souris pour évaluer l'expression des marqueurs de prolifération des kératinocytes tels que ki-67 et des marqueurs de différenciation des kératinocytes tels que la filaggrine, la loricrine et l'involucrine.

Pour aller vers une validation plus proche d'une application réelle, il serait également pertinent d'évaluer l'efficacité de la formulation TriCat/ABP-A sur un modèle humain de peau psoriasique, tels que InflammaSkin® [321].

Comme nous avons vu dans la partie bibliographique, les dermocorticoïdes constituent le traitement topique de référence contre le psoriasis. Cependant, leurs effets secondaires, qui sont dose-dépendants, notamment l'atrophie cutanée et leur effet immunosuppresseur, limitent leur utilisation à long terme chez les patients psoriasiques. La combinaison de médicaments avec différents modes d'action est une stratégie thérapeutique largement utilisée car elle peut traiter la maladie plus efficacement et réduire les effets secondaires. Richard *et al.* ont récemment montré l'efficacité des vésicules catanioniques de TriCat à améliorer la pénétration cutanée d'un dermocorticoïde présentant une activité très forte, le dipropionate de bétaméthasone (BDP). Pour cela, nous pourrons donc envisager de mettre au point une formulation simultanée de la BDP et du dendrimère dans des vésicules catanioniques de TriCat. Cela pourrait, d'une part, aboutir à une formulation peut-être plus efficace renfermant deux actifs ayant des propriétés anti-inflammatoires, et d'autre part, permettre de réduire la dose quotidienne maximale de dermocorticoïdes qui pourrait donc être bien tolérée chez les patients.

Afin de confirmer le mécanisme par lequel les vésicules catanioniques favorisent la pénétration du dendrimère dans la peau, un marquage fluorescent des vésicules pourrait être réalisé pour suivre leur chemin dans la peau [322]. Dans notre laboratoire, des vésicules catanioniques de TriCat dont la bicouche a été marquée avec une sonde fluorescente catanionique (gamme d'émission dans le vert) ont été développées [283,286]. Nous avons donc réalisé des premiers essais avec la formulation du dendrimère dans les vésicules catanioniques marquées. Cependant, l'auto-fluorescence de la peau dans le vert provoquée par la présence de fluorophores naturelles dans la peau tels que les flavoprotéines, la mélanine, et la kératine [240,323] nous a empêché de suivre le chemin des vésicules marquées dans la peau. Donc, le marquage des vésicules catanioniques par une sonde fluorescente émettant dans une autre gamme de longueurs d'onde permettrait de surmonter ce problème et d'élucider le mécanisme par lequel les vésicules améliorent la pénétration cutanée du dendrimère.

Enfin, pour une meilleure application de la formulation sur la peau, une forme galénique finale doit être étudiée. Parmi les formes topiques anti-psoriasiques, on retrouve : les

pommades (tels que Diprolene® : BDP), les crèmes (tels que Dermoval® : propionate de clobétasol) et les gels (tels que Xamiol® : calcipotriol + BDP). L'incorporation de notre formulation dans ces formes galéniques doit être suivie par une étude de compatibilité entre les vésicules catanioniques et les autres ingrédients de ce système final. En effet, il sera important de vérifier que les vésicules catanioniques sont toujours présentes (stables) et que leurs caractéristiques physicochimiques ne sont pas altérées. Enfin, le pouvoir de pénétration cutanée de la forme galénique finale devra être étudié *in vitro* et *ex vivo* pour évaluer sa capacité à libérer les vésicules et le dendrimère.

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes

1. Formulation du dendrimère pour améliorer sa pénétration cutanée

1.1. Structures chimiques des dendrimères et de leurs analogues fluorescents

Les dendrimères ABP et ABP-A [124], et leurs analogues fluorescents, ABP-NIR et ABP-A-NIR, respectivement, sont synthétisés au LCC. Les structures chimiques des dendrimères et de leurs analogues fluorescents sont détaillées dans les **figures 68 et 69**, respectivement**.**

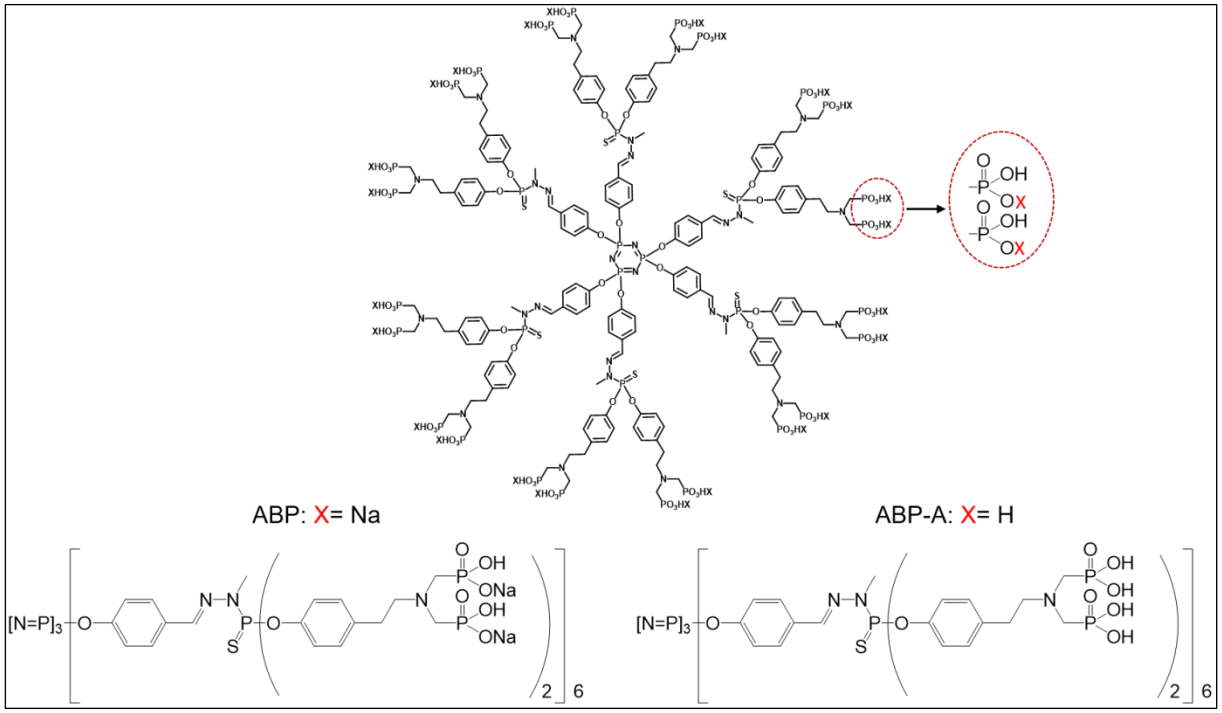


Figure 68. Structures chimiques du dendrimère sous ses formes neutre (ABP : X=Na) et acide (ABP-A : X=H).

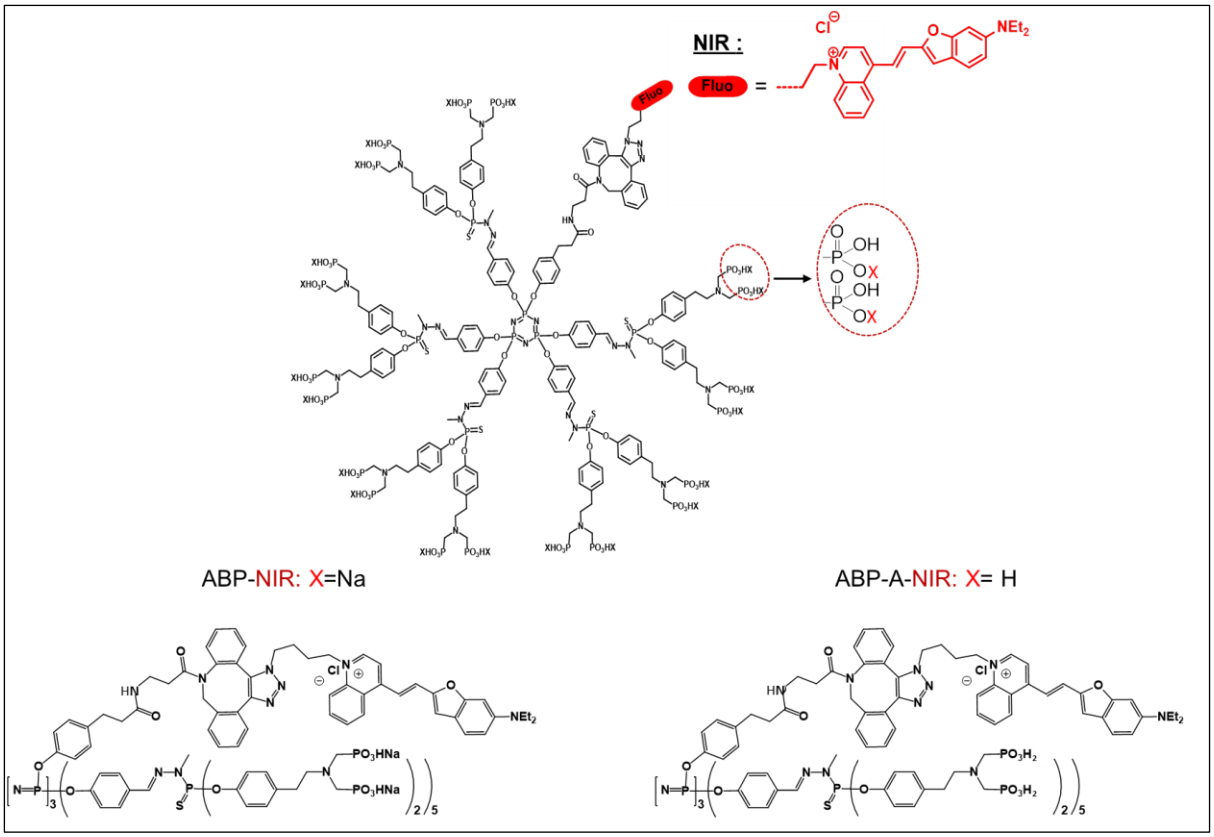


Figure 69. Structures chimiques de l'analogue fluorescent d'ABP (ABP-NIR) et de l'analogue fluorescent d'ABP-A (ABP-A-NIR). NIR: Near Infra-Red.

1.2. Préparation des solutions de dendrimères

Dans toutes les expériences, les formes libres neutres du dendrimère (ABP / ABP-NIR) sont mis en suspension à 0,5 mM dans de l'eau milli-Q (filtrée à 0,2 µm par filtre Minisart Acétate de cellulose, Sartorius) avant utilisation. Les formes acides du dendrimère (ABP-A / ABP-A-NIR) étant très peu solubles dans l'eau, elles sont préparées dans de l'eau ultrapure (eau Milli-Q) à la concentration de 0,5 mM et soniquées dans les mêmes conditions que les vésicules (conditions de sonication *cf* partie expérimentale 1.3.1).

1.3. Formulations des dendrimères dans les vésicules catanioniques de TriCat

1.3.1. Mise au point de la stratégie de formulation d'ABP

Les deux précurseurs amphiphiles de TriCat, le *N*-dodécylamino-1-déoxylactitol (désigné par L-Hyd12) et le bis-α-(hydroxydodécyl)phosphinique (désigné par acide phosphinique) (**Figure 70**), ont été préalablement synthétisés dans notre laboratoire selon les procédures standard rapportées dans la littérature [268,324].

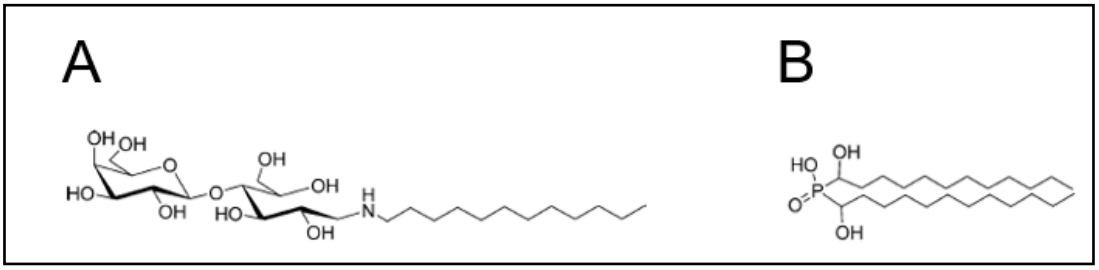


Figure 70. Structure chimique du L-Hyd12 (A) et l'acide phosphinique (B).

L'assemblage catanionique TriCat a été formé par réaction acido-basique spontanée entre le L-Hyd12 et l'acide phosphinique en quantités équimolaires dans de l'eau ultrapure, sous agitation à 25°C jusqu'à la stabilisation de pH (environ 7). Ensuite, l'échantillon est lyophilisé pour obtenir la poudre de TriCat [269,287]. Le lot de TriCat utilisé dans ce travail a été synthétisé par C. Richard lors de sa thèse [289].

Afin de mettre au point une stratégie optimale de la formulation de l'ABP dans les vésicules catanioniques, plusieurs protocoles sont envisagés.

Méthode A

Des différents ratios molaires de deux amphiphiles, L-Hyd12 et ABP-A, ont été testés : 1/1 (0,1 mM/ 0,1 mM) ; 12/1 (1,2 mM/0,1 mM) ; 24/1 (2,4 mM/0,1 mM) et 48/1 (4,8 mM/ 0,1 mM). Le L-Hyd12 et l'ABP-A sont mis dans les quantités désirées dans 2 mL d'eau ultrapure (eau Milli-Q). Le mélange a été vortexé et soniqué dans les conditions décrites ci-après (dans la méthode B).

Méthode B

La méthode B consiste à disperser le TriCat, préalablement formé, à différentes concentrations, 0,1 mM (m = 0,19 mg) ; 0,25 mM (m = 0,47 mg) ; 0,5 mM (m = 0,95 mg) ; ou 1 mM (m = 1,89 mg), dans une solution de 2 mL d'ABP à 2 mM dans l'eau ultrapure. Le mélange est vortexé vigoureusement. La solution est ensuite soniquée par une sonde à ultrasons en titane de diamètre 1 cm (Vibra Cell, Bioblock Scientific®), durant 15 minutes dans un bain d'eau afin de contrôler la température finale de la solution à 45°C et limiter la dégradation du dendrimère (thermosensible), à puissance 3, avec 30% de cycle actif.

Méthode C

La méthode C consiste à former la paire catanionique de TriCat en présence d'ABP. Le L-Hyd12, l'acide phosphinique et le dendrimère ABP sont mélangés avec deux ratios molaires : 1/1/2 (1 mM/1 mM /2 mM) et 1/1/0,5 (1 mM/1 mM /0,5 mM). Ces trois réactifs sont mis dans les quantités désirées dans 2 mL d'eau ultrapure (eau Milli-Q) et agités d'une façon vigoureuse au vortex, suivie du protocole de sonication décrit dans la méthode B afin d'accélérer leur association.

Méthode D

La méthode D consiste à former la paire catanionique en présence du précurseur acide d'ABP, ABP-A. Le mélange de L-Hyd12 (m = 1,02 mg), de l'acide phosphinique (m = 0,87 mg) et de l'ABP-A (m = 5,29 mg) est réalisé dans 2 mL d'eau ultrapure (eau Milli-Q) avec un ratio molaire de 1/1/0,5 (1 mM/1 mM /0,5 mM). Le mélange est ensuite vortexé vigoureusement pendant 5 minutes, puis soniqué dans les conditions décrites précédemment.

1.3.2. Caractérisation de la formulation TriCat/ABP-A

1.3.2.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La taille des vésicules et leur distribution ont été déterminées par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Dynamic Light Scattering). La DLS permet de mesurer le diamètre hydrodynamique moyen des particules dans un solvant de viscosité donnée en fonction de leur coefficient de diffusion. Plus précisément, la DLS mesure le mouvement brownien des particules et le relie à la taille des particules en analysant les fluctuations d'intensité de la

lumière diffusée à un angle spécifique. La relation entre la taille d'une particule et sa vitesse due au mouvement brownien est inversement proportionnelle (les grosses particules se déplacent lentement, tandis que les particules plus petites se déplacent rapidement). La distribution de taille obtenue par DLS est une distribution en intensité qui peut être ensuite convertie en une distribution en nombre (en fixant de façon arbitraire l'indice de réfraction des vésicules à 1,35), ceci à condition de travailler avec des particules sphériques. Comme il s'agit d'une distribution en taille, la largeur de distribution sert à établir l'indice de polydispersité (PDI).

Les solutions de TriCat/ABP-A sont stockées à +4°C dans des cuves de DLS. Les distributions en tailles et les PDI des vésicules catanioniques ont été déterminés et suivie dans le temps à l'aide d'un appareil (Malvern Instruments, Nano ZS, U.K.) équipé d'un laser He-Ne et d'un détecteur qui collecte la lumière diffusée à un angle de 173°. Les mesures ont été réalisées 4 fois à 25,0°C ±0,1°C sur les échantillons filtrés à 1,2 µm (Minisart® NML, Sartorius) afin d'éliminer les poussières qui peuvent altérer le signal. La taille de chaque échantillon est calculée sur la moyenne des 4 mesures.

Les mesures ont été également faites sur des échantillons ajustés au pH de la peau (pH 5) par une solution de NaOH (0,1 M) ou dilués au 1/5ème dans de l'eau milli-Q afin d'évaluer la stabilité des vésicules au pH cutané et à la dilution dans l'eau, respectivement.

Afin d'évaluer la stabilité de la formulation à la congélation/ décongélation, des aliquots de la formulation TriCat/ABP-A ont été congelés à -20°C. Après un temps t (jours), la solution est décongelée puis la taille est mesurée en DLS à 25°C.

1.3.2.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La MEB nous a permis d'observer la taille et la morphologie des vésicules de TriCat/ABP-A par balayage de la surface de l'échantillon par un faisceau d'électrons. En effet, un faisceau d'électrons est focalisé sur l'échantillon qui à son tour réémet d'autres électrons. L'analyse de ces électrons secondaires permet de déduire la topographie de l'échantillon.

Les vésicules de TriCat/ABP-A sont préparées selon le protocole décrit précédemment (méthode D). L'appareil utilisé est un microscope électronique à balayage (ESEM Quanta 250 FEG; FEI). Les échantillons sont déposés sur le porte échantillon puis solidifié dans du diazote pâteux (-210°C). Ils sont ensuite fracturés dans une chambre à -140 °C pour visualiser le cœur

de l'échantillon où se trouvent les objets. Une sublimation à -95°C est ensuite réalisée pendant 5 minutes pour éliminer le givre. L'échantillon est ensuite rendu conducteur en appliquant une fine couche de platine à l'aide d'un métalliseur (conditions de métallisation). Il est ensuite transféré dans la chambre cryogénique de MEB, maintenue à -140°C, pour observation.

1.3.2.3. Zêtamétrie

Le potentiel zêta représente la charge électrique qu'une particule acquiert grâce à la double couche d'ions qui l'entourent quand elle est en solution. En effet, lorsqu'une particule est en mouvement en solution, elle s'entoure d'ions organisés en double couche électrique, une partie de ces ions est fortement liée à la particule formant la couche dite dense et l'autre partie des ions est moins fortement rattaché formant la couche dite diffuse. Le « plan de cisaillement » délimite ces deux couches. Le potentiel zêta représente donc la charge d'une particule au niveau du plan de cisaillement.

Le potentiel Zêta des vésicules de TriCat/ABP-A (la moyenne des 4 mesures) est déterminé à l'aide de l'appareil Malvern Instruments Nano ZS à 25°C ± 0,1°C dans des cellules spécifiques comprenant deux électrodes (DTS 1070, Malvern). Lorsqu'un champ électrique est appliqué, les particules chargées vont alors migrer vers l'électrode de charge opposée. La mesure de la vitesse des particules permet de calculer leur mobilité électrophorétique et, en utilisant le modèle de Smoluchowski, le potentiel zêta exprimé en mV.

1.3.2.4. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Un matériau peut subir un changement d'état physique tel qu'une fusion ou une transition d'une phase à une autre, lorsqu'il est soumis à une augmentation de température. Dans le processus de changement d'état physique, la chaleur est soit absorbée (réaction endothermique), soit libérée (réaction exothermique).

La calorimétrie différentielle à balayage (DSC, Differential Scanning Calorimetry) est un outil largement utilisé qui permet de mesurer les paramètres thermodynamiques de la transition de phase des bicouches lipidiques. Ces paramètres sont la température de transition de phase (T_{onset} et T_{peak}) et le flux de chaleur absorbé au cours de la transition (ΔH).

Afin de visualiser correctement la transition de phase de la bicouche de TriCat, les échantillons de DSC sont préparés à 10 mM en TriCat (concentration saturante) selon le protocole mis au point au laboratoire. Le L-Hyd12 et l'acide phosphinique sont donc dispersés à une concentration de 10 mM et l'ABP-A est rajouté à différentes concentrations, variant de 0,05 mM à 0,8 mM (méthode D). Dû à l'excès de TriCat utilisé, le mélange est mis sous agitation à 300 tr/minute pendant 2 jours pour l'homogénéisation du mélange. Les suspensions (100 µL) ont ensuite été soniquées dans un bain d'eau (sonde placée dans le bain) pendant 30 min selon le protocole mise au point au laboratoire (à puissance 4, avec un taux de cycles actifs de 40 %) puis placés dans des creusets scellés de 120 µL à moyenne pression (20 bar). Un creuset à moyenne pression rempli d'eau milli-Q est utilisé comme référence.

Les mesures de DSC sont réalisées à l'aide d'un appareil de DSC (Mettler Toledo) équipé d'un capteur MultiSTAR® FRS5. La température de transition et le flux de chaleur sont mesurés après 4 cycles de température entre 5 et 60°C avec une vitesse de balayage de 2°C/minute. À partir du 2ème cycle, les thermogrammes obtenus sont identiques et reproductibles.

1.4. Caractérisations physico-chimiques de la formulation TriCat/ABP-A-NIR

1.4.1. Spectre d'absorbance et d'émission d'ABP-NIR

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence d'ABP-NIR dans l'eau sont présentés dans la **figure 71**. Le spectre d'absorbance est acquis sur un spectrophotomètre UV-visible à barrette de diodes Analytik Jena Specord 600. Le spectre d'émission est mesuré sur un spectromètre de fluorescence (Fluorolog 3-2 iHR 320, Horiba) à 25°C.

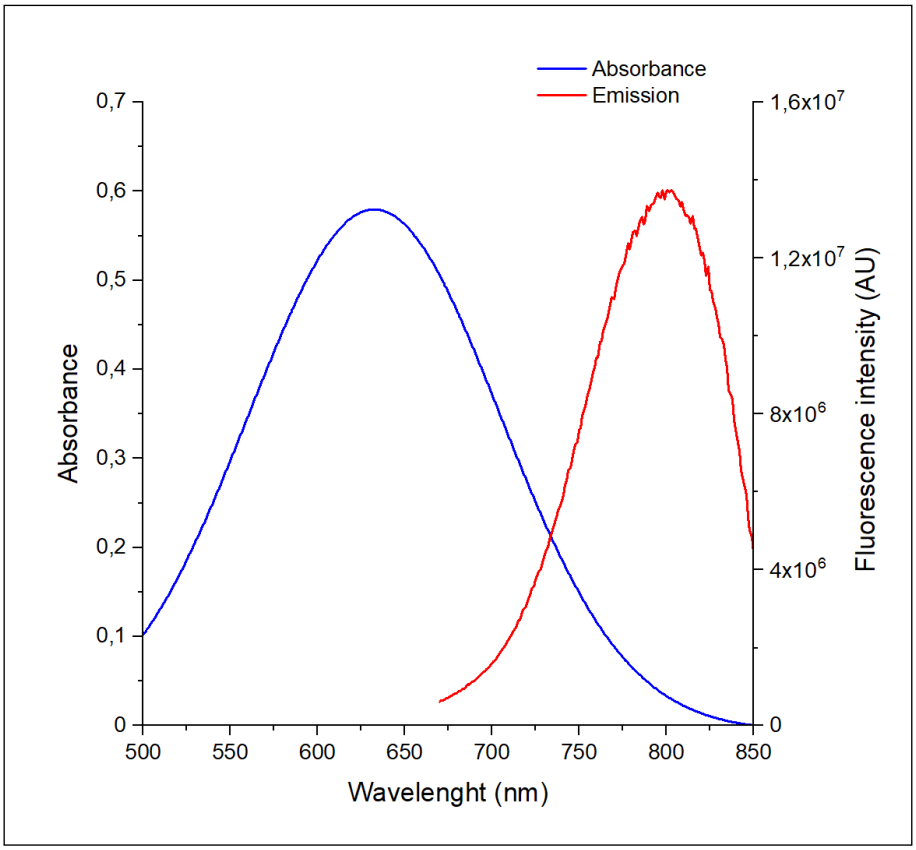


Figure 71. Spectre d'absorbance (en bleu) et d'émission de fluorescence (en rouge) d'ABP-NIR dans l'eau. (λex=632 nm, λem=800 nm).

L'analogue fluorescent d'ABP-A, désigné par ABP-A-NIR, est très peu soluble dans l'eau. Son intensité d'émission dans une solution aqueuse est faible par rapport à celle du dendrimère sous forme neutre (ABP-NIR) et son maximum d'émission est décalé de 800 à 740 nm (**Figure 72**). Lorsque qu'une solution d'ABP-A-NIR est diluée ou préparée dans une solution tampon phosphate (PBS pH=7,45) (Gibco Life Technologies), le dendrimère passe sous sa forme neutre (ABP-NIR), très soluble dans le PBS, et émet donc à 800 nm (**Figure 72**).

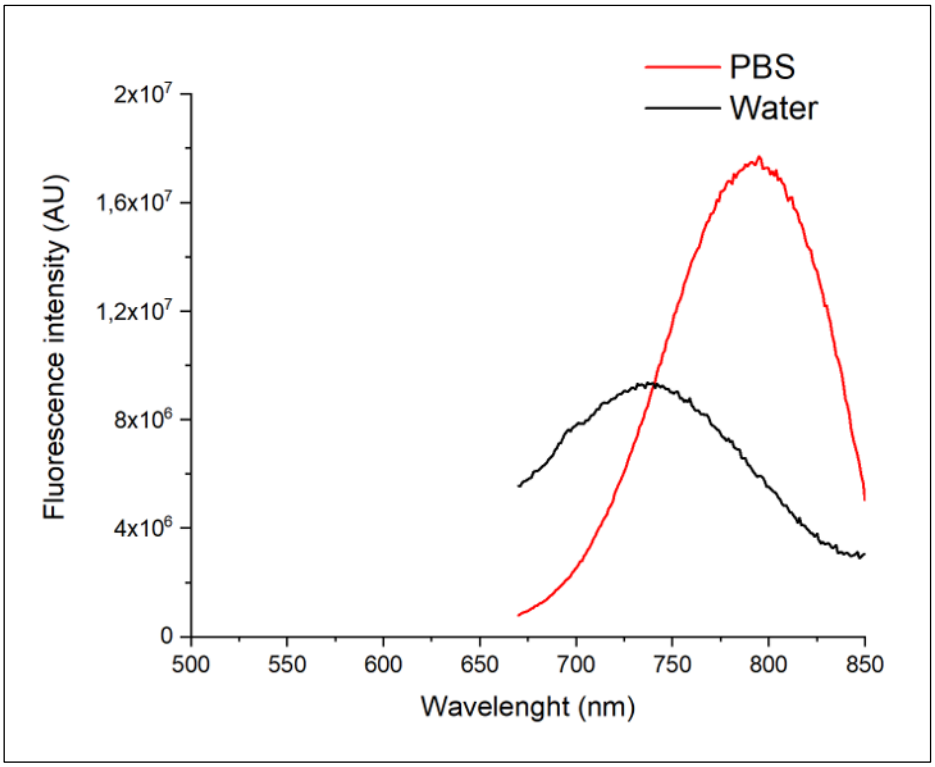


Figure 72. Spectre d'émission de fluorescence d'ABP-A-NIR dans l'eau (pH=2,8) (en noir, λem=740 nm) et dans de PBS (pH=6,8) (en rouge, λem=800 nm) à la même concentration de 0,1 mM (λex=632 nm).

1.4.2. Formulation des vésicules de TriCat/ABP-A-NIR

L'ABP-A-NIR est encapsulée dans les vésicules de TriCat selon le protocole précédemment décrit (méthode D). Le diamètre hydrodynamique moyen et l'indice de polydispersité ont été déterminés et suivis dans le temps par DLS à 25°C après une dilution au 1/5ème dans l'eau. Des aliquots de la formulation TriCat/ABP-A-NIR ont été congelés à -20°C afin d'évaluer leur stabilité à la congélation/décongélation par la mesure de la taille en DLS à 25°C.

1.4.3. Fluorescence de l'ABP-A-NIR libre et formulé dans les vésicules de TriCat

Les spectres d'émission de fluorescence de l'ABP-A-NIR libre (0,5 mM) et de l'ABP-A-NIR formulé dans les vésicules de TriCat (0,5 mM) sont acquis entre 670 et 850 nm, avec une longueur d'onde d'excitation de 632 nm.

1.4.4. Détermination de l'efficacité d'encapsulation

Afin d'évaluer l'efficacité d'encapsulation d'ABP-A dans les vésicules de TriCat/ABP-A, une analyse spectrofluorimétrique a été mise au point en utilisant l'analogue fluorescent d'ABP-A, l'ABP-A-NIR. La quantité totale d'ABP-A-NIR (encapsulée ou non) a été déterminée par mesure de l'intensité de fluorescence (IF) d'un échantillon pour lequel les structures vésiculaires ont été cassées par addition de méthanol dans la solution (1 mL de méthanol pour 20 µL de solution vésiculaire). En parallèle, l'ABP-A-NIR non encapsulé a été séparé des vésicules par une filtration à 1,2 µm. Après dilution du filtrat dans du méthanol (1ml méthanol pour 20 µL de filtrat), la mesure de l'intensité de fluorescence (IF) a permis de quantifier l'ABP-NIR encapsulé.

L'efficacité d'encapsulation (EE) est déterminée par :

$$EE\ (\%) = \frac{\text{IF (ABPNIR encapsulée)}}{\text{IF (ABPNIR totale)}}\ x\ 100$$

Afin de valider la technique de filtration, une solution contrôle d'ABP-A-NIR libre sans TriCat a été filtrée et a montré que la majorité du dendrimère a été éliminée par cette technique, qui a été par la suite prise en compte dans le calcul du % d'encapsulation final.

2. Étude de la pénétration cutanée de la formulation *ex vivo*

2.1. Quantification de la rétention cutanée *ex vivo*

2.1.1. Étalonnage spectrofluorimétrique de l'ABP-NIR

Pour la quantification de l'ABP-NIR à travers la peau, une gamme d'étalonnage a été effectuée dans le milieu de diffusion (**Figure 73**). L'ABP-NIR étant très soluble dans du PBS, ce dernier est choisi comme milieu de diffusion.

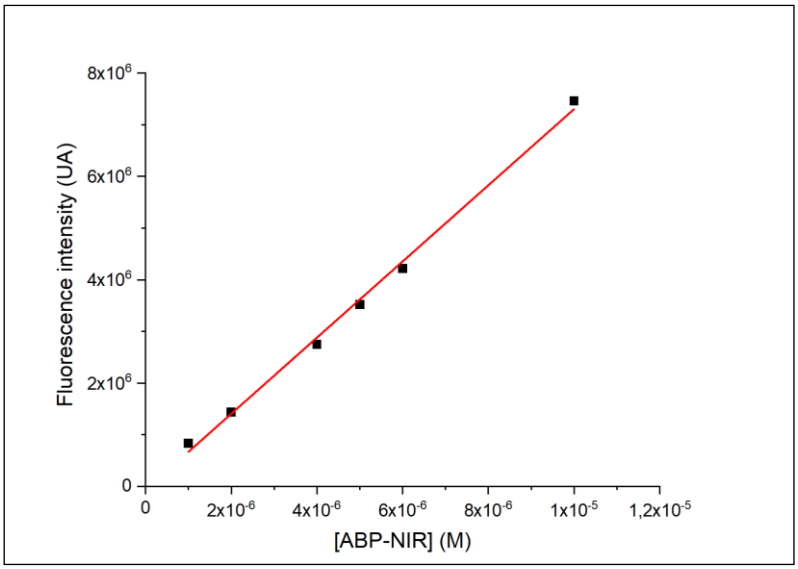


Figure 73. Droite d'étalonnage reliant l'intensité de fluorescence à la concentration en ABP-NIR dans du PBS (λex=632 nm).

2.1.2. Quantification de la rétention cutanée de l'ABP-NIR sur peau d'oreille de cochons

La cellule de diffusion de Franz (PermeGear, Hellertown, PA, USA), présentant une surface de diffusion de 1,77 cm^2, est utilisée pour étudier la pénétration cutanée *ex vivo* de la formulation au cours du temps. Ces expériences ont été faites sur les peaux d'oreilles de cochons obtenues aux abattoirs (Arcadie Sud-Ouest, Montauban). Après séparation de la peau du cartilage, la peau est bien nettoyée avec de l'eau, dégraissée (élimination du tissu sous-cutanée), puis coupée en morceaux de carré d'environ 2,5 cm. Les poils sont ensuite coupés. Ces patchs de peau sont congelés à -80˚C pour une utilisation subséquente.

Lors de l'expérience, les peaux sont décongelées à température ambiante et placées sur les cellules de Franz (**Figure 74**).

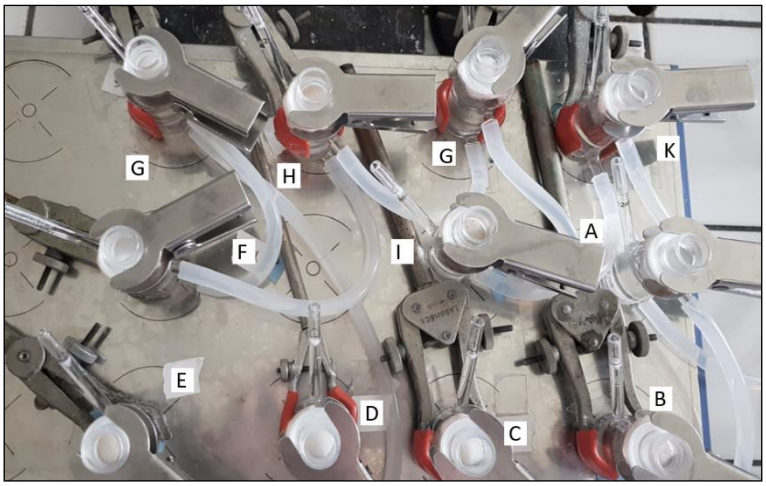


Figure 74. Étude de la pénétration cutanée sur des explants de peaux d'oreilles de cochons placés en cellule de Franz.

Les dendrimères sous forme libre et sous forme formulée sont utilisés pour les études de pénétration cutanée *ex vivo*. Des solutions de l'ABP-NIR libre, de l'ABP-A-NIR libre et de l'ABP-A-NIR formulé dans les vésicules de TriCat sont préparées à la concentration de 0,5 mM en dendrimère et sont déposées (300 µL) sur la surface de la peau dans le compartiment donneur. La peau traitée avec du PBS est utilisée comme un blanc pour évaluer l'auto-fluorescence de la peau. Le compartiment récepteur en contact avec la surface interne de la peau est rempli par 12 mL de PBS (pH=7,45), thermostaté à 37°C ± 1 ° C par la circulation d'un flux d'eau chaude pour maintenir la température de la peau à 35 ± 1°C (mesure avec un thermomètre infrarouge). Le récepteur est maintenu sous agitation constante 300 tr/minute pour assurer un renouvellement constant du volume, ce qui se rapproche des conditions physiologiques. La surface externe de la cellule est couverte avec du parafilm pour éviter l'évaporation et les variations du volume. L'ensemble du montage est placé sous une cage de polystyrène pour maintenir la température constante à la surface de la peau.

Après 24 h, la peau est délicatement rincée au PBS au moyen d'une pissette afin d'éliminer le reste du dépôt et séchée délicatement avec du papier absorbant. La zone de traitement est ensuite découpée en petits morceaux et placée dans un pilulier avec 3 mL de PBS et homogénéisée à l'aide d'un disperseur (Ultra-Turrax Ika®- Werke, T 25 Basic) durant 5 minutes à 21500 rpm. La dispersion est ensuite filtrée à 0,45 µm (Minisart® NML, Sartorius) puis analysée par spectrofluorimétrie pour quantifier l'ABP-NIR.

2.1.3. Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Les données de la **figure 54** ont été représentées par la moyenne ± SEM (standard error mean). Après évaluation de la normalité des données par un test Shapiro-Wilk, un test One Way ANOVA suivi par un post-test Tukey ont été effectués pour comparer les groupes entre eux.

2.2. Observation de la profondeur de pénétration cutanée par microscopie confocale sur différents modèles de peaux

2.2.1. Modèles de peaux saines

La microscopie confocale est choisie pour évaluer la profondeur de pénétration du dendrimère libre et encapsulé dans les vésicules de TriCat dans les différentes couches de la peau (*stratum corneum*, épiderme viable et le derme). La première étape est la diffusion des solutions sur cellule de Franz, selon le protocole décrit précédemment (*cf* partie expérimentale **2.1.2**).

En plus de la peau d'oreille de cochon, la répartition du dendrimère au sein de la peau a également été visualisée sur des explants de peau humaine. La biopsie de peau est issue des chirurgies plastiques abdominales obtenues de la société française Genoskin®. Les peaux sont ensuite dégraissées, coupées en morceaux de carré d'environ 2,5 cm puis congelés à -80 °C.

Après une incubation de 24 h, les peaux porcines et humaines sont délicatement rincées au PBS à l'aide d'une pisette et séchées. La zone traitée est coupée en trois tranches égales pour être représentatif de toute la peau. Nous avons ensuite déposé, à l'aide d'une pince, les trois tranches de peaux dans un moule plastique (Tissue-Tek® Cryomold®), dont le fond est rempli de l'O.C.T (Tissue-Tek®), et nous avons recouvert de nouveau d'OCT jusqu'au bord du moule. Les tranches de peaux incluses dans de l'OCT, dans le moule, sont ensuite congelées dans de l'isopentane refroidi à -80°C pendant une minute. Des coupes de 10 µm d'épaisseur obtenues à l'aide de cryostat (CM1950, Leica, Wetzlar, Germany) sont montées entre lames et lamelles en utilisant le milieu de montage avec DAPI (ProLong Gold anti-fade reagent with DAPI, Invitrogen) ou sans DAPI (Prolong Gold antifade reagent, Invitrogen) (une goutte par lame). Les lames sont ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal SP8 Leica à objectif

inversé (63X), à immersion huile. Les paramètres utilisés lors de l'observation sur le logiciel LAS X sont : λex= 635 nm, λem= 650 à 800 nm, la puissance du laser fixé à 40 % et le gain fixé à 200 V. Les images obtenues sont ensuite traitées sur le logiciel ImageJ.

2.2.2. Modèle de peaux psoriasiques induites par l'imiquimod

2.2.2.1. Induction de psoriasis par l'imiquimod

Des souris femelles Balb/c âgées de 8 semaines (Envigo ; Gannat, France) sont utilisées lors de ces expérimentations. Les procédures expérimentales ont été évaluées et approuvées par le comité d'éthique en Expérimentation Animale. Les gestes et les procédures expérimentales sont réalisés sous anesthésie gazeuse, pratiquée dans un poste à anesthésie par inhalation de 4% d'isoflurane dans la boite à induction puis de 3% au masque. Après une semaine d'acclimatation des souris, le dos des souris est rasé, à j-1, sur une surface d'environ 4 cm^2 à l'aide d'une tondeuse et les poils résiduels sont éliminés à l'aide d'une crème dépilatoire Veet® (pour peau sensible). Le dos des souris est ensuite rincé à l'eau tiède puis séché à l'aide d'un papier absorbant. À J0, 80 mg d'Aldara™ crème (5% IMQ, 3M Pharmaceuticals), 80 mg de vaseline (Laboratoires GILBERT) ou 80 mg de xanthane 1% ont été appliqués et massés sur le dos des souris chaque jour pendant 7 jours consécutifs (**Figure 75**). Pour pallier la déshydratation qui résulte de l'application journalière d'IMQ, les souris sont réhydratées par injection intrapéritonéale de 300 µL de PBS en cas de perte de 10% de leur poids de départ.

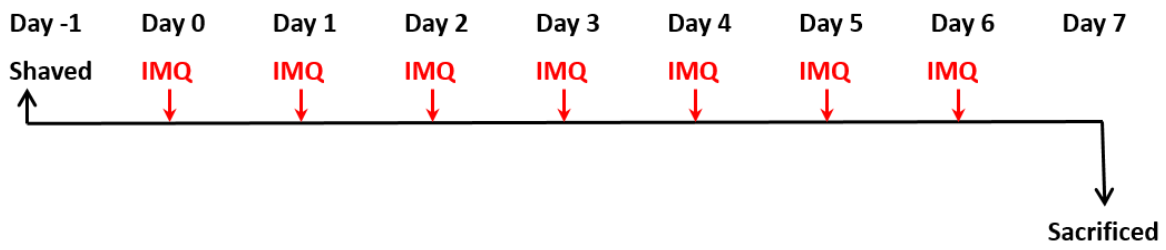


Figure 75. Protocole d'induction du psoriasis par l'IMQ chez les souris.

À j7, les souris sont anesthésiées par inhalation de l'isoflurane puis euthanasiées par dislocation cervicale et les peaux de dos traitées sont prélevées. Une partie de la peau est fixée dans 4% de paraformaldéhyde pour l'évaluation histologique (coloration *Hémalun-*

Eosine) et l'autre partie est congelée à -80°C pour une utilisation ultérieure pour les études de pénétration cutanée *ex vivo.*

2.2.2.2. Étude de la pénétration cutanée *ex vivo*

Au moment de l'expérience, les peaux de souris traitées avec l'IMQ sont décongelées à température ambiante. L'étape suivante est la diffusion cutanée du dendrimère sous ses formes libre et formulée, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale **2.1.2**. À l'issue des 24 heures, les peaux sont retirées de la cellule de Franz et subissent le même traitement que celui décrit dans la partie **2.2.1** pour observation en microscopie confocale.

3. Évaluation des propriétés anti-inflammatoires de la formulation *in vitro*

3.1. Purification des monocytes humains

Le sang humain des donneurs sains est récupéré de l'établissement français du sang (EFS, Toulouse, France). Les PBMCs sont ensuite séparés du sang à l'aide d'un gradient de densité avec une solution de Pancoll (Pan Biotech) par centrifugation à 288 g pendant 20 minutes à 20°C. Les monocytes sont isolés des PBMCs par une sélection négative à l'aide des billes magnétiques. Les billes magnétiques portent des anticorps dirigés spécifiquement contre toutes les cellules du sang (cellules T, cellules B, cellules NK, cellules dendritiques, érythrocytes et granulocytes), excepté les monocytes, en utilisant le kit Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes (Invitrogen). Une fois marquées, les cellules sont retenues sur une colonne aimantée et seuls les monocytes sont élués, sans avoir été activés par les billes. La pureté des monocytes a été vérifiée en cytométrie en flux pour chaque donneur avec un anticorps anti-CD14-PE-Cy7 et avec son isotype comme contrôle négatif (BD Biosciences) (**Figure 76**).

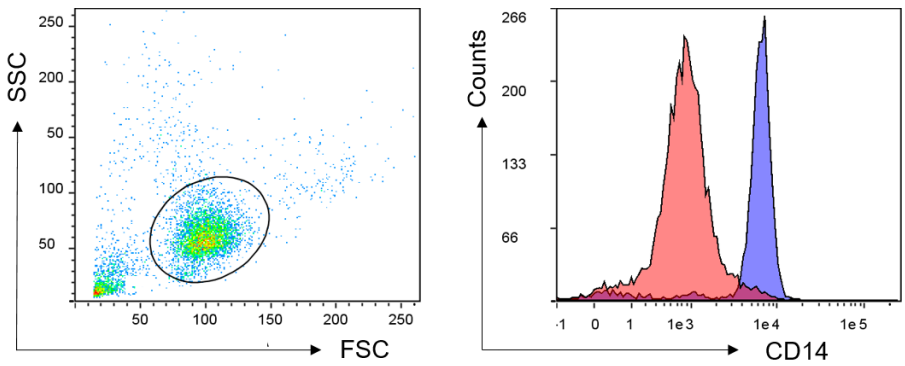


Figure 76. Monocytes humains analysés par cytométrie en flux à J0. *Les monocytes sont identifiés grâce à leur morphologie (à gauche), taille (FSC, Forward Scatter) et granulosité (SSC, Side Scatter), et à l'expression positive de CD14 à leur surface (histogramme en violet correspond aux cellules CD14⁺ et celui en rouge correspond aux cellules marquées par le contrôle isotypique) (à droite).*

3.2. Culture et analyse des monocytes humains

Les monocytes fraichement purifiés sont mis en culture à 10^6 cellules /mL à 37°C dans un milieu RPMI 1640 + Glutamax (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium + GlutaMAX™ Supplement, Gibco) supplémenté avec 10% FBS décomplémenté (Fetal bovine serum, Sigma-Aldrich) et 1% de P/S (Penicillin/streptomycin, Gibco), en présence du dendrimère sous ses formes libres, du dendrimère formulé et du TriCat seul pour 2 ou 5 jours. Toutes les molécules sont ajoutées au début des cultures à des concentrations spécifiques : 0,2 µM/ 2 µM/ 20 µM en dendrimère et 0,4 µM / 4 µM/ 40 µM en TriCat. Après 2 ou 5 jours de culture, les monocytes sont lavés et marqués par un anticorps anti-HLA-DR-VioBlue ainsi qu'avec son isotype (Miltenyi Biotec). Les changements morphologiques et phénotypiques des monocytes sont ensuite évalués par l'acquisition des cellules sur le cytomètre MACSQuant 10 (Miltenyi Biotec). Toutes les données de cytométrie sont analysées par le logiciel Flowlogic™ (Miltenyi Biotec).

L'activité anti-inflammatoire de l'ABP-NIR est évaluée sur monocytes humains comme décrit précédemment (pendant 3 jours de culture). Les changements morphologiques et phénotypiques des monocytes sont ensuite évalués par l'analyse morphologique et phénotypique des cellules sur le cytomètre LSR II (BD Biosciences).

3.3. Internalisation du dendrimère par les monocytes humains

Des lamelles stériles sont déposées au fond d'une plaque 24 puits (1 lamelle/puit) et sont incubées pendant 1 heure à 37°C avec de la poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) diluée au 1/5ème dans l'eau. Les lamelles sont ensuite rincées 3 fois au PBS puis sont séchées.

Les monocytes purifiés sont mis en culture à 10^6 cellules /mL dans une plaque 48 puits en présence du dendrimère fluorescent sous ses formes libres ou sous sa forme formulée à la concentration de 20 µM pour 1 heure à 37°C. Après 1 heure, les monocytes sont lavés et resuspendus dans du PBS puis sont mis à adhérer sur les lamelles préalablement préparées. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes à température ambiante puis sont rincées 3 fois au PBS. Après le dernier lavage, les lamelles sont déposées sur une lame de microscope en utilisant un milieu de montage Vectashield contenant du DAPI (VECTASHIELD Antifade Mounting Medium with DAPI, Vector laboratories) (une goutte) puis scellées avec du vernis. Ces lames sont ensuite observées au microscope confocal SP8 Leica à objectif inversé (63X), à immersion huile avec un zoom (x3). Les images obtenues sont ensuite traitées sur le logiciel ImageJ.

4. Preuve d'efficacité thérapeutique de la formulation dans un modèle murin de psoriasis

4.1. Préparation des solutions

La solution du dendrimère ABP libre correspondant à la dose de 50 mg/kg est préparée dans l'eau pure (solution préparée à 1,7 mM en ABP dans l'eau ; 100 µL est déposé sur le dos de la souris de poids approximatif de 20 g). La solution d'ABP à la plus faible dose, 13 mg/kg, est préparée par dilution par 3,85 dans l'eau de la solution mère à la dose de 50 mg/kg.

La formulation TriCat/ABP-A est préparée selon le protocole expérimental décrit (méthode D) correspondant à une dose de 13 mg/kg en dendrimère.

Les différentes solutions sont réparties en 7 aliquots (pour les 7 jours de traitements) et congelées à -20°C jusqu'au jour du traitement.

4.2. Induction de psoriasis par l'imiquimod

Le protocole expérimental utilisé pour induire l'inflammation psoriasique chez les souris est le même que celui décrit dans la partie expérimentale 2.2.2 et dans l'étude que nous avons publiée, sauf que l'application de l'IMQ est décalée l'après-midi. Le modèle de psoriasis est donc induit chez des souris femelles Balb/c âgées de 8 semaines, de poids approximatif de 20 g, par une application cutanée journalière de 80 mg d'Aldara 5% (4 mg d'IMQ) en fin d'après-midi (J0 à J6). Les souris traitées par l'IMQ sont comparées à des souris traitées par 80 mg de xanthane 1% ou à des souris n'ayant pas reçu d'application cutanée (contrôle négatif). Le lendemain matin (8h30), le dos des animaux traités par l'IMQ est lavé par un coton imbibé d'eau pour enlever les éventuelles traces d'Aldara. Nous avons ensuite appliqué sur la peau du dos rasé des souris les traitements suivants (volume= 100 µL) : eau (contrôle positif), ABP libre (dose 13 ou 50 mg/kg) ou le dendrimère formulé (dose 13 mg/kg) de façon quotidienne pendant 7 jours (J1 à J7) (*cf* chapitre 2 **figure 63**). À J7, 5 heures après la dernière application des différents traitements, les souris sont sacrifiées et les peaux traitées sont immédiatement prélevées et fixées pour analyse histologique.

4.3. Évaluation clinique de l'inflammation cutanée

La sévérité de l'inflammation de la peau du dos des souris est évaluée à l'aide d'un score clinique basé sur le score PASI. Contrairement à celui calculé chez l'homme, ce score dans le modèle murin ne prend pas en compte la surface de la zone cutanée affectée dans le calcul du score global. La sévérité de l'inflammation cutanée est donc déterminée par une évaluation quotidienne de l'érythème, des squames et de l'épaisseur du dos suivant un score allant de 0 à 4 (0 = normal ; 1 = léger ; 2 = modéré ; 3 = marqué ; 4 = très marqué) [30]. L'épaisseur du dos est mesurée à l'aide d'un pied à coulisse. La somme des 3 scores donne le score clinique total, qui varie donc de 0 à 12.

4.4. Évaluation histologique de l'inflammation cutanée

Les peaux prélevées sont immédiatement fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4% et sont ensuite incluses dans des blocs de paraffine. Les colorations HE sont réalisées sur des coupes de peaux déparaffinées de 5 µm. Les images sont obtenues à l'aide d'un scanner de lames (Panoramic slide scanner 250, objectif 40x). La sévérité de l'inflammation, au niveau histologique, est évaluée en se basant sur les caractéristiques histopathologiques suivantes

du psoriasis : acanthose, spongiose, hyperkératose, parakératose et infiltrat immunitaire. Pour chacun de ces critères, un score allant de 0 (normal) à 4 (sévère) a été attribué et ces scores sont cumulés pour donner le score histologique total (échelle de 0 à 20). Sur toute la longueur de la coupe histologique, le nombre de micro-abcès de Munro dans la couche cornée est compté.

4.5. Analyses statistiques

Les données ont été analysées avec le logiciel Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Les résultats ont été représentés par la moyenne ± SEM (standard error mean). Après vérification de l'homogénéité des variances des différents groupes par un test Bartlett, un test One Way ANOVA suivi par un post-test Tukey ont été effectués pour comparer les groupes entre eux. Les valeurs $p<0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Références Bibliographiques

1. Parisi R, Symmons DPM, Griffiths CEM, Ashcroft DM. Global Epidemiology of Psoriasis: A Systematic Review of Incidence and Prevalence. J Invest Dermatol. 2013 Feb;133(2):377–85.

2. Di Meglio P, Villanova F, Nestle FO. Psoriasis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Aug 1;4(8).

3. Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, Chamilos G, Feldmeyer L, Marinari B, Chon S, Vence L, Riccieri V, Guillaume P, Navarini AA, Romero P, Costanzo A, Piccolella E, Gilliet M, Frasca L. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. Nat Commun. 2014 Dec;5(1):5621.

4. Griffiths CEM, Barker JNWN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. Lancet. 2007;370:263–71.

5. Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of Psoriasis. Annu Rev Immunol. 2014 Mar 21;32(1):227–55.

6. Martin BA. How Great Is the Risk of Further Psoriasis Following a Single Episode of Acute Guttate Psoriasis? Arch Dermatol. 1996 Jun 1;132(6):717.

7. Twelves S, Mostafa A, Dand N, Burri E, Farkas K, Wilson R, Cooper HL, Irvine AD, Oon HH, Kingo K, Köks S, Mrowietz U, Puig L, Reynolds N, Tan ES-T, Tanew A, Torz K, Trattner H, Valentine M, Wahie S, Warren RB, Wright A, Bata-Csörgő Z, Szell M, Griffiths CEM, Burden AD, Choon S-E, Smith CH, Barker JN, Navarini AA, Capon F. Clinical and genetic differences between pustular psoriasis subtypes. J Allergy Clin Immunol. 2019 Mar;143(3):1021–6.

8. Henes JC, Ziupa E, Eisfelder M, Adamczyk A, Knaudt B, Jacobs F, Lux J, Schanz S, Fierlbeck G, Spira D, Horger M, Kanz L, Koetter I. High prevalence of psoriatic arthritis in dermatological patients with psoriasis: a cross-sectional study. Rheumatol Int. 2014 Feb;34(2):227–34.

9. Wan J, Wang S, Haynes K, Denburg MR, Shin DB, Gelfand JM. Risk of moderate to advanced kidney disease in patients with psoriasis: population based cohort study. BMJ. 2013 Oct 15;347:f5961.

10. Sommer DM, Jenisch S, Suchan M, Christophers E, Weichenthal M. Increased prevalence of the metabolic syndrome in patients with moderate to severe psoriasis. Arch Dermatol Res. 2006 Sep 22;298(7):321.

11. Benson HAE. Skin Structure, Function, and Permeation. In: Topical and Transdermal Drug Delivery. John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 3–22.

12. Chuang S-Y, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. Murine models of psoriasis and their usefulness for drug discovery. Expert Opin Drug Discov. 2018 Jun 3;13(6):551–62.

13. Walters KA, Roberts MS. The Structure and Function of Skin. In: Dermatological and transdermal formulations. 2002.

14. Denecker G, Ovaere P, Vandenabeele P, Declercq W. Caspase-14 reveals its secrets. J Cell Biol. 2008 Feb 11;180(3):451–8.

15. Sharadha M, Gowda D V, Vishal Gupta N, Akhila A R. An overview on topical drug delivery system – Updated review. Int J Res Pharm Sci. 2020 Jan 9;11(1):368–85.

16. Kanwar AJ. Skin barrier function. Indian J Med Res. 2018;147(1):117–8.

17. Sandilands A, Sutherland C, Irvine AD, McLean WHI. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. J Cell Sci. 2009 May 1;122(9):1285–94.

18. Watabe A, Sugawara T, Kikuchi K, Yamasaki K, Sakai S, Aiba S. Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. J Dermatol Sci. 2013 Nov;72(2):177–82.

19. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. Int J Pharm. 2012 Oct;435(1):3–9.

20. Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. N Engl J Med. 2009;361:496–509.

21. Ansel JC, Tiesman JP, Olerud JE, Krueger JG, Krane JF, Tara DC, Shipley GD, Gilbertson D, Usui ML, Hart CE. Human keratinocytes are a major source of cutaneous platelet-derived growth factor. J Clin Invest. 1993 Aug;92(2):671–8.

22. Katayama H. Development of psoriasis by continuous neutrophil infiltration into the epidermis. Exp Dermatol. 2018 Oct;27(10):1084–91.

23. Detmar M, Yeo K-T, Nagy JA, van de Water L, Brown LF, Berse B, Elicker BM, Ledbetter S, Dvorak HF. Keratinocyte-Derived Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Is a Potent Mitogen for Dermal Microvascular Endothelial Cells. J Invest Dermatol. 1995 Jul;105(1):44–50.

24. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. Pathogenesis and therapy of psoriasis. Nature. 2007 Feb;445(7130):866–73.

25. Cumberbatch M, Singh M, Dearman RJ, Young HS, Kimber I, Griffiths CEM. Impaired Langerhans cell migration in psoriasis. J Exp Med. 2006 Apr 17;203(4):953–60.

26. Ammar M, Souissi-Bouchlaka C, Gati A, Zaraa I, Bouhaha R, Kouidhi S, Ben Ammar-Gaied A, Doss N, Mokni M, Marrakchi R. Le psoriasis : physiopathologie et immunogénétique. Pathol Biol. 2014 Feb;62(1):10–23.

27. Morizane S, Gallo RL. Antimicrobial peptides in the pathogenesis of psoriasis: AMPs in the pathogenesis of psoriasis. J Dermatol. 2012 Mar;39(3):225–30.

28. Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang Y-H, Homey B, Cao W, Wang Y-H, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder J-M, Liu Y-J, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. Nature. 2007 Oct;449(7162):564–9.

29. Gilliet M, Lande R. Antimicrobial peptides and self-DNA in autoimmune skin inflammation. Curr Opin Immunol. 2008 Aug;20(4):401–7.

30. Fits L van der, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus A-M, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. J Immunol. 2009 May 1;182(9):5836–45.

31. Lowes MA, Chamian F, Abello MV, Fuentes-Duculan J, Lin S-L, Nussbaum R, Novitskaya I, Carbonaro H, Cardinale I, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Wittkowski KM, Papp K, Garovoy M, Dummer W, Steinman RM, Krueger JG. Increase in TNF-α and inducible nitric

oxide synthase-expressing dendritic cells in psoriasis and reduction with efalizumab (anti-CD11a). Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 27;102(52):19057–62.

32. Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. J Am Acad Dermatol. 2002 Jan;46(1):1–26.

33. Ellis CN, Gorsulowsky DC, Hamilton TA, Billings JK, Brown MD, Headington JT, Cooper KD, Baadsgaard O, Duell EA, Annesley TM. Cyclosporine improves psoriasis in a double-blind study. JAMA. 1986 Dec 12;256(22):3110–6.

34. Gottlieb SL, Gilleaudeau P, Johnson R, Estes L, Woodworth TG, Gottlieb AB, Krueger JG. Response of psoriasis to a lymphocyte-selective toxin (DAB 389 IL-2) suggests a primary immune, but not keratinocyte, pathogenic basis. Nat Med. 1995 May;1(5):442–7.

35. Fuentes-Duculan J, Suárez-Fariñas M, Zaba LC, Nograles KE, Pierson KC, Mitsui H, Pensabene CA, Kzhyshkowska J, Krueger JG, Lowes MA. A Subpopulation of CD163-Positive Macrophages Is Classically Activated in Psoriasis. J Invest Dermatol. 2010 Oct;130(10):2412–22.

36. Krueger JG, Fretzin S, Suárez-Fariñas M, Haslett PA, Phipps KM, Cameron GS, McColm J, Katcherian A, Cueto I, White T, Banerjee S, Hoffman RW. IL-17A is essential for cell activation and inflammatory gene circuits in subjects with psoriasis. J Allergy Clin Immunol. 2012 Jul;130(1):145-154.e9.

37. Austin LM, Ozawa M, Kikuchi T, Walters IB, Krueger JG. The Majority of Epidermal T Cells in Psoriasis Vulgaris Lesions can Produce Type 1 Cytokines, Interferon-γ, Interleukin-2, and Tumor Necrosis Factor-α, Defining TC1 (Cytotoxic T Lymphocyte) and TH1 Effector Populations:1 a Type 1 Differentiation Bias is also Measured in Circulating Blood T Cells in Psoriatic Patients. J Invest Dermatol. 1999 Nov;113(5):752–9.

38. Morizane S, Yamasaki K, Mühleisen B, Kotol PF, Murakami M, Aoyama Y, Iwatsuki K, Hata T, Gallo RL. Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 in Psoriasis Enables Keratinocyte Reactivity against TLR9 Ligands. J Invest Dermatol. 2012 Jan;132(1):135–43.

39. Hijnen D, Knol EF, Gent YY, Giovannone B, Beijn SJP, Kupper TS, Bruijnzeel-Koomen CAFM, Clark RA. CD8+ T Cells in the Lesional Skin of Atopic Dermatitis and Psoriasis Patients Are an Important Source of IFN-γ, IL-13, IL-17, and IL-22. J Invest Dermatol. 2013 Apr;133(4):973–9.

40. Purwar R, Werfel T, Wittmann M. IL-13-Stimulated Human Keratinocytes Preferentially Attract CD4+CCR4+ T cells: Possible Role in Atopic Dermatitis. J Invest Dermatol. 2006 May;126(5):1043–51.

41. Purwar R, Kraus M, Werfel T, Wittmann M. Modulation of Keratinocyte-Derived MMP-9 by IL-13: A Possible Role for the Pathogenesis of Epidermal Inflammation. J Invest Dermatol. 2008 Jan;128(1):59–66.

42. Nickoloff BJ, Wrone-Smith T, Bonish B, Porcelli SA. Response of Murine and Normal Human Skin to Injection of Allogeneic Blood-Derived Psoriatic Immunocytes: Detection of T Cells Expressing Receptors Typically Present on Natural Killer Cells, Including CD94, CD158, and CD161. Arch Dermatol. 1999;135(5).

43. Nickoloff BJ, Bonish B, Huang BB, Porcelli SA. Characterization of a T cell line bearing natural killer receptors and capable of creating psoriasis in a SCID mouse model system. J Dermatol Sci. 2000 Dec;24(3):212–25.

44. Clark RA, Kupper TS. Misbehaving macrophages in the pathogenesis of psoriasis. J Clin Invest. 2006 Aug 1;116(8):2084–7.

45. Marble DJ, Gordon KB, Nickoloff BJ. Targeting TNFα rapidly reduces density of dendritic cells and macrophages in psoriatic plaques with restoration of epidermal keratinocyte differentiation. J Dermatol Sci. 2007 Nov;48(2):87–101.

46. Wang Y, Edelmayer R, Wetter J, Salte K, Gauvin D, Leys L, Paulsboe S, Su Z, Weinberg I, Namovic M, Gauld SB, Honore P, Scott VE, McGaraughty S. Monocytes/Macrophages play a pathogenic role in IL-23 mediated psoriasis-like skin inflammation. Sci Rep. 2019 Dec;9(1):5310.

47. Wang H. Activated macrophages are essential in a murine model for T cell-mediated chronic psoriasiform skin inflammation. J Clin Invest. 2006 Aug 1;116(8):2105–14.

48. McCormick T, Ayala-Fontanez N, Soler D. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. Psoriasis Targets Ther. 2016 Feb;7–32.

49. Arakawa A, Siewert K, Stöhr J, Besgen P, Kim S-M, Rühl G, Nickel J, Vollmer S, Thomas P, Krebs S, Pinkert S, Spannagl M, Held K, Kammerbauer C, Besch R, Dornmair K, Prinz JC. Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. J Exp Med. 2015 Dec 14;212(13):2203–12.

50. Yunusbaeva M, Valiev R, Bilalov F, Sultanova Z, Sharipova L, Yunusbayev B. Psoriasis patients demonstrate HLA-Cw*06:02 allele dosage-dependent T cell proliferation when treated with hair follicle-derived keratin 17 protein. Sci Rep. 2018 Dec;8(1):6098.

51. Elder JT. Expanded Genome-Wide Association Study Meta-Analysis of Psoriasis Expands the Catalog of Common Psoriasis-Associated Variants. J Investig Dermatol Symp Proc. 2018 Dec;19(2):S77–8.

52. Trembath RC, Lee Clough R, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RDR, Frodsham A, Browne J, Barber R, Terwilliger J, Mark Lathrop G, Barker JNWN. Identification of a Major Susceptibility Locus on Chromosome 6p and Evidence for Further Disease Loci Revealed by a Two Stage Genome-Wide Search in Psoriasis. Hum Mol Genet. 1997 May 1;6(5):813–20.

53. Nair RP, Duffin KC, Helms C, Ding J, Stuart PE, Goldgar D, Gudjonsson JE, Li Y, Tejasvi T, Feng BJ, Ruether A, Schreiber S, Weichenthal M, Gladman D, Rahman P, Schrodi SJ, Prahalad S, Guthery SL, Fischer J, Liao W, Kwok P-Y, Menter A, Lathrop GM, Wise CA, Begovich AB, Voorhees JJ, Elder JT, Krueger GG, Bowcock AM, Abecasis GR. Genomewide Scan Reveals Association of Psoriasis with IL-23 and NF-κB Pathways. Nat Genet. 2009 Feb;41(2):199–204.

54. Riveira-Munoz E, He S-M, Escaramís G, Stuart PE, Hüffmeier U, Lee C, Kirby B, Oka A, Giardina E, Liao W, Bergboer J, Kainu K, de Cid R, Munkhbat B, Zeeuwen PLJM, Armour JAL, Poon A, Mabuchi T, Ozawa A, Zawirska A, Burden AD, Barker JN, Capon F, Traupe H, Sun L-D, Cui Y, Yin X-Y, Chen G, Lim HW, Nair RP, Voorhees JJ, Tejasvi T, Pujol R, Munkhtuvshin N, Fischer J, Kere J, Schalkwijk J, Bowcock A, Kwok P-Y, Novelli G, Inoko H, Ryan AW, Trembath RC, Reis A, Zhang X-J, Elder JT, Estivill X. Meta-Analysis Confirms the LCE3C_LCE3B Deletion as a Risk Factor for Psoriasis in Several Ethnic Groups and Finds Interaction with HLA-Cw6. J Invest Dermatol. 2011 May;131(5):1105–9.

55. Hollox EJ, Huffmeier U, Zeeuwen PLJM, Palla R, Lascorz J, Rodijk-Olthuis D, van de Kerkhof PCM, Traupe H, de Jongh G, Heijer M den, Reis A, Armour JAL, Schalkwijk J. Psoriasis is associated with increased β-defensin genomic copy number. Nat Genet. 2008 Jan;40(1):23–5.

56. Feldman S. A quantitative definition of severe psoriasis for use in clinical trials. J Dermatol Treat. 2004 Jan;15(1):27–9.

57. Arnone M, Takahashi MDF, Carvalho AVE de, Bernardo WM, Bressan AL, Ramos AMC, Terena AC, Souza C da S, Nunes DH, Bortoletto MC de C, Oliveira M de FSP de, Neffá JM, Fieri LC, Azulay-Abulafia L, Felix PAO, Magalhaes RF, Romiti R, Jaime TJ. Diagnostic and therapeutic guidelines for plaque psoriasis - Brazilian Society of Dermatology. Bras Dermatol. 2019 Apr;94(2 suppl 1):76–107.

58. Carlin CS, Feldman SR, Krueger JG, Menter A, Krueger GG. A 50% reduction in the Psoriasis Area and Severity Index (PASI 50) is a clinically significant endpoint in the assessment of psoriasis. J Am Acad Dermatol. 2004 Jun;50(6):859–66.

59. Finlay AY. Current severe psoriasis and the Rule of Tens. Br J Dermatol. 2005 May;152(5):861–7.

60. van de Kerkhof P, Barker J, Griffiths C, Kragballe K, Mason J, Menter A, Papp K. Psoriasis: consensus on topical therapies. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2008 Jul;22(7):859–70.

61. Huber C, Christophers E. “Keratolytic” effect of salicylic acid. Arch Dermatol Res. 1977;257(3):293–7.

62. Lebwohl M. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. Int J Dermatol. 1999;38(1):16–24.

63. Hoffman MB, Farhangian M, Feldman SR. Psoriasis during pregnancy: characteristics and important management recommendations. Expert Rev Clin Immunol. 2015 Jun 3;11(6):709–20.

64. Tissandié E, Guéguen Y, A.Lobaccaro J-M, Aigueperse J, Souidi M. Vitamine D : Métabolisme, régulation et maladies associées. médecine/sciences. 2006 Dec;22(12):1095–100.

65. Barrea L, Savanelli MC, Di Somma C, Napolitano M, Megna M, Colao A, Savastano S. Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. Rev Endocr Metab Disord. 2017 Jun;18(2):195–205.

66. Peric M, Koglin S, Dombrowski Y, Groß K, Bradac E, Büchau A, Steinmeyer A, Zügel U, Ruzicka T, Schauber J. Vitamin D Analogs Differentially Control Antimicrobial Peptide/“Alarmin”Expression in Psoriasis. Unutmaz D, editor. PLoS ONE. 2009 Jul 22;4(7):e6340.

67. Van De Kerkhof PCM. The impact of a two-compound product containing calcipotriol and betamethasone dipropionate (Daivobet/ Dovobet) on the quality of life in patients with psoriasis vulgaris: a randomized controlled trial. Br J Dermatol. 2004 Sep;151(3):663–8.

68. Satake K, Amano T, Okamoto T. Low systemic exposure and calcemic effect of calcipotriol/betamethasone ointment in rats with imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis. Eur J Pharmacol. 2018 May;826:31–8.

69. Weinstein GD, Krueger GG, Lowe NJ, Duvic M, Friedman DJ, Jegasothy BV, Jorizzo JL, Shmunes E, Tschen EH, Lew-Kaya DA, Lue JC, Sefton J, Gibson JR, Chandraratna RAS. Tazarotene gel, a new retinoid, for topical therapy of psoriasis: Vehicle-controlled study of safety, efficacy, and duration of therapeutic effect. J Am Acad Dermatol. 1997 Jul;37(1):85–92.

70. Chandraratna RAS. Tazarotene-first of a new generation of receptor-selective retinoids. Br J Dermatol. 1996 Oct;135:18–25.

71. Duvic M, Asano AT, Hager C, Mays S. The pathogenesis of psoriasis and the mechanism of action of tazarotene. J Am Acad Dermatol. 1998 Oct;39(4):S129–33.

72. Weinstein GD, Koo JYM, Krueger GG, Lebwohl MG, Lowe NJ, Menter MA, Lew-Kaya DA, Sefton J, Gibson JR, Walker PS. Tazarotene cream in the treatment of psoriasis: Two multicenter, double-blind, randomized, vehicle-controlled studies of the safety and efficacy of tazarotene creams 0.05% and 0.1% applied once daily for 12 weeks. J Am Acad Dermatol. 2003 May;48(5):760–7.

73. Laws PM, Young HS. Topical treatment of psoriasis. Expert Opin Pharmacother. 2010 Aug;11(12):1999–2009.

74. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, Filipe P. Mechanisms of Action of Topical Corticosteroids in Psoriasis. Int J Endocrinol. 2012;2012:1–16.

75. Higgins E. Psoriasis. Medicine (Baltimore). 2017 Jun;45(6):368–78.

76. Murphy G, Reich K. In touch with psoriasis: topical treatments and current guidelines: Psoriasis treatments and guidelines. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 Jun;25:3–8.

77. Lebwohl M, Drake L, Menter A, Koo J, Gottlieb AB, Zanolli M, Young M, McClelland P. Consensus conference: Acitretin in combination with UVB or PUVA in the treatment of psoriasis. J Am Acad Dermatol. 2001 Oct;45(4):544–53.

78. Montaudié H, Sbidian E, Paul C, Maza A, Gallini A, Aractingi S, Aubin F, Bachelez H, Cribier B, Joly P, Jullien D, Le Maître M, Misery L, Richard M-A, Ortonne J-P. Methotrexate in psoriasis: a systematic review of treatment modalities, incidence, risk factors and monitoring of liver toxicity: Methotrexate in psoriasis: review. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011 May;25:12–8.

79. Archer TM, Boothe DM, Langston VC, Fellman CL, Lunsford KV, Mackin AJ. Oral Cyclosporine Treatment in Dogs: A Review of the Literature. J Vet Intern Med. 2014 Jan;28(1):1–20.

80. Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Tivony R, Larush L, Verkhovsky L, Brégégère FM, Neuman R, Magdassi S, Milner Y. Penetration and biological effects of topically applied cyclosporin A nanoparticles in a human skin organ culture inflammatory model. Exp Dermatol. 2012 Dec;21(12):938–43.

81. Blair HA. Dimethyl Fumarate: A Review in Moderate to Severe Plaque Psoriasis. Drugs. 2018 Jan;78(1):123–30.

82. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, Fontenot JD. DMF, but not other fumarates, inhibits NF-κB activity in vitro in an Nrf2-independent manner. J Neuroimmunol. 2015 Jun;283:74–85.

83. Bovenschen HJ, Langewouters AMG, van de Kerkhof PCM. Dimethylfumarate for Psoriasis: Pronounced Effects on Lesional T-Cell Subsets, Epidermal Proliferation and Differentiation, but not on Natural Killer T Cells in Immunohistochemical Study. Am J Clin Dermatol. 2010 Oct;11(5):343–50.

84. Mrowietz U, Szepietowski JC, Loewe R, van de Kerkhof P, Lamarca R, Ocker WG, Tebbs VM, Pau-Charles I. Efficacy and safety of LAS41008 (dimethyl fumarate) in adults with moderate-to-severe chronic plaque psoriasis: a randomized, double-blind, Fumaderm ® - and placebo-controlled trial (BRIDGE). Br J Dermatol. 2017 Mar;176(3):615–23.

85. Schafer P, Parton A, Gandhi A, Capone L, Adams M, Wu L, Bartlett J, Loveland M, Gilhar A, Cheung Y-F, Baillie G, Houslay M, Man H-W, Muller G, Stirling D. Apremilast, a cAMP phosphodiesterase-4 inhibitor, demonstrates anti-inflammatory activity in vitro and in a model of psoriasis: Anti-psoriatic activity of apremilast. Br J Pharmacol. 2010 Feb;159(4):842–55.

86. Reich K, Gooderham M, Green L, Bewley A, Zhang Z, Khanskaya I, Day RM, Goncalves J, Shah K, Piguet V, Soung J. The efficacy and safety of apremilast, etanercept and placebo in patients with moderate-to-severe plaque psoriasis: 52-week results from a phase IIIb, randomized, placebo-controlled trial (LIBERATE). J Eur Acad Dermatol Venereol. 2017 Mar;31(3):507–17.

87. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. Int J Mol Sci. 2019 Mar 23;20(6).

88. European Medicines Agency [Internet]. European Medicines Agency. [cited 2021 Feb 19]. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines

89. Dave K, Krishna Venuganti VV. Dendritic polymers for dermal drug delivery. Ther Deliv. 2017 Dec;8(12):1077–96.

90. Tomalia DA, Baker H, Dewald J, Hall M, Kallos G, Martin S, Roeck J, Ryder J, Smith P. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules. Polym J. 1985 Jan;17(1):117–32.

91. Buhleier E, Wehner W, Vogtle F. "'Cascade'" and " 'Nonskid-chain-like'" syntheses of molecular cavity topologies. Synthesis. 1978;155–8.

92. Poupot R, Ledall J, Fruchon S. The ABP Dendrimer Saga. In: caminade A-M, Majoral J-P, Turrin C-O, editors. Phosphorous Dendrimers in Biology and Nanomedicine: Syntheses, Characterization, and Properties. 2018.

93. Argenta DF, Martelli SM, Caon T. Dendrimer as a platform for drug delivery in the skin. In: Materials for Biomedical Engineering. Elsevier; 2019. p. 331–67.

94. Bonam SR, Areti A, Komirishetty P, Muller S. Dendrimers in immunotherapy and hormone therapy. In: Pharmaceutical Applications of Dendrimers. Elsevier; 2020. p. 233–49. (Micro and Nano Technologies).

95. Chauhan AS, Diwan PV, Jain NK, Tomalia DA. Unexpected In Vivo Anti-Inflammatory Activity Observed for Simple, Surface Functionalized Poly(amidoamine) Dendrimers. Biomacromolecules. 2009 May 11;10(5):1195–202.

96. Rupp R, Rosenthal SL, Stanberry LR. VivaGel™ (SPL7013 Gel): A candidate dendrimer – microbicide for the prevention of HIV and HSV infection. Int J Nanomedicine. 2007 Dec;2(4):561–6.

97. Xue X, Chen X, Mao X, Hou Z, Zhou Y, Bai H, Meng J, Da F, Sang G, Wang Y, Luo X. Amino-Terminated Generation 2 Poly(amidoamine) Dendrimer as a Potential Broad-Spectrum, Nonresistance-Inducing Antibacterial Agent. AAPS J. 2012 Nov 8;15(1):132–42.

98. Fruchon S, Poupot M, Martinet L, Turrin C-O, Majoral J-P, Fournié J-J, Caminade A-M, Poupot R. Anti-inflammatory and immunosuppressive activation of human monocytes by a bioactive dendrimer. J Leukoc Biol. 2009 Mar;85(3):553–62.

99. Cheng Y, Xu Z, Ma M, Xu T. Dendrimers as Drug Carriers: Applications in Different Routes of Drug Administration. J Pharm Sci. 2008 Jan;97(1):123–43.

100. Demanuele A, Attwood D. Dendrimer–drug interactions. Adv Drug Deliv Rev. 2005 Dec 14;57(15):2147–62.

101. Janaszewska A, Lazniewska J, Trzepiński P, Marcinkowska M, Klajnert-Maculewicz B. Cytotoxicity of Dendrimers. Biomolecules. 2019 Aug 1;9(8):330.

102. Venuganti VVK, Perumal OP. Poly(amidoamine) dendrimers as skin penetration enhancers: Influence of charge, generation, and concentration. J Pharm Sci. 2009 Jul;98(7):2345–56.

103. Gardikis K, Hatziantoniou S, Viras K, Wagner M, Demetzos C. A DSC and Raman spectroscopy study on the effect of PAMAM dendrimer on DPPC model lipid membranes. Int J Pharm. 2006 Aug 2;318(1–2):118–23.

104. Hong S, Bielinska AU, Mecke A, Keszler B, Beals JL, Shi X, Balogh L, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM. Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport. Bioconjug Chem. 2004 Jul 1;15(4):774–82.

105. Hong S, Leroueil PR, Janus EK, Peters JL, Kober M-M, Islam MT, Orr BG, Baker JR, Banaszak Holl MM. Interaction of Polycationic Polymers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Nanoscale Hole Formation and Enhanced Membrane Permeability. Bioconjug Chem. 2006 May;17(3):728–34.

106. Yang Y, Sunoqrot S, Stowell C, Ji J, Lee C-W, Kim JW, Khan SA, Hong S. Effect of Size, Surface Charge, and Hydrophobicity of Poly(amidoamine) Dendrimers on Their Skin Penetration. Biomacromolecules. 2012 Jul 9;13(7):2154–62.

107. Venuganti VV, Sahdev P, Hildreth M, Guan X, Perumal O. Structure-Skin Permeability Relationship of Dendrimers. Pharm Res. 2011 Sep;28(9):2246–60.

108. Sun M, Fan A, Wang Z, Zhao Y. Dendrimer-mediated drug delivery to the skin. Soft Matter. 2012;8(16):4301.

109. Winnicka K, Wroblewska M, Sosnowska K, Car H, Kasacka I. Evaluation of cationic polyamidoamine dendrimers' dermal toxicity in the rat skin model. Drug Des Devel Ther. 2015 Mar;9:1367–77.

110. Borowska K, Laskowska B, Magoń A, Mysliwiec B, Pyda M, Wołowiec S. PAMAM dendrimers as solubilizers and hosts for 8-methoxypsoralene enabling transdermal diffusion of the guest. Int J Pharm. 2010 Oct 15;398(1–2):185–9.

111. Borowska K, Wołowiec S, Rubaj A, Głowniak K, Sieniawska E, Radej S. Effect of polyamidoamine dendrimer G3 and G4 on skin permeation of 8-methoxypsoralene—In vivo study. Int J Pharm. 2012 Apr;426(1–2):280–3.

112. Chauhan AS, Sridevi S, Chalasani KB, Jain AK, Jain SK, Jain NK, Diwan PV. Dendrimer-mediated transdermal delivery: enhanced bioavailability of indomethacin. J Controlled Release. 2003 Jul;90(3):335–43.

113. Koç FE, Şenel M. Solubility enhancement of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) using polypolypropylene oxide core PAMAM dendrimers. Int J Pharm. 2013 Jul;451(1–2):18–22.

114. Chauhan AS. Dendrimers for Drug Delivery. Molecules. 2018 Apr 18;23(4):938.

115. Yiyun C, Tongwen X, Rongqiang F. Polyamidoamine dendrimers used as solubility enhancers of ketoprofen. Eur J Med Chem. 2005 Dec;40(12):1390–3.

116. Yiyun C, Tongwen X. Dendrimers as Potential Drug Carriers. Part I. Solubilization of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Presence of Polyamidoamine Dendrimers. Eur J Med Chem. 2005 Nov;40(11):1188–92.

117. Yiyun C, Na M, Tongwen X, Rongqiang F, Xueyuan W, Xiaomin W, Longping W. Transdermal Delivery of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Mediated by Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers. J Pharm Sci. 2007 Mar;96(3):595–602.

118. Agrawal U, Mehra NK, Gupta U, Jain NK. Hyperbranched dendritic nano-carriers for topical delivery of dithranol. J Drug Target. 2013 May;21(5):497–506.

119. Kalhapure RS, Akamanchi KG. Oleodendrimers: A novel class of multicephalous heterolipids as chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. Int J Pharm. 2013 Sep;454(1):158–66.

120. Kim M-J, Doh H-J, Choi M-K, Chung S-J, Shim C-K, Kim D-D, Kim JS, Yong C-S, Choi H-G. Skin Permeation Enhancement of Diclofenac by Fatty Acids. Drug Deliv. 2008 Jan;15(6):373–9.

121. Shaunak S, Thomas S, Gianasi E, Godwin A, Jones E, Teo I, Mireskandari K, Luthert P, Duncan R, Patterson S, Khaw P, Brocchini S. Polyvalent dendrimer glucosamine conjugates prevent scar tissue formation. Nat Biotechnol. 2004 Aug;22(8):977–84.

122. Liu X, Hao W, Lok C-N, Wang YC, Zhang R, Wong KKY. Dendrimer encapsulation enhances anti-inflammatory efficacy of silver nanoparticles. J Pediatr Surg. 2014 Dec;49(12):1846–51.

123. Rele SM, Cui W, Wang L, Hou S, Barr-Zarse G, Tatton D, Gnanou Y, Esko JD, Chaikof EL. Dendrimer-like PEO Glycopolymers Exhibit Anti-Inflammatory Properties. J Am Chem Soc. 2005 Jul;127(29):10132–3.

124. Poupot M, Griffe L, Marchand P, Maraval A, Rolland O, Martinet L, L'Faqihi-Olive F, Turrin C, Caminade A, Fournié J, Majoral J, Poupot R. Design of phosphorylated dendritic architectures to promote human monocyte activation. FASEB J. 2006 Nov;20(13):2339–51.

125. Poupot M, Poupot R, Fournié J-J, Portevin D, Turrin C-O, Caminade A-M, Majoral J-P, Rolland O. Phosphorylated dendrimers as antiinflammatory drugs. Patent WO2010013086, 2010.

126. Fruchon S, Poupot R. The ABP Dendrimer, a Drug-Candidate against Inflammatory Diseases That Triggers the Activation of Interleukin-10 Producing Immune Cells. Molecules. 2018 May 25;23(6):1272.

127. Ledall J, Fruchon S, Garzoni M, Pavan GM, Caminade A-M, Turrin C-O, Blanzat M, Poupot R. Interaction studies reveal specific recognition of an anti-inflammatory polyphosphorhydrazone dendrimer by human monocytes. Nanoscale. 2015;7(42):17672–84.

128. Degboé Y, Fruchon S, Baron M, Nigon D, Turrin C, Caminade A-M, Poupot R, Cantagrel A, Davignon J-L. Modulation of pro-inflammatory activation of monocytes and dendritic cells by aza-bis-phosphonate dendrimer as an experimental therapeutic agent. Arthritis Res Ther. 2014;16(2):R98.

129. Portevin D, Poupot M, Rolland O, Turrin C-O, Fournié J-J, Majoral J-P, Caminade A-M, Poupot R. Regulatory activity of azabisphosphonate-capped dendrimers on human CD4+ T cell proliferation enhances ex-vivo expansion of NK cells from PBMCs for immunotherapy. J Transl Med. 2009 Sep 24;7:82.

130. Hayder M, Varilh M, Turrin C-O, Saoudi A, Caminade A-M, Poupot R, Liblau RS. Phosphorus-Based Dendrimer ABP Treats Neuroinflammation by Promoting IL-10-Producing $CD4^{+}$ T Cells. Biomacromolecules. 2015 Nov 9;16(11):3425–33.

131. Hayder M, Poupot M, Baron M, Nigon D, Turrin C-O, Caminade A-M, Majoral J-P, Eisenberg RA, Fournié J-J, Cantagrel A, Poupot R, Davignon J-L. A phosphorus-based dendrimer targets inflammation and osteoclastogenesis in experimental arthritis. Sci Transl Med. 2011 May 4;3(81):81ra35.

132. Hayder M, Poupot M, Baron M, Turrin C-O, Caminade A-M, Majoral J-P, Eisenberg RA, Fournié J-J, Cantagrel A, Poupot R, Davignon J-L. Frequency and route of administration in the treatment of experimental arthritis by phosphorus-based dendrimer. Ann Rheum Dis. 2012 Feb 1;71(Suppl 1).

133. Fruchon S, Caminade A-M, Abadie C, Davignon J-L, Combette J-M, Turrin C-O, Poupot R. An Azabisphosphonate-Capped Poly(phosphorhydrazone) Dendrimer for the Treatment of Endotoxin-Induced Uveitis. Molecules. 2013 Aug 5;18(8):9305–16.

134. Rolland O, Turrin C-O, Bacquet G, Poupot R, Poupot M, Caminade A-M, Majoral J-P. Efficient synthesis of phosphorus-containing dendrimers capped with isosteric functions of amino-bismethylene phosphonic acids. Tetrahedron Lett. 2009 May;50(18):2078–82.

135. Rolland O, Griffe L, Poupot M, Maraval A, Ouali A, Coppel Y, Fournié J-J, Bacquet G, Turrin C-O, Caminade A-M, Majoral J-P, Poupot R. Tailored Control and Optimisation of the Number of Phosphonic Acid Termini on Phosphorus-Containing Dendrimers for the Ex-Vivo Activation of Human Monocytes. Chem - Eur J. 2008 May 29;14(16):4836–50.

136. Hayder M, Garzoni M, Bochicchio D, Caminade A-M, Couderc F, Ong-Meang V, Davignon J-L, Turrin C-O, Pavan GM, Poupot R. Three-Dimensional Directionality Is a Pivotal Structural Feature for the Bioactivity of Azabisphosphonate-Capped Poly(PhosphorHydrazone) Nanodrug Dendrimers. Biomacromolecules. 2018 Mar 12;19(3):712–20.

137. Fruchon S, Bellard E, Beton N, Goursat C, Oukhrib A, Caminade A-M, Blanzat M, Turrin C-O, Golzio M, Poupot R. Biodistribution and Biosafety of a Poly(Phosphorhydrazone) Dendrimer, an Anti-Inflammatory Drug-Candidate. Biomolecules. 2019 Sep 11;9(9):475.

138. Caminade A-M, Fruchon S, Turrin C-O, Poupot M, Ouali A, Maraval A, Garzoni M, Maly M, Furer V, Kovalenko V, Majoral J-P, Pavan GM, Poupot R. The key role of the scaffold on the efficiency of dendrimer nanodrugs. Nat Commun. 2015 Nov;6(1):7722.

139. Fruchon S, Mouriot S, Thiollier T, Grandin C, Caminade A-M, Turrin C-O, Contamin H, Poupot R. Repeated intravenous injections in non-human primates demonstrate preclinical safety of an anti-inflammatory phosphorus-based dendrimer. Nanotoxicology. 2015 May 19;9(4):433–41.

140. Tamargo J, Le Heuzey J-Y, Mabo P. Narrow therapeutic index drugs: a clinical pharmacological consideration to flecainide. Eur J Clin Pharmacol. 2015 May;71(5):549–67.

141. Bocheńska K, Smolińska E, Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M. Models in the Research Process of Psoriasis. Int J Mol Sci. 2017 Nov 24;18(12):2514.

142. Jayo MJ, Zanolli MD, Jayo JM. Psoriatic Plaques in *Macaca fascicularis*. Vet Pathol. 1988 Jul;25(4):282–5.

143. Regan SA, Marsella R, Ozmen I. First Report of Psoriatic-Like Dermatitis and Arthritis in a 4-Year-Old Female Spayed Pug Mix. Case Rep Vet Med. 2015;2015:1–4.

144. Gudjonsson JE, Johnston A, Dyson M, Valdimarsson H, Elder JT. Mouse Models of Psoriasis. J Invest Dermatol. 2007 Jun;127(6):1292–308.

145. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nat Rev Immunol. 2014 May;14(5):289–301.

146. Cai Y, Shen X, Ding C, Qi C, Li K, Li X, Jala VR, Zhang H, Wang T, Zheng J, Yan J. Pivotal Role of Dermal IL-17-producing γδ T Cells in Skin Inflammation. Immunity. 2011 Oct 28;35(4):596–610.

147. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J, Xing X, Nair RP, Voorhees JJ, Elder JT, Wang X-J, Sano S, Prens EP, DiGiovanni J, Pittelkow MR, Ward NL, Gudjonsson JE. Genome-Wide Expression Profiling of Five Mouse Models Identifies Similarities and Differences with Human Psoriasis. Bereswill S, editor. PLoS ONE. 2011 Apr 4;6(4):e18266.

148. Nestle F, Nickoloff B. Animal models of psoriasis: a brief update. Eur Acad Dermatol Venereol. 2006 Nov;20(Suppl. 2):24–7.

149. Harden JL, Krueger JG, Bowcock AM. The immunogenetics of Psoriasis: A comprehensive review. J Autoimmun. 2015 Nov;64:66–73.

150. Piepkorn M. Overexpression of amphiregulin, a major autocrine growth factor for cultured human keratinocytes, in hyperproliferative skin diseases. Am J Dermatopathol. 1996 Apr;18(2):165–71.

151. Cook PW, Piepkorn M, Clegg CH, Plowman GD, DeMay JM, Brown JR, Pittelkow MR. Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype. J Clin Invest. 1997 Nov 1;100(9):2286–94.

152. Han G, Williams CA, Salter K, Garl PJ, Li AG, Wang X-J. A Role for TGFβ Signaling in the Pathogenesis of Psoriasis. J Invest Dermatol. 2010 Feb;130(2):371–7.

153. Xue M, Chow S-O, Dervish S, Chan Y-KA, Julovi SM, Jackson CJ. Activated Protein C Enhances Human Keratinocyte Barrier Integrity via Sequential Activation of Epidermal Growth Factor Receptor and Tie2. J Biol Chem. 2011 Feb 25;286(8):6742–50.

154. Wolfram JA, Diaconu D, Hatala DA, Rastegar J, Knutsen DA, Lowther A, Askew D, Gilliam AC, McCormick TS, Ward NL. Keratinocyte but Not Endothelial Cell-Specific Overexpression of Tie2 Leads to the Development of Psoriasis. Am J Pathol. 2009 Apr;174(4):1443–58.

155. Wu JK, Siller G, Strutton G. Psoriasis induced by topical imiquimod. Australas J Dermatol. 2004 Feb;45(1):47–50.

156. Fanti PA, Dika E, Vaccari S, Miscial C, Varotti C. Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod. Int J Dermatol. 2006 Dec;45(12):1464–5.

157. Walter A, Schäfer M, Cecconi V, Matter C, Urosevic-Maiwald M, Belloni B, Schönewolf N, Dummer R, Bloch W, Werner S, Beer H-D, Knuth A, van den Broek M. Aldara activates TLR7-independent immune defence. Nat Commun. 2013 Jun;4(1):1560.

158. Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous Development of Psoriasis in a New Animal Model Shows an Essential Role for Resident T Cells and Tumor Necrosis Factor-α. J Exp Med. 2004 Mar 1;199(5):731–6.

159. Hawkes JE, Gudjonsson JE, Ward NL. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. J Invest Dermatol. 2017 Mar;137(3):546–9.

160. Anissimov YG, Jepps OG, Dancik Y, Roberts MS. Mathematical and pharmacokinetic modelling of epidermal and dermal transport processes. Adv Drug Deliv Rev. 2013 Feb;65(2):169–90.

161. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the Stratum Corneum: The Modulation of Skin Penetration. Skin Pharmacol Physiol. 2006;19(2):106–21.

162. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. Eur J Pharm Sci. 2001 Sep;14(2):101–14.

163. Scheuplein RJ, Blank IH, Brauner GJ, Macfarlane DJ. Percutaneous Absorption of Steroids. J Invest Dermatol. 1969 Jan;52(1):63–70.

164. Roberts MS, Cross SE, Pellett MA. Skin Transport. In: Walters KA, editor. Dermatological and transdermal formulations. 2002.

165. Lademann J, Richter H, Schanzer S, Knorr F, Meinke M, Sterry W, Patzelt A. Penetration and storage of particles in human skin: Perspectives and safety aspects. Eur J Pharm Biopharm. 2011 Apr;77(3):465–8.

166. Otberg N, Richter H, Schaefer H, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. Variations of Hair Follicle Size and Distribution in Different Body Sites. J Invest Dermatol. 2004 Jan;122(1):14–9.

167. Benson H. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. Curr Drug Deliv. 2005 Jan 1;2(1):23–33.

168. Bolzinger M-A, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2012 Jun;17(3):156–65.

169. Simonetti O, Kempenaar JA, Ponec M, Hoogstraate AJ, Bialik W, Schrijvers AHGJ, Boddé HE. Visualization of diffusion pathways across the stratum corneum of native and in-vitro-reconstructed epidermis by confocal laser scanning microscopy. Arch Dermatol Res. 1995 May;287(5):465–73.

170. Hadgraft J. Skin deep. Eur J Pharm Biopharm. 2004 Sep;58(2):291–9.

171. Bos JD, Meinardi MMHM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. Exp Dermatol. 2000 Jun;9(3):165–9.

172. Østergaard Knudsen N, Pommergaard Pedersen G. pH and Drug Delivery. In: pH of the Skin: Issues and Challenges. S. Karger AG; 2018. p. 143–51.

173. Mitragotri S, Kost J. Low-frequency sonophoresis. Adv Drug Deliv Rev. 2004 Mar;56(5):589–601.

174. Chang S-L, Banga AK. Transdermal Iontophoretic Delivery of Hydrocortisone from Cyclodextrin Solutions. J Pharm Pharmacol. 1998 Jun;50(6):635–40.

175. Denet A-R, Vanbever R, Préat V. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2004 Mar;56(5):659–74.

176. Vanbever R. Transdermal delivery of fentanyl: rapid onset of analgesia using skin electroporation. J Controlled Release. 1998 Jan 2;50(1–3):225–35.

177. Denet A-R, Préat V. Transdermal delivery of timolol by electroporation through human skin. J Controlled Release. 2003 Mar;88(2):253–62.

178. Prausnitz MR, Edelman ER, Gimm JA, Langer R, Weaver JC. Transdermal Delivery of Heparin by Skin Electroporation. Nat Biotechnol. 1995 Nov;13(11):1205–9.

179. Lombry C, Dujardin N, Préat V. Transdermal Delivery of Macromolecules Using Skin Electroporation. Pharm Res. 17(1):6.

180. Baxter J, Mitragotri S. Needle-free liquid jet injections: mechanisms and applications. Expert Rev Med Devices. 2006 Sep;3(5):565–74.

181. Kendall M, Mitchell T, Wrighton-Smith P. Intradermal ballistic delivery of micro-particles into excised human skin for pharmaceutical applications. J Biomech. 2004 Nov;37(11):1733–41.

182. Mulholland WJ, Kendall MAF, White N, Bellhouse BJ. Characterization of powdered epidermal vaccine delivery with multiphoton microscopy. Phys Med Biol. 2004 Nov 21;49(22):5043–58.

183. Singh T, Garland M, Cassidy C, Migalska K, Demir Y, Abdelghany S, Ryan E, Woolfson D, Donnelly R. Microporation Techniques for Enhanced Delivery of Therapeutic Agents. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2010 Jan 1;4(1):1–17.

184. Arora A, Prausnitz MR, Mitragotri S. Micro-scale devices for transdermal drug delivery. Int J Pharm. 2008 Dec;364(2):227–36.

185. Bramson J, Dayball K, Evelegh C, Wan YH, Page D, Smith A. Enabling topical immunization via microporation: a novel method for pain-free and needle-free delivery of adenovirus-based vaccines. Gene Ther. 2003 Feb;10(3):251–60.

186. Shah M, Crane JS. Microdermabrasion. In: StatPearls. StatPearls Publishing; 2020.

187. Escobar-Chavez JJ, Merino-Sanjuán V, López-Cervantes M, Urban-Morlan Z, Piñón-Segundo E, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. The Tape-Stripping Technique as a Method for Drug Quantification in Skin. J Pharm Pharm Sci. 2008 Mar 26;11(1):104.

188. Gupta J, Felner EI, Prausnitz MR. Rapid Pharmacokinetics of Intradermal Insulin Administered Using Microneedles in Type 1 Diabetes Subjects. Diabetes Technol Ther. 2011 Apr;13(4):451–6.

189. Alkilani A, McCrudden MT, Donnelly R. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the Stratum Corneum. Pharmaceutics. 2015 Oct 22;7(4):438–70.

190. Barry BW. Lipid-Protein-Partitioning theory of skin penetration enhancement. J Controlled Release. 1991 Jun;15(3):237–48.

191. Williams AC, Barry BW. Penetration enhancers. Adv Drug Deliv Rev. 2004 Mar;56(5):603–18.

192. Hadgraft J. Modulation of the Barrier Function of the Skin. Skin Pharmacol Physiol. 2001;14(1):72–81.

193. Paudel KS, Milewski M, Swadley CL, Brogden NK, Ghosh P, Stinchcomb AL. Challenges and opportunities in dermal/transdermal delivery. Ther Deliv. 2010 Jul;1(1):109–31.

194. Karpanen TJ, Conway BR, Worthington T, Hilton AC, Elliott TSJ, Lambert PA. Enhanced chlorhexidine skin penetration with eucalyptus oil. BMC Infect Dis. 2010 Sep 22;10:278.

195. Lane ME. Skin penetration enhancers. Int J Pharm. 2013 Apr;447(1–2):12–21.

196. Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 2009 Nov;1788(11):2362–73.

197. Abla MJ, Singh ND, Banga AK. Role of Nanotechnology in Skin Delivery of Drugs. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer; 2016. p. 1–14.

198. Neubert RHH. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. Eur J Pharm Biopharm. 2011 Jan;77(1):1–2.

199. Soussan E, Cassel S, Blanzat M, Rico-Lattes I. Drug Delivery by Soft Matter: Matrix and Vesicular Carriers. Angew Chem Int Ed. 2009 Jan 2;48(2):274–88.

200. Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems. Elsevier; 2010. p. 59–94.

201. Shukla T, Upmanyu N, Agrawal M, Saraf S, Saraf S, Alexander A. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. Biomed Pharmacother. 2018 Dec;108:1477–94.

202. Abd E, Benson H, Roberts M, Grice J. Minoxidil Skin Delivery from Nanoemulsion Formulations Containing Eucalyptol or Oleic Acid: Enhanced Diffusivity and Follicular Targeting. Pharmaceutics. 2018 Jan 25;10(1):19.

203. Gupta RR, Jain SK, Varshney M. AOT water-in-oil microemulsions as a penetration enhancer in transdermal drug delivery of 5-fluorouracil. Colloids Surf B Biointerfaces. 2005 Mar;41(1):25–32.

204. Changez M, Varshney M, Chander J, Dinda AK. Effect of the composition of lecithin/n-propanol/isopropyl myristate/water microemulsions on barrier properties of mice skin for transdermal permeation of tetracaine hydrochloride: In vitro. Colloids Surf B Biointerfaces. 2006 Jun;50(1):18–25.

205. Sarigüllü Ozgüney I, Yeşim Karasulu H, Kantarci G, Sözer S, Güneri T, Ertan G. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. AAPS PharmSciTech. 2006 Oct 20;7(4):88.

206. Chandra A, Sharma P, Irchhiaya R. Microemulsion-based hydrogel formulation for transdermal delivery of dexamethasone. Asian J Pharm. 2009;3(1):30.

207. Azeem A, Khan ZI, Aqil M, Ahmad FJ, Khar RK, Talegaonkar S. Microemulsions as a Surrogate Carrier for Dermal Drug Delivery. Drug Dev Ind Pharm. 2009 May;35(5):525–47.

208. Din F ud, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, Zeb A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. Int J Nanomedicine. 2017 Oct;Volume 12:7291–309.

209. Wang X, Wang Y, Chen ZG, Shin DM. Advances of Cancer Therapy by Nanotechnology. Cancer Res Treat. 2009;41(1):1.

210. Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. J Controlled Release. 2016 Oct;240:77–92.

211. Kilfoyle BE, Sheihet L, Zhang Z, Laohoo M, Kohn J, Michniak-Kohn BB. Development of paclitaxel-TyroSpheres for topical skin treatment. J Controlled Release. 2012 Oct;163(1):18–24.

212. Ramezanli T, Kilfoyle BE, Zhang Z, Michniak-Kohn BB. Polymeric nanospheres for topical delivery of vitamin D3. Int J Pharm. 2017 Jan;516(1–2):196–203.

213. Goyal R, Macri L, Kohn J. Formulation Strategy for the Delivery of Cyclosporine A: Comparison of Two Polymeric Nanospheres. Sci Rep. 2015 Oct;5(1):13065.

214. Ramezanli T, Zhang Z, Michniak-Kohn BB. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2017 Jan;13(1):143–52.

215. Wu X, Price GJ, Guy RH. Disposition of Nanoparticles and an Associated Lipophilic Permeant following Topical Application to the Skin. Mol Pharm. 2009 Oct 5;6(5):1441–8.

216. Campbell CSJ, Contreras-Rojas LR, Delgado-Charro MB, Guy RH. Objective assessment of nanoparticle disposition in mammalian skin after topical exposure. J Controlled Release. 2012 Aug;162(1):201–7.

217. Smith A, Hunneyball lan M. Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. Int J Pharm. 1986 Jun 1;30(2):215–20.

218. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. Pharm Res. 2009 May;26(5):1025–58.

219. Akbuga J, Ozbas-Turan S, Ekentok C. Gene Suppression with Chitosan Nanoparticles. In: Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.

220. Hong H-J, Jin S-E, Park J-S, Ahn WS, Kim C-K. Accelerated wound healing by smad3 antisense oligonucleotides-impregnated chitosan/alginate polyelectrolyte complex. Biomaterials. 2008 Dec 1;29(36):4831–7.

221. Montero N, Alhajj MJ, Sierra M, Oñate-Garzon J, Yarce CJ, Salamanca CH. Development of Polyelectrolyte Complex Nanoparticles-PECNs Loaded with Ampicillin by Means of Polyelectrolyte Complexation and Ultra-High Pressure Homogenization (UHPH). Polymers. 2020 May 20;12(5):1168.

222. Müller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. Eur J Pharm Biopharm. 2000;17.

223. A. Dingler, R. P. Blum, H. Niehus,. Solid lipid nanoparticles (SLNTM/LipopearlsTM) a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. J Microencapsul. 1999 Jan;16(6):751–67.

224. Sala M, Diab R, Elaissari A, Fessi H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. Int J Pharm. 2018 Jan;535(1–2):1–17.

225. Desai P, Patlolla RR, Singh M. Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery. Mol Membr Biol. 2010 Oct;27(7):247–59.

226. Müller RH, Alexiev U, Sinambela P, Keck C. Nanostructured Lipid Carriers (NLC): The Second Generation of Solid Lipid Nanoparticles. In: Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016.

227. Jensen LB, Petersson K, Nielsen HM. In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin. Eur J Pharm Biopharm. 2011 Sep;79(1):68–75.

228. Natarajan J, Karri V, Anindita D. Nanostructured Lipid Carrier (NLC): A Promising Drug Delivery System. Glob J Nanomedicine. 2017 Apr;1:6.

229. Zhai Y, Zhai G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. J Controlled Release. 2014 Nov;193:90–9.

230. Viegas JSR, Praça FG, Caron AL, Suzuki I, Silvestrini AVP, Medina WSG, Del Ciampo JO, Kravicz M, Bentley MVLB. Nanostructured lipid carrier co-delivering tacrolimus and TNF-α siRNA as an innovate approach to psoriasis. Drug Deliv Transl Res. 2020 Jun 1;10(3):646–60.

231. Maghraby GMME, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? J Pharm Pharmacol. 2006;58(4):415–29.

232. Letchford K, Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur J Pharm Biopharm. 2007 Mar;65(3):259–69.

233. Guterres SS, Alves MP, Pohlmann AR. Polymeric Nanoparticles, Nanospheres and Nanocapsules, for Cutaneous Applications. Drug Target Insights. 2007 Jan;2:147–57.

234. Nafisi S, Maibach HI. Nanotechnology in Cosmetics. In: Cosmetic Science and Technology. Elsevier; 2017. p. 337–69.

235. Alvarez-Román R. Biodegradable polymer nanocapsules containing a sunscreen agent: preparation and photoprotection. Eur J Pharm Biopharm. 2001 Sep;52(2):191–5.

236. Simonnet J-T, Richart P, Aubrun O, L'alloret F. Nanoformulation des corps gras. Nanocapsules, nanoémulsions. Ol Corps Gras Lipides. 2004 Nov;11(6):448–53.

237. Zhang X, Zhang P. Polymersomes in Nanomedicine - A Review. Curr Nanosci. 2017 Feb 24;13(2):124–9.

238. Li S, Byrne B, Welsh J, Palmer AF. Self-Assembled Poly(butadiene)-b-Poly(ethylene oxide) Polymersomes as Paclitaxel Carriers. Biotechnol Prog. 2007;23(1):278–85.

239. Caon T, Porto LC, Granada A, Tagliari MP, Silva MAS, Simões CMO, Borsali R, Soldi V. Chitosan-decorated polystyrene-b-poly(acrylic acid) polymersomes as novel carriers for topical delivery of finasteride. Eur J Pharm Sci. 2014 Feb;52:165–72.

240. Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Guy RH, Fessi H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. J Controlled Release. 2004 Sep;99(1):53–62.

241. Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. Essential oils encapsulated in liposomes: a review. J Liposome Res. 2013 Dec;23(4):268–75.

242. Naeff R. Feasibility of topical liposome drugs produced on an industrial scale. Adv Drug Deliv Rev. 1996 Feb;18(3):343–7.

243. Mezei M, Gulasekharam V. Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. Life Sci. 1980 May 5;26(18):1473–7.

244. Gupta M, Goyal AK, Paliwal SR, Paliwal R, Mishra N, Vaidya B, Dube D, Jain SK, Vyas SP. Development and characterization of effective topical liposomal system for localized treatment of cutaneous candidiasis. J Liposome Res. 2010 Dec 1;20(4):341–50.

245. Raza K, Singh B, Lohan S, Sharma G, Negi P, Yachha Y, Katare OP. Nano-lipoidal carriers of tretinoin with enhanced percutaneous absorption, photostability, biocompatibility and anti-psoriatic activity. Int J Pharm. 2013 Nov 1;456(1):65–72.

246. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr. 1992 Feb;1104(1):226–32.

247. Morrow DIJ, McCarron PA, Woolfson AD, Donnelly RF. Innovative Strategies for Enhancing Topical and Transdermal Drug Delivery. Open Drug Deliv J. 2007;107(1):36–59.

248. Elsayed MMA, Abdallah OY, Naggar VF, Khalafallah NM. Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. Int J Pharm. 2007 Mar;332(1–2):1–16.

249. Guo J, Ping Q, Sun G, Jiao C. Lecithin vesicular carriers for transdermal delivery of cyclosporin A. Int J Pharm. 2000 Jan;194(2):201–7.

250. Trotta M, Peira E, Carlotti ME, Gallarate M. Deformable liposomes for dermal administration of methotrexate. Int J Pharm. 2004 Feb;270(1–2):119–25.

251. Cevc G. Transdermal Drug Delivery of Insulin with Ultradeformable Carriers: Clin Pharmacokinet. 2003;42(5):461–74.

252. Bahramizadeh M, Bahramizadeh M, Kiafar B, Jafarian AH, Nikpoor AR, Hatamipour M, Esmaily H, Rezaeemehr Z, Golmohammadzadeh S, Moosavian SA, Jafari MR. Development, characterization and evaluation of topical methotrexate-entrapped deformable liposome on imiquimod-induced psoriasis in a mouse model. Int J Pharm. 2019 Oct;569.

253. Choi MJ, Maibach HI. Elastic vesicles as topical/transdermal drug delivery systems. Int J Cosmet Sci. 2005;27(4):211–21.

254. Touitou E, Dayan N, Bergelson L, Godin B, Eliaz M. Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. J Controlled Release. 2000 Apr;65(3):403–18.

255. Dayan N, Touitou E. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. Biomaterials. 2000 Sep;21(18):1879–85.

256. Sakdiset P, Amnuaikit T, Pichayakorn W, Pinsuwan S. Formulation development of ethosomes containing indomethacin for transdermal delivery. J Drug Deliv Sci Technol. 2019 Aug;52:760–8.

257. Dubey V, Mishra D, Dutta T, Nahar M, Saraf DK, Jain NK. Dermal and transdermal delivery of an anti-psoriatic agent via ethanolic liposomes. J Controlled Release. 2007 Nov;123(2):148–54.

258. Lachenmeier DW. Safety evaluation of topical applications of ethanol on the skin and inside the oral cavity. J Occup Med Toxicol Lond Engl. 2008 Nov 13;3:26.

259. Muzzalupo R. Niosomes and Proniosomes for Enhanced Skin Delivery. In: Dragicevic N, Maibach HI, editors. Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement. Springer; 2016. p. 147–60.

260. Choi MJ, Maibach HI. Liposomes and Niosomes as Topical Drug Delivery Systems. Skin Pharmacol Physiol. 2005;18(5):209–19.

261. Wagh VD, Deshmukh OJ. Itraconazole Niosomes Drug Delivery System and Its Antimycotic Activity against Candida albicans. ISRN Pharm. 2012;2012:1–7.

262. Solanki AB, Parikh JR, Parikh RH, Patel MR. Evaluation of different compositions of niosomes to optimize aceclofenac transdermal delivery. Asian J Pharm Sci. 2010;5(87):87–95.

263. Manconi M, Sinico C, Valenti D, Lai F, Fadda AM. Niosomes as carriers for tretinoin. Int J Pharm. 2006 Mar;311(1–2):11–9.

264. Fang J-Y, Hong C-T, Chiu W-T, Wang Y-Y. Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. Int J Pharm. 2001 May;219(1–2):61–72.

265. Paolino D, Cosco D, Muzzalupo R, Trapasso E, Picci N, Fresta M. Innovative bola-surfactant niosomes as topical delivery systems of 5-fluorouracil for the treatment of skin cancer. Int J Pharm. 2008 Apr 2;353(1–2):233–42.

266. Singh TG, Sharma N. Nanobiomaterials in cosmetics: current status and future prospects. In: Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics. Elsevier; 2016. p. 149–74.

267. Kaler E, Murthy A, Rodriguez B, Zasadzinski J. Spontaneous vesicle formation in aqueous mixtures of single-tailed surfactants. Science. 1989 Sep 22;245(4924):1371–4.

268. Blanzat M, Perez E, Rico-Lattes I, Prome D, Prome JC, Lattes A. New Catanionic Glycolipids. 1. Synthesis, Characterization, and Biological Activity of Double-Chain and Gemini Catanionic Analogues of Galactosylceramide (galβ1cer). Langmuir. 1999 Sep 1;15(19):6163–9.

269. Soussan E, Mille C, Blanzat M, Bordat P, Rico-Lattes I. Sugar-Derived Tricatenar Catanionic Surfactant: Synthesis, Self-Assembly Properties, and Hydrophilic Probe Encapsulation by Vesicles. Langmuir. 2008 Mar;24(6):2326–30.

270. Bramer T, Dew N, Edsman K. Pharmaceutical applications for catanionic mixtures. J Pharm Pharmacol. 2007 Oct;59(10):1319–34.

271. Dhawan VV, Nagarsenker MS. Catanionic systems in nanotherapeutics – Biophysical aspects and novel trends in drug delivery applications. J Controlled Release. 2017 Nov;266:331–45.

272. Liu Y-S, Wen C-F, Yang Y-M. Development of ethosome-like catanionic vesicles for dermal drug delivery. J Taiwan Inst Chem Eng. 2012 Nov;43(6):830–8.

273. Dew N, Bramer T, Edsman K. Catanionic aggregates formed from drugs and lauric or capric acids enable prolonged release from gels. J Colloid Interface Sci. 2008 Jul;323(2):386–94.

274. Dew N, Edsman K, Björk E. Novel gel formulations with catanionic aggregates enable prolonged drug release and reduced skin permeation: Gel formulations with catanionic aggregates. J Pharm Pharmacol. 2011 Oct;63(10):1265–73.

275. Dew N, Edwards K, Eriksson J, Edsman K, Björk E. Gel formulations containing catanionic vesicles composed of alprenolol and SDS: Effects of drug release and skin penetration on aggregate structure. Colloids Surf B Biointerfaces. 2012 Jan;89:53–60.

276. Richard K, Mann BJ, Stocker L, Barry EM, Qin A, Cole LE, Hurley MT, Ernst RK, Michalek SM, Stein DC, DeShong P, Vogel SN. Novel Catanionic Surfactant Vesicle Vaccines Protect against Francisella tularensis LVS and Confer Significant Partial Protection against F. tularensis Schu S4 Strain. Clin Vaccine Immunol CVI. 2014 Feb;21(2):212–26.

277. Tah B, Pal P, Mahato M, Talapatra GB. Aggregation Behavior of SDS/CTAB Catanionic Surfactant Mixture in Aqueous Solution and at the Air/Water Interface. J Phys Chem B. 2011 Jul 7;115(26):8493–9.

278. Rico-Lattes I, Blanzat M, Franceschi-Messant S, Perez É, Lattes A. Catanionic sugar derived surfactants, polymers and dendrimers: from molecules to targeted self-organized systems. Comptes Rendus Chim. 2005 May;8(5):807–14.

279. Consola S, Blanzat M, Perez E, Garrigues J-C, Bordat P, Rico-Lattes I. Design of Original Bioactive Formulations Based on Sugar–Surfactant/Non-steroidal Anti-inflammatory

Catanionic Self-Assemblies: A New Way of Dermal Drug Delivery. Chem - Eur J. 2007 Apr 5;13(11):3039–47.

280. Bize C, Garrigues J-C, Corbet J-P, Rico-Lattes I, Blanzat M. Bioactive Formulations with Sugar-Derived Surfactants: A New Approach for Photoprotection and Controlled Release of Promethazine. ChemPhysChem. 2013 Apr 15;14(6):1126–31.

281. Consola S, Blanzat M, Rico-Lattes I, Perez E, Bordat P. Intermolecular association complex of a carrier and of an active principle. Patent n° 0507856, 2007.

282. Bize C, Blanzat M, Perez E, Rico-Lattes I. Cooperative conveyance of basic active principles by amphiphilic acid molecules. Patent n°8895518, 2012.

283. Castagnos P. Vésicules catanioniques: design et mécanismes de délivrance de principes actifs [Thèse]. Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2011.

284. Mauroy C, Castagnos P, Orio J, Blache M-C, Rico-Lattes I, Teissié J, Rols M-P, Blanzat M. Versatile Cellular Uptake Mediated by Catanionic Vesicles: Simultaneous Spontaneous Membrane Fusion and Endocytosis. Mol Pharm. 2015 Jan 5;12(1):103–10.

285. Castagnos P, Siqueira-Moura MP, Goto PL, Perez E, Franceschi S, Rico-Lattes I, Tedesco AC, Blanzat M. Catanionic vesicles charged with chloroaluminium phthalocyanine for topical photodynamic therapy. In vitro phototoxicity towards human carcinoma and melanoma cell lines. RSC Adv. 2014 Aug 11;4(74):39372.

286. Boudier A, Castagnos P, Soussan E, Beaune G, Belkhelfa H, Ménager C, Cabuil V, Haddioui L, Roques C, Rico-Lattes I, Blanzat M. Polyvalent catanionic vesicles: Exploring the drug delivery mechanisms. Int J Pharm. 2011 Jan;403(1–2):230–6.

287. Mauroy C, Castagnos P, Blache M-C, Teissié J, Rico-Lattes I, Rols M-P, Blanzat M. Interaction between GUVs and catanionic nanocontainers: new insight into spontaneous membrane fusion. Chem Commun. 2012;48(53):6648.

288. Richard C, Souloumiac E, Jestin J, Blanzat M, Cassel S. Influence of dermal formulation additives on the physicochemical characteristics of catanionic vesicles. Colloids Surf Physicochem Eng Asp. 2018 Dec;558:373–83.

289. Richard C. Formulation de vésicules catanioniques pour l'administration topique de principes actifs [Thèse]. Université Toulouse III-Paul Sabatier; 2018.

290. Zeta Potential theory. In: Zetasizer Nano Series User Manual. 2004. p. 15.1-15.12.

291. Geißler D, Gollwitzer C, Sikora A, Minelli C, Krumrey M, Resch-Genger U. Effect of fluorescent staining on size measurements of polymeric nanoparticles using DLS and SAXS. Anal Methods. 2015;7(23):9785–90.

292. Demetzos C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability. J Liposome Res. 2008 Jan;18(3):159–73.

293. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari MR. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics. 2018 Jun;10(2):57.

294. Tah B, Pal P, Talapatra GB. Interaction of insulin with SDS/CTAB catanionic Vesicles. J Lumin. 2014 Jan 1;145:81–7.

295. Kohli AK, Alpar HO. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: effect of particle size and charge. Int J Pharm. 2004 May 4;275(1):13–7.

296. Gillet A, Compère P, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour. Int J Pharm. 2011 Jun 15;411(1):223–31.

297. Sinico C, Manconi M, Peppi M, Lai F, Valenti D, Fadda AM. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. J Controlled Release. 2005 Mar 2;103(1):123–36.

298. Yang G, Wu F, Chen M, Jin J, Wang R, Yuan Y. Formulation design, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of nanostructured lipid carriers containing a bile salt for oral delivery of gypenosides. Int J Nanomedicine. 2019;14:2267–80.

299. 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 Oct;28(5):359–70.

300. Ohman H, Vahlquist A. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. Acta Derm Venereol. 1994;74(5):375–9.

301. Ohman H, Vahlquist A. The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the “acid skin mantle”? J Invest Dermatol. 1998 Oct;111(4):674–7.

302. Buraczewska I. 16 Outside and Inside Skin pH. :9.

303. Castangia I, Manca ML, Matricardi P, Sinico C, Lampis S, Fernàndez-Busquets X, Fadda AM, Manconi M. Effect of diclofenac and glycol intercalation on structural assembly of phospholipid lamellar vesicles. Int J Pharm. 2013 Nov 1;456(1):1–9.

304. Abd E, Yousef SA, Pastore MN, Telaprolu K, Mohammed YH, Namjoshi S, Grice JE, Roberts MS. Skin models for the testing of transdermal drugs. Clin Pharmacol Adv Appl. 2016 Oct 19;8:163–76.

305. Dick IP, Scott RC. Pig Ear Skin as an In-vitro Model for Human Skin Permeability. J Pharm Pharmacol. 1992;44(8):640–5.

306. Herkenne C, Naik A, Kalia YN, Hadgraft J, Guy RH. Pig Ear Skin ex Vivo as a Model for in Vivo Dermatopharmacokinetic Studies in Man. Pharm Res. 2006 Aug;23(8):1850–6.

307. Jung EC, Maibach HI. Animal models for percutaneous absorption. J Appl Toxicol. 2015;35(1):1–10.

308. Debeer S, Le Luduec J-B, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas J-F, Dubois B, Kanitakis J. Comparative histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin. Eur J Dermatol. 2013 Jul;23(4):456–66.

309. Lademann J, Richter H, Meinke M, Sterry W, Patzelt A. Which Skin Model Is the Most Appropriate for the Investigation of Topically Applied Substances into the Hair Follicles? Skin Pharmacol Physiol. 2010;23(1):47–52.

310. Franz TJ. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. J Invest Dermatol. 1975 Mar 1;64(3):190–5.

311. Finnin B, Walters KA, Franz TJ. In Vitro Skin Permeation Methodology. In: Topical and Transdermal Drug Delivery. John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 85–108.

312. Barbero AM, Frasch HF. Effect of Frozen Human Epidermis Storage Duration and Cryoprotectant on Barrier Function using Two Model Compounds. Skin Pharmacol Physiol. 2016;29(1):31–40.

313. Harrison SM, Barry BW, Dugard PH. Effects of freezing on human skin permeability. J Pharm Pharmacol. 1984;36(4):261–2.

314. Gordon CJ. The mouse thermoregulatory system: Its impact on translating biomedical data to humans. Physiol Behav. 2017 Oct 1;179:55–66.

315. Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin. Skin Res Technol Off J Int Soc Bioeng Skin ISBS Int Soc Digit Imaging Skin ISDIS Int Soc Skin Imaging ISSI. 2007 Feb;13(1):19–24.

316. Lin Y-K, Yang S-H, Chen C-C, Kao H-C, Fang J-Y. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. Simon M, editor. PLOS ONE. 2015 Sep 10;10(9):e0137890.

317. Sun L, Liu Z, Lin Z, Cun D, Tong H, Yan R, Wang R, Zheng Y. Comparison of normal versus imiquimod-induced psoriatic skin in mice for penetration of drugs and nanoparticles. Int J Nanomedicine. 2018 Sep;Volume 13:5625–35.

318. Beaune G, Soussan E, Blanzat M, Rico-Lattes I, Cabuil V, Ménager C. Interaction between catanionic vesicles and giant magnetic vesicles. Comptes Rendus Chim. 2009 Jan 1;12(1):38–44.

319. Ielasi F, Ledall J, Anes AP, Fruchon S, Caminade A-M, Poupot R, Turrin C-O, Blanzat M. Influence of PPH dendrimers' surface functions on the activation of human monocytes: a study of their interactions with pure lipid model systems. Phys Chem Chem Phys. 2016;18(31):21871–80.

320. Schön MP, Manzke V, Erpenbeck L. Animal models of psoriasis-highlights and drawbacks. J Allergy Clin Immunol. 2020 Jun;

321. Jardet C, David A, Braun E, Descargues P, Grolleau J-L, Hebsgaard J, Norsgaard H, Lovato P. Development and characterization of a human Th17-driven ex vivo skin inflammation model. Exp Dermatol. 2020;00(1):11.

322. Yang L, Wu L, Wu D, Shi D, Wang T, Zhu X. Mechanism of transdermal permeation promotion of lipophilic drugs by ethosomes. Int J Nanomedicine. 2017 Apr;Volume 12:3357–64.

323. Sterenborg HJCM, Motamedi M, Wagner RF, Duvic M, Thomsen S, Jacques SL. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours. Lasers Med Sci. 1994 Sep 1;9(3):191–201.

324. Brun A, Etemad-Moghadam G. New Double-Chain and Aromatic (α-Hydroxyalkyl)phosphorus Amphiphiles. Synthesis. 2002 Jul;2002(10):1385–90.