

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2021-2022

N° 97

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Hoang Truc Phuong NGUYEN

...

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 13 décembre 2022

Utilisation des solvants eutectiques profonds dans le développement de médicaments
à visée cutanée

JURY

Président : Mme BOUDESOCQUE-DELAYE Leslie, Professeur, Pharmacien, Faculté de Pharmacie de Tours

Membres :

Mme MUNNIER Emilie, Professeur, Pharmacien, Faculté de Pharmacie de Tours

M. GOMBAULT Louis-Nicolas, Ingénieur, Pharmacien, Novéal (groupe L'Oréal) au Thillay

ANNEE : 2022 - 2023

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAUDAU, Mme Claire POUPLARD

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAJE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

36 MAITRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAJE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

POUPIN	Pierre	BIOSTATISTIQUES ET SANTE PUBLIQUE
RAMDANI	Yanis	IMMUNOLOGIE
TULOU	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

3 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

AMRANE	Dyha	CHIMIE ORGANIQUE
MEHENNI	Lyes	CHIMIE ANALYTIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
GERBIER (contrat enseig)	Soledad	ANGLAIS

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury pour avoir pris de leur temps pour évaluer mon travail.

Je remercie Madame le Professeur Leslie Boudesocque-Delaye pour ses précieux conseils d'expert et sa participation au jury en qualité de président.

Je remercie Monsieur le Pharmacien Louis-Nicolas Gombault d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame le Professeur Emilie Munnier pour sa disponibilité et le temps qu'elle a consacré à m'accompagner tout au long de l'élaboration de la thèse. Sa vision de qualité et sa rigueur dans la recherche m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci de m'avoir soutenue pendant toutes ces années.

Un grand merci au Docteur Simone Cohen-Jonathan pour son soutien constant et sa grande générosité qui m'ont accompagnée tout au long de mon parcours.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble du personnel de la faculté de Pharmacie et de l'université de Tours pour m'avoir donné la chance d'effectuer mes études dans les meilleures conditions.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à tous mes enseignants et à tous ceux qui m'ont guidée tout au long de mes études en me transmettant leurs précieuses connaissances pour l'exercice du métier de chercheur puis de pharmacien.

Merci à tous mes amis pour leur présence, leur soutien et les bons moments partagés ensemble.

Mes sincères remerciements à ma famille et à ma belle-famille, ma belle-mère particulièrement, pour leur soutien réconfortant et inestimable qui m'accompagne tout au long de ma vie.

J'adresse ma plus profonde reconnaissance à mes parents pour leur amour immense, leur soutien infini et leur sacrifice inconditionnel pour me donner les meilleures conditions dans la vie.

Un profond remerciement pour mon mari, mon cœur, d'être venu dans ma vie et d'être là à mes côtés.

Merci du fond du cœur à ma fille, ma source de bonheur, mon amour, ma vie.

Table des matières

Introduction générale.....	8
Partie 1 Problématique du développement des produits à visée cutanée	11
1. La peau : première barrière pour l'administration des actifs pharmaceutiques et cosmétiques	11
1.1. Histologie – anatomie de la peau	12
1.2. Physiologie de la peau	19
1.2.1. Fonction barrière.....	19
1.2.2. Fonction immunitaire et hormonale	19
1.2.3. Thermorégulation	20
1.2.4. Fonction hormonale	20
1.2.5. Barrière autoréparatrice	20
2. La peau : modalités de pénétration cutanée des actifs pharmaceutiques (API) et/ou cosmétiques (ACI).....	21
Partie 2 Solvants eutectiques profonds : définitions, méthodes d'obtention et caractérisations physicochimiques	24
1. Définitions.....	24
2. Méthodes d'obtention des solvants eutectiques	27
2.1. Composants.....	27
2.2. Méthodes d'obtention	28
3. Introduction des molécules d'intérêt dans les DES : applications et méthodes	31
3.1. Intérêt de l'utilisation de DES comme solvant de dissolution des API/ACI	31
3.2. Méthodes d'introduction de l'actif dans les DES	33
4. Caractérisations physicochimiques des DES	33
4.1. Propriétés physicochimiques des solvants eutectiques	33
4.2. Caractérisations de la matrice eutectique et son comportement thermique	36

4.3. Dosage de l'actif incorporé dans les DES.....	37
Partie 3 Utilisation des solvants eutectiques profonds en cosmétologie et dermatologie	38
1. Tolérance cutanée des DES.....	38
2. Effet des DES sur la pénétration cutanée des substances actives	42
3. Effets pharmacologiques des actifs incorporés dans les DES.....	44
3.1. Développement de formulations à visée antimicrobienne	44
3.2. Développement de formulations à visée anti-inflammatoire	49
3.3. Développement de formulations à visée antioxydante	50
4. Développement de produits finis pharmaceutiques ou cosmétiques à base de NaDES	51
Conclusion générale	55

Introduction générale

La peau est le premier rempart du corps contre les agressions venues de l'extérieur comme le chaud, le froid, la pollution, l'exposition au soleil, des micro-organismes pathogènes... Elle peut être affectée par des maladies spécifiques qui vont d'une part influencer la santé générale de l'individu et d'autre part nuire aux relations sociales. Il existe une flore cutanée de surface constituée de nombreux micro-organismes non-pathogènes (le microbiote cutané). En cas de traumatisme ou déséquilibre, ils peuvent provoquer des infections, souvent à cause des streptocoques et des staphylocoques, comme l'impétigo, l'érysipèle, la folliculite... Des agents pathogènes peuvent également être viraux ou fongiques, ce qui entraîne des verrues, l'herpès, des dermatophyties... L'inflammation est une autre cause et fait partie de l'origine des dermatoses comme la dermatite atopique ou l'acné.

Les produits à base d'actifs hydrophobes restent un grand défi pour l'industrie pharmaceutique à l'heure actuelle. Pour la voie locale topique, cela est dû à la faible perméabilité de la barrière cutanée vis-à-vis des substances actives. Pour la voie systémique, cela est en général dû à la faible solubilité des molécules actives dans les milieux aqueux, ce qui contribue à la faible absorption par le tractus gastro-intestinal et à la faible biodisponibilité due à l'effet de premier passage hépatique rapide, ce qui limite son application par voie orale. La voie transdermique pourrait être une bonne stratégie pour véhiculer ces actifs. Parmi des véhicules potentiels, les solvants eutectiques profonds semblent être l'un des moyens les plus prometteurs, non seulement dans le traitement des maladies locales cutanées mais aussi dans la prise en charge par voie générale transcutanée de certaines pathologies, du fait des multiples propriétés de ces solvants de nouvelles génération en matière de solubilisation des substances actives peu solubles dans l'eau ou les huiles, de stabilisation de ces substances et d'augmentation de la diffusion cutanée.

Les solvants eutectiques profonds (DES) sont développés depuis les années 2000 comme une nouvelle génération de liquides ioniques, composés d'un accepteur de liaisons hydrogène, généralement le chlorure de choline ou la bétaine, et d'un donneur de liaisons hydrogène, principalement des sucres ou des polyols. Leur mélange, à un ratio molaire donné, forme un réseau de liaisons hydrogène entraînant l'abaissement du point de fusion du mélange solide qui devient liquide à température ambiante (1). Ce phénomène avait déjà été observé de longue date

lors de la formulation de produits pharmaceutiques, notamment les eutectiques camphre-menthol ou thymol-menthol-salol dans diverses préparations magistrales, mais le mécanisme sous-jacent n'a été exploré que récemment. Nyqvist-Mayer et ses collègues ont étudié en 1986 la libération *in vitro* du système eutectique composé de lidocaïne/prilocaine (1 : 1 masse/masse) (2). Leurs résultats prometteurs ont constitué la base d'études plus approfondies confirmant la meilleure pénétration cutanée de ces molécules grâce à ce système, ce qui a donné lieu à la commercialisation du premier produit eutectique pharmaceutique : la crème Emla®. (3)

Pendant ces 5 dernières années, les solvants eutectiques profonds ont fait l'objet de plusieurs études dans de nombreux domaines pour la substitution de solvants toxiques en chimie organique, pour l'extraction de molécules à haute valeur ajoutée issues des biomasses le tout pour une approche durable des processus. L'industrie dermo-cosmétique utilise le concept de NaDES (solvants eutectiques profonds naturels) défini par Dai et al. en 2013 (4) comme alternative durable aux solvants d'extraction toxiques. En parallèle, de nombreuses études ont démontré l'intérêt de certains solvants eutectiques profonds dans la solubilisation de molécules actives mais aussi l'utilisation comme activateurs de pénétration cutanée ou accélérateurs de cicatrisation (3,5,6). Malgré des ingrédients récents développés par Gattefossé (Gatuline® Lift'n'link) ou Naturex (Eutectys®), le transfert vers l'industrie est freiné par deux éléments majeurs : (i) L'inclusion en formulation : contrairement aux solvants d'extraction classiques qui sont volatils, NaDES ne peuvent pas être évaporés et peuvent difficilement être séparés des molécules d'intérêt. Ils feront partie du produit final. Par conséquent, la composition de NaDES doit être conforme à la réglementation cosmétique (par exemple, le chlorure de choline est interdit dans un produit cosmétique) et compatible avec les autres ingrédients de la formule, (ii) Il y a un manque de description de leurs mécanismes d'action/ formulation/ innocuité/ propriétés physicochimiques et biologiques.

Cette thèse consiste en une étude bibliographique résumant les publications sur les solvants eutectiques profonds à visée cutanée des 10 dernières années. Elle est divisée en trois parties :

- Une première partie abordant la problématique du développement des produits dermo-cosmétiques à travers la peau ;
- Une deuxième partie où nous résumons les différentes méthodes d'incorporation des molécules actives dans les systèmes DES à visée cutanée avec leurs caractérisations physico-chimiques afin de mieux comprendre ces systèmes eutectiques.
- Dans la troisième partie, la tolérance cutanée des solvants eutectiques profonds est discutée avant l'évaluation *in vitro* et *ex vivo* du potentiel de ces solvants dans l'amélioration de la pénétration cutanée des actifs ainsi que leurs effets pharmacologiques (antimicrobien, anti-inflammatoire et antioxydant). Les études biologiques sur les produits finis pharmaceutiques et cosmétiques contenant des DES sont également présentées dans ce chapitre.
- Enfin, une conclusion générale suivie par les perspectives clôture l'ensemble de la revue.

Partie 1

Problématique du développement des produits à visée cutanée

1. La peau : première barrière pour l'administration des actifs pharmaceutiques et cosmétiques

La peau « miroir de l'âme » (Claude Benazeraf) est la première barrière de défense de l'organisme. Il s'agit du système tégumentaire qui fait l'interface entre le milieu extérieur et intérieur du corps. Cet organe remarquable, à la fois le plus lourd (12-15% du poids du corps) et le plus étendu (2 m² environ) héberge deux types d'annexes : les phanères (ongles et poils) et des glandes (glandes sudoripares eccrines et apocrines et glandes sébacées généralement associées aux poils) (7).

La peau est plus ou moins épaisse selon la localisation : très fine au niveau du visage (les paupières en particulier), épaisse au niveau de plante des mains et des pieds, aisselles ou périnée. Outre son rôle d'enveloppe, elle participe aux processus physiologiques et pathologiques locaux et généraux du corps. Ses nombreuses fonctions et sa grande surface attirent de plus en plus d'attentions dans le développement de molécules pharmaceutiques en tant que cible thérapeutique d'intérêt.

Dans un objectif thérapeutique, la peau peut être considérée comme l'organe cible. Il s'agit alors de traiter des pathologies locales ou dermatoses, des blessures superficielles telles que les plaies ou les brûlures. C'est la voie de traitement cutané ou dermique.

La peau peut aussi servir de passage intermédiaire. En effet, sa surface d'échange étendue peut être utilisée comme une voie d'administration alternative efficace pour le traitement de pathologies systémiques type antalgiques ou insuline. Dans ce cas on parle de voie transcutanée ou transdermique.

1.1. Histologie – anatomie de la peau

Au plan histologique la peau est constituée de trois couches superposées : le plus externe est l'épiderme, qui repose sur le tissu intermédiaire qui est le derme, lui-même reposant sur l'hypoderme qui est la couche la plus profonde et proche des muscles (figure 1).

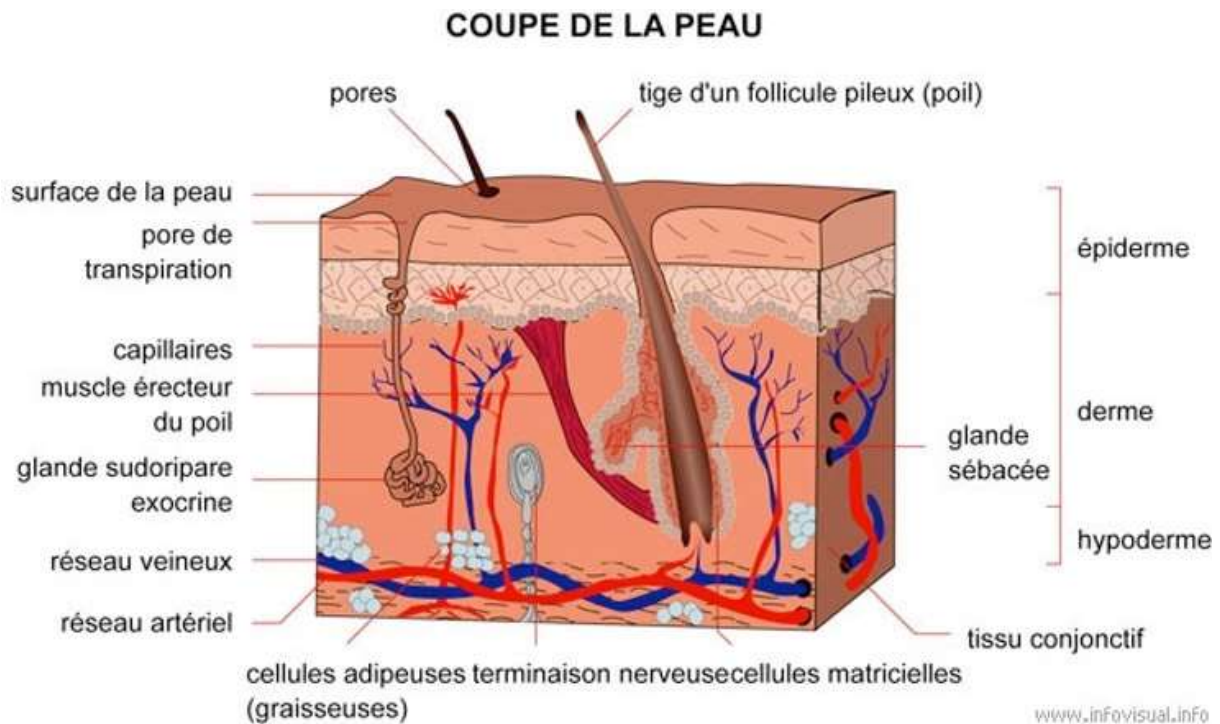


Figure 1. Structure générale de la peau humaine normale et ses annexes. D'après le site : <https://infovisual.info/fr/corps-humain/peau>, consulté le 27/11/2022. (8)

1.1.1. L'épiderme (Figure 2) est un épithélium de revêtement pavimenteux, stratifié, kératinisé avec l'épaisseur variant entre 1,5 mm (au niveau palmo-plantaire) et 0,05 mm (au niveau de paupières). Cette partie est constituée de quatre types de cellules: les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel répartis en plusieurs couches superposées (9).

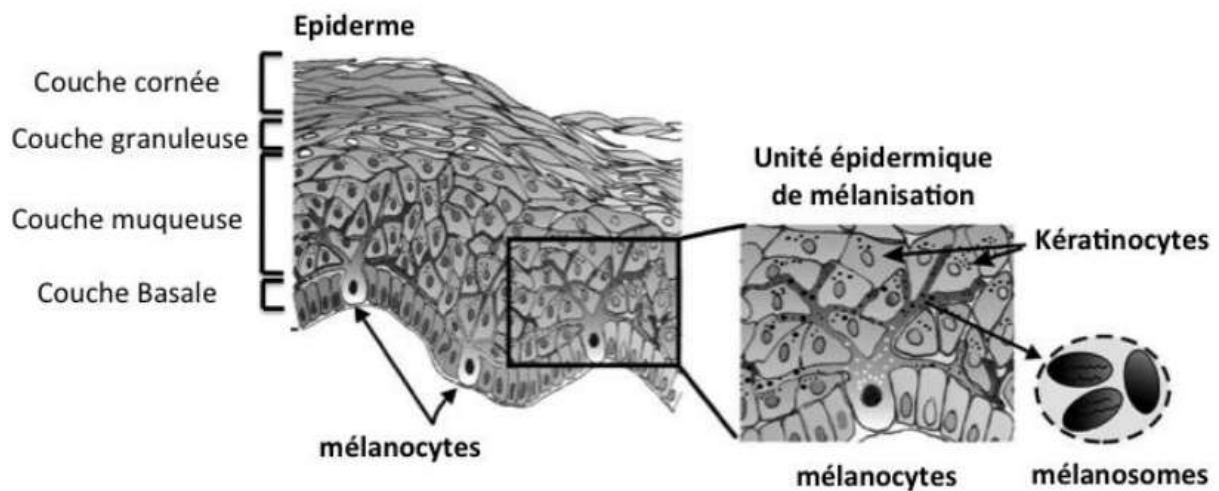


Figure 2. Schéma de différentes couches de l'épiderme. Adapté de Cichorek et al., 2013 (10) par Allouche et al. (11)

Les différentes couches se distinguent de la profondeur vers la surface :

- La couche basale de cellules germinatives (*stratum germinativum*) est une monocouche de cellules kératinocytes, dont le cytoplasme est riche en organites cellulaires et en mélanosomes. Chaque kératinocyte se divise en deux cellules filles identiques, l'une restant sur place, l'autre migrant vers les couches supérieures en se différenciant. A ce stade débute la synthèse de kératine (ou la kératinisation). Les mélanosomes sont quant à eux synthétisés par un autre type de cellules - les mélanocytes - qui sont des cellules de grande taille qui s'infiltrant entre les kératinocytes. Un mélanocyte est en communication avec une quarantaine de kératinocytes environnants pour y délivrer les grains de mélanosomes, ce qui constitue une unité épidermique de mélanisation. La mélanisation consiste à la synthèse de mélanine à partir de la tyrosine par les mélanosomes puis la coloration de la mélanine dans les kératinocytes. En effet, la mélanine est capturée par les kératinocytes et s'accumule sur la face supérieure (qui est exposée à la lumière) pour absorber les rayons ultraviolets (UV) et les détruire avant qu'ils endommagent l'ADN. Ce processus de mélanisation dépend de la longueur d'onde du rayonnement UV. Les rayons UVB (290-320 nm) stimulent eux-mêmes la prolifération de mélanocytes et la production de mélanine, ce qui est responsable de la coloration et de la photo-protection durable de la peau (12). Une coloration immédiate et persistante de la peau est provoquée par une exposition UVA (320-400 nm), liée à l'oxydation de la mélanine, et participe au risque de cancers cutanés par l'effet mutagène des UVA (13).

- La couche du corps muqueux de Malpighi ou cellules épineuses (*stratum spinosum*), disposées en quatre à cinq couches, ce sont des kératinocytes volumineux s'aplatissant progressivement vers les couches superficielles. Ils présentent une forme irrégulière et sont reliés entre eux par de nombreux desmosomes, ce qui leur donne une forme épineuse. Les desmosomes permettent une grande cohésion entre les cellules et sont responsables de la résistance mécanique de cette couche cellulaire. Leur noyau est gros et clair, on y trouve de nombreux ribosomes impliqués dans la synthèse de kératine. A partir des monomères qui se dimérisent, le processus de kératinisation se poursuit par la dimérisation des dimères pour former des tétramères, puis la formation des octamères par la suite, et enfin la polymérisation en filaments intermédiaires capables de former de très longs filaments de protéines fibreuses. Il existe plusieurs isoformes de kératines (environ 54 selon les tissus) mais elles sont toutes riches en cystéine, ce qui permet la formation de ponts disulfures qui eux-mêmes rendent les longs filaments résistants et insolubles dans l'eau.

- La couche granuleuse (*stratum granulosum*), formée d'une à cinq couches de kératinocytes polygonaux aplatis. Ces cellules ont toujours des noyaux mais très peu d'organites (mitochondries, lysosomes...). Leur cytoplasme est rempli de nombreux grands granules de forme irrégulière sans membrane de kératohyaline et kératinosomes ou corps lamellaires d'Odland. Les granules sont constitués de filaggrine et d'autres protéines liées aux kératines ; alors que les corps lamellaires contiennent des lipides (des glucosylcéramides, des phospholipides et du cholestérol) qui sont les précurseurs des céramiques, des acides gras libres et du cholestérol dans l'espace intercellulaire à l'interface *stratum granulosum/stratum corneum*. L'adhésion des cellules entre elles est encore renforcée dans cette couche granuleuse.

- La couche claire (*stratum lucidum*) constituée de plusieurs assises de cellules plates et claires. Très homogène, cette couche n'est retrouvée que dans la peau très épaisse de la paume des mains et des pieds.

- La couche cornée (*stratum corneum*), selon la localisation, elle est formée de quatre à vingt couches de cellules anucléées aplaties kératinisées. Ce sont des cornéocytes. Ces cellules ont perdu leurs organites cellulaires et sont remplies uniquement de filaments de kératine. La membrane plasmique est épaisse et doublée dans l'espace intercellulaire d'une couche lipidique. On peut différencier deux sous-couches, la couche granuleuse compacte qui fait suite à la couche où les cellules sont étroitement soudées, et au-dessus

la couche desquamante. Les nouveaux cornéocytes remplacent en continu les cellules qui se détachent. Physiologiquement la desquamation intervient trois semaines environ après la migration du cornéocyte. Les cornéocytes contiennent aussi un mélange de substances hygroscopiques, nommées facteurs naturels d'hydratation (NMF : natural moisturizing factors). Les NMF sont les produits de transformation enzymatique de la filaggrine, composés principalement d'acides aminés libres. Leur rôle est de maintenir l'hydratation dans la couche cornée de l'épiderme et d'éviter ainsi la perte en eau de l'organisme.

Les kératinocytes se migrent de la couche basale vers la surface, subissant des modifications structurales et biochimiques dont la plus fondamentale est la kératinisation décrite dans le paragraphe de la couche *stratum spinosum*.

Deux autres catégories de cellules sont présentes dans l'épiderme :

- Les cellules de Langerhans qui constituent 2 à 5% de la population des cellules épidermiques. Elles sont localisées au niveau de la couche de Malpighi essentiellement. Ce sont des cellules mobiles qui ont un rôle de présentation de l'antigène aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques initiant ainsi réponse immune.
- Les cellules de Merkel qui possèdent des granules arrondis. Ce sont des cellules à fonction sécrétoire. Elles sont associées à des terminaisons nerveuses amyéliniques et ont un rôle dans le toucher.

L'épiderme est lui-même recouvert d'un film hydrolipidique, formé de produits issus de la kératinisation épidermique, des sécrétions sudorale (sueur) et sébacée (sébum). Ce film constitue une émulsion eau dans huile stabilisée par les stérols qui font partie des lipides du ciment intercellulaire. Il participe au maintien de l'hydratation et du pH acide (physiologiquement situé entre 5 et 6) de la peau. Grâce à son pH acide, le film hydrolipidique contribue à la fonction barrière cutanée antibactérienne et antifongique.

Un microbiote cutané de surface est également présent à la surface de l'épiderme, avec de nombreuses espèces microbiennes organisées en communautés complexes. La densité de ces communautés est estimée à 1 million de bactéries/cm² et sa composition varie en fonction de différents endroits du corps. Dix-neuf phylum ont été découverts dans le microbiote cutané, dont les principaux sont les Actinobactéries (51,8 %), les Firmicutes (24,4 %), les Protéobactéries (16,5 %) et les Bacteroidetes (6,3 %) (14). Au niveau du genre, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* et *Staphylococcus* sont les plus fréquemment identifiés. Il a été suggéré que les micro-organismes commensaux et pathogènes jouent un rôle important dans la pathogenèse des affections cutanées inflammatoires (15). Les études récentes ont démontré que les métabolites microbiens commensaux contribuent à l'homéostasie locale par leur influence sur l'expression des gènes de la cellule hôte (16). Le déséquilibre entre le microbiome et l'hôte peut conduire à un environnement pro-inflammatoire et au développement d'une maladie clinique (17). L'état inflammatoire de la peau est souvent dû à des modifications au niveau du nombre total d'espèces bactériennes ainsi que la composition des micro-organismes. La perturbation de l'homéostasie normale du microbiome peut donc provoquer la dermatite atopique et l'acné vulgaire.(18)

1.1.2. Le derme est un tissu fibreux et élastique, plusieurs fois plus épais que l'épiderme. La jonction dermo-épidermique constituée du tissu de soutien le relie à l'épiderme. Contrairement à l'épiderme, le derme est richement vascularisé (avec des vaisseaux sanguins et des vaisseaux lymphatiques), son rôle essentiel étant la nutrition, et aussi la thermorégulation grâce à la dilatation ou la constriction vasculaire. C'est un réservoir d'eau pour l'organisme. Il possède en plus des fonctions de protection mécanique et immunitaire. On trouve dans le derme des fibres nerveuses et des récepteurs sensoriels : douleur, température, toucher. Il contient des annexes cutanées (glandes sudoripares, glandes sébacées et les follicules pileux). Outre la jonction dermo-épidermique, deux couches peuvent y être observées : le derme papillaire au contact de l'épiderme et le derme réticulaire.

a) La jonction dermo-épidermique : située entre l'épiderme et le derme. D'une épaisseur de 50 à 80 nm, elle est appelée lame basale ou membrane basale. C'est une ligne homogène, ondulée et fine. Cette ondulation est due aux crêtes épidermiques, partie de l'épiderme qui plonge dans le derme ; et aux papilles dermiques, partie du derme qui se prolonge dans l'épiderme. Les kératinocytes de la couche germinative sont liés à cette lame par des hémidesmosomes. Du côté du derme, ce sont des fibres spécifiques qui

piègent celles du collagène de la couche supérieure du derme, grâce à des plaques d'ancrage. Cette jonction dermo-épidermique assure la cohésion entre le derme et l'épiderme, elle a une fonction mécanique de soutien. De plus elle permet de filtrer les molécules (eau, électrolytes, éléments nutritifs, métabolites...) entre ces deux parties de la peau. Enfin, elle contrôle des signaux entre l'épiderme et le derme.

b) Le derme papillaire : c'est la couche des papilles dermiques ou la couche sous épithéliale, replis du derme dans l'épiderme qui permettent d'augmenter la surface d'échanges entre les deux tissus, mais également d'assurer une meilleure cohésion entre ceux-ci. Très vascularisée, cette partie du derme permet d'apporter de l'oxygène, des hormones, des facteurs de croissance, les nutriments nécessaires aux couches profondes de l'épiderme et d'éliminer le CO₂ et les déchets. De nombreuses fibres de collagène entrelacées sont disposées de façon perpendiculaire ou oblique à l'épiderme. Les fibres élastiques remontent jusqu'à la jonction dermo-épidermique. Les cellules, fibroblastes, sont nombreuses.

c) Le derme réticulaire : c'est la majeure partie du derme (environ 80% de son épaisseur). Il est formé d'un tissu conjonctif dense irrégulier et est directement en rapport avec l'hypoderme, grâce aux vaisseaux sanguins qui relient les plexus sous-papillaires et cutanés des deux régions de la peau. Ces vaisseaux participent, en plus des échanges de gaz et de nutriments, à la thermorégulation. Les fibres de collagène sont ici denses et orientées de façon parallèle à la surface de l'épiderme. Les fibres élastiques sont également disposées parallèlement à la jonction dermo-épidermique. Les cellules y sont peu nombreuses.

L'épaisseur du derme varie énormément en fonction de la région du corps (de 1 à 4 mm), elle est maximale au niveau du dos, et minimale au niveau des paupières.

Les fibroblastes, cellules principales du derme, participent à la synthèse du collagène, de l'élastine, de la substance fondamentale, et des glycoprotéines de structure. Cette activité de synthèse des fibroblastes est donc indispensable, surtout pendant le processus de cicatrisation. La multiplication des fibroblastes et leur activité sont contrôlées par des facteurs de croissance et les cytokines (TGFβ, IL-6). Des cellules du système immunitaire (leucocytes, mastocytes, macrophages) sont également présentes dans le derme, mais beaucoup moins nombreuses.

La matrice extracellulaire, autre composant majeur du derme, est composée de plusieurs éléments :

- Des protéoglycanes (ou peptidoglycanes) qui sont des macromolécules formées d'une chaîne polypeptidique, appelée protéine porteuse et de longues chaînes polysaccharidiques, les glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs les plus importants du tissu conjonctif sont les chondroïtines sulfates, les kératanes sulfates et l'acide hyaluronique qui est le composant principal des matrices extracellulaires et le seul GAG à ne pas être lié à une protéine porteuse.
- Des composants fibreux qui sont le collagène, l'élastine et la réticuline : Ces fibres apportent à la peau la résistance et l'élasticité dont elle a besoin et contribuent à l'hydratation de la peau et la circulation des métabolites. Les fibres élastiques sont formées par l'élastine, pour donner à la peau son élasticité. Les fibres de collagène, quant à elles, résistantes à l'étirement, procurent la résistance à la peau. Leur structure permet à la peau de retrouver sa forme après un étirement.

1.1.3. L'hypoderme est la couche la plus profonde de la peau. Son épaisseur est variable selon sa localisation, mince au niveau du front, épais au niveau des fesses. Il est rattaché au derme par des prolongements de fibres de collagène et de fibres élastiques. C'est un tissu lâche contenant des fibres de collagène et un gel de protéoglycanes. De plus, l'hypoderme est constitué de cellules adipeuses ou adipocytes, de forme sphérique, regroupés en lobules graisseux, eux-mêmes rassemblés en lobes graisseux. Les lobes et lobules graisseux sont séparés par du tissu conjonctif dont les fibres de collagène qui proviennent du derme et se prolongent jusqu'aux fascias des muscles. Ce tissu renferme également des fibroblastes particuliers, précurseurs des adipocytes, appelés pré-adipocytes. Il contient également des vaisseaux sanguins et des nerfs qui conduisent au derme.

L'hypoderme contribue au stockage de l'énergie de l'organisme grâce aux triglycérides stockés dans les adipocytes. Il est aussi un réservoir d'hormones stéroïdes. Il a également un rôle de protection mécanique, d'amortisseur des chocs et de protection thermique, permettant le maintien de l'homéothermie. La dernière fonction de l'hypoderme est une fonction plastique : sa répartition modèle la silhouette.

A la peau est associé un système vasculaire qui assure la nutrition et l'oxygénation de l'épiderme, du derme et de l'hypoderme et assure l'élimination des déchets métaboliques.

La peau est également un organe sensitif siège de perception d'informations sensibles variées grâce aux nombreuses terminaisons nerveuses. Des fibres nerveuses motrices sont également présentes qui innervent les glandes sudoripares, le muscle pilo-arrecteur et les vaisseaux sanguins.

1.2. Physiologie de la peau

Enveloppe qui protège l'individu, la peau possède des fonctions multiples et complexes (9) :

1.2.1. *Fonction barrière*

La fonction principale de la peau est de protéger l'intérieur du corps contre les agressions extérieures, mécaniques chimiques, microbiologiques ou encore thermiques. La peau constitue ainsi une barrière efficace et imperméable s'opposant à la pénétration des substances exogènes. Les lipides (cholestérol, céramides, acides gras libres) servant de ciment aux cornéocytes qui forment une structure compacte et jouent un rôle majeur pour assurer la fonction principale de la peau : la protection imperméable vis-à-vis de l'entrée des xénobiotiques, des substances hydrosolubles ou de grosse taille (19,20) et la perte d'eau au travers de l'épiderme. Le derme sous-jacent mécaniquement résistant protège les organes contre les chocs, les pressions, les agressions mécaniques. L'épaississement de la couche cornée, la production de mélanine et l'activation des enzymes antioxydantes se trouvant dans l'épiderme permettent à la peau de se défendre des radiations solaires dangereuses comme les rayonnements ultraviolets. Par son renouvellement permanent, son pH acide et le film hydrolipidique cutané la peau est capable de s'opposer à l'attaque des micro-organismes pathogènes.

1.2.2. *Fonction immunitaire et hormonale*

Les kératinocytes peuvent participer à la défense immunitaire en déclenchant une réponse inflammatoire par sécrétion de cytokines ou de lymphokines, sécrétion qui attirent les lymphocytes T. Les cellules Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigène aux lymphocytes T « naïfs » induisant une phase d'amplification antigène-dépendante. Enfin, les macrophages du derme constituent une seconde ligne défensive.

1.2.3. *Thermorégulation*

La peau joue un rôle fondamental dans des échanges de chaleur entre l'homme et l'environnement. La dilation et la constriction vasculaire régulent la température corporelle en éliminant ou gardant la chaleur pour la peau. De plus, l'excrétion de sueur via des glandes sudoripares permet au corps de lutter contre la chaleur.

1.2.4. *Fonction hormonale*

La peau participe au système endocrine par la synthèse de la provitamine D sous l'action du rayonnement solaire ou encore par la transformation des pro-hormones, par exemple de la testostérone en di-hydrotestostérone qui est une forme plus active (21).

1.2.5. *Barrière autoréparatrice*

La peau est capable de s'autoréparer : la cicatrisation est une réponse du revêtement cutané à toute atteinte à son intégrité. Ce processus fait appel à une dédifférenciation cellulaire impliquant une prolifération épithéliale, les kératinocytes proches de la plaie se transforment et prolifèrent. Au niveau du derme les fibroblastes prolifèrent également rétablissant ainsi la continuité du derme.

Toutefois la barrière cutanée n'est pas absolue et un très grand nombre de substances exogènes sont susceptibles de pénétrer une peau saine. Deux facteurs à ce titre sont à considérer, d'une part l'état physiologique du tégument et d'autre part les caractéristiques physicochimiques des substances. En effet, il existe de nombreuses substances pouvant pénétrer dans la peau, à savoir l'oxygène, le gaz carbonique, les vitamines liposolubles (A, D, E, K), les stéroïdes, les huiles essentielles, les oléorésines qui se trouvent dans la sève de certaines plantes, les solvants organiques, les sels de métaux lourds (Pb^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+})... Certains types de savons, détergents ou lipides exogènes peuvent aussi modifier la composition lipidique de ciment intercornéocytaire et perturber cette fonction de barrière. Certains produits cosmétiques utilisés au long cours peuvent modifier le pH de la surface de la peau (physiologiquement à 4,5-5,5) aboutissant à une baisse de la cohésion cornéocytaire et une augmentation de la prolifération de bactéries pathogènes.

Deux phénomènes observables peuvent affecter la peau :

- Phénomène d'irritation : frottement (avec des vêtements rêches ou peau contre peau lors de pratiques sportives), un excès de transpiration ou après le rasage...
- Phénomène allergique :
 - o Eczéma atopique : perturbations dues à un défaut génétique, phénotypique
 - o Eczéma de contact : entre la peau et des produits allergènes comme le latex ou les métaux (nickel, chrome...)

Ces phénomènes peuvent provoquer des réactions se manifestant par des plaques rouges sur la peau accompagnées de lésions et de démangeaisons. Pour la suite du travail nous considérons que la peau est saine et que son état physiologique n'intervient pas.

2. La peau : modalités de pénétration cutanée des actifs pharmaceutiques (API) et/ou cosmétiques (ACI)

Constitué de deux parties principales, le *stratum corneum* et l'épiderme vivant, l'épiderme est la couche la plus étudiée dans les domaines dermo-pharmaceutique et dermo-cosmétique. D'une part, l'administration cutanée des molécules actives à travers la barrière considérée comme imperméable du *stratum corneum* est un véritable défi pour les traitements locaux. D'autre part, une fois passé le *stratum corneum*, l'actif doit atteindre les cellules cibles dans l'épiderme vivant pour que des effets thérapeutiques soient observables (22).

Deux modes de diffusion à travers la couche cornée peuvent être observés, un passage transcellulaire direct et un passage intercellulaire (23) illustrés par la figure 3. Dans les deux cas il s'agit d'une diffusion passive. Les substances appliquées sur la peau migrent suivant un processus de diffusion proche de la loi de la diffusion de Fick : le flux de diffusion d'une substance au travers d'une membrane est proportionnel au gradient de concentration de la substance. Le flux de diffusion pour une substance donnée dépend de la taille de la molécule et de la température.

Plusieurs étapes se succèdent au cours de l'absorption cutanée : la pénétration à travers la couche cornée puis l'absorption par les différentes couches y compris derme et hypoderme et le cas échéant le passage dans la circulation sanguine.

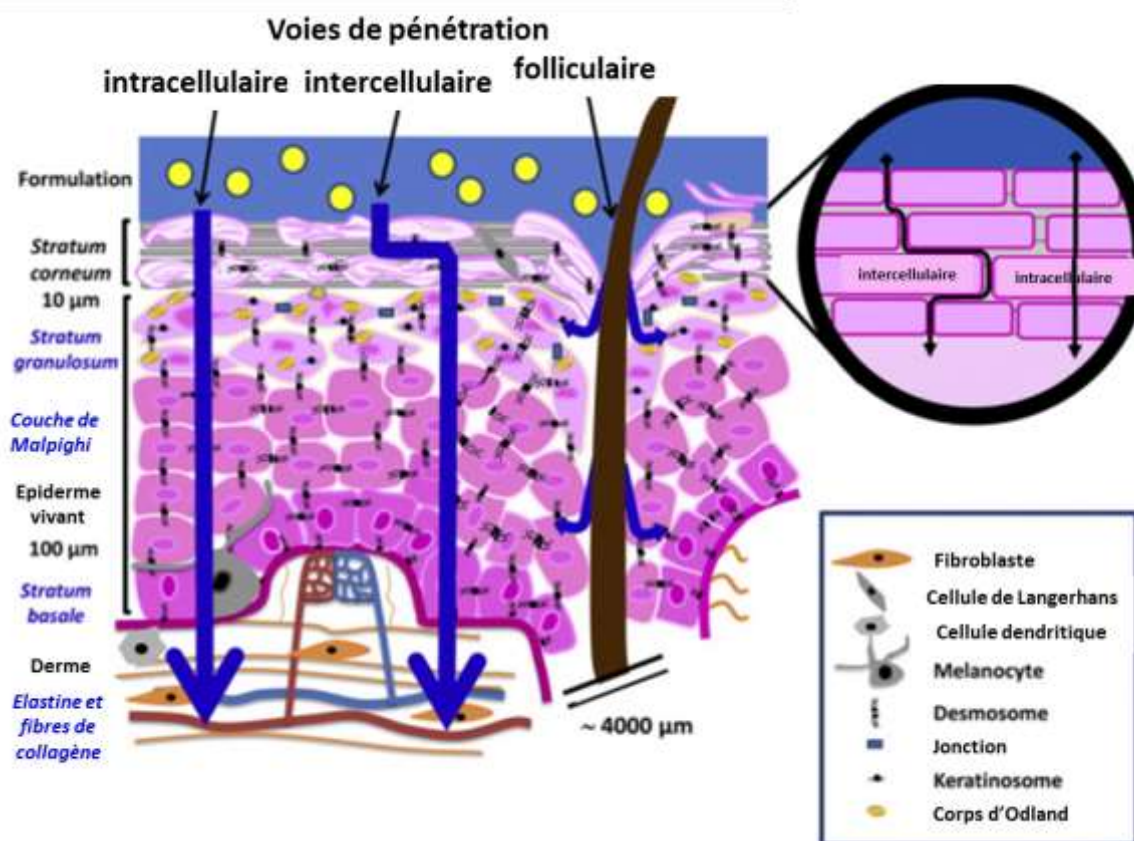


Figure 3. Différentes voies de pénétration cutanée : intracellulaire, intercellulaire et folliculaire. La partie en haut à droite représente la voie intracellulaire et la voie tortueuse intercellulaire à travers la couche cornée (d'après Bolzinger et al., 2012) (23).

Certaines molécules pénètrent via les follicules pilosébacés. Le passage par le canal sudoripare est également une possibilité d'entrée des molécules mais cette voie est rarement mise en évidence.(23)

La pénétration cutanée et le passage transcutané sont dépendants des caractéristiques physicochimiques et biopharmaceutiques des substances appliquées. La petite taille de la molécule en général facilite la pénétration : Les molécules de masse moléculaire inférieure à 500 Da peuvent diffuser dans la peau de manière passive (24). Quelques paramètres comme le coefficient de partage octanol/eau ou encore le point de fusion permettent de prévoir la capacité de pénétration d'une substance (25–27). Les lipides intercellulaires arrangés en bicouches permettent principalement le passage intercellulaire des petites molécules amphiphiles et lipophiles. Alors que les petites molécules hydrophiles pourraient emprunter le passage transcellulaire à travers les cornéocytes.

La problématique du passage d'API ou d'ACI vers les cellules vivantes de l'épiderme voire vers la circulation sanguine implique de modifier les caractéristiques physicochimiques des substances que l'on souhaite faire passer ou d'utiliser les véhicules capables de faciliter ce passage. Ces promoteurs de passage modifient la structure du *stratum corneum* ce qui rend leur utilisation à long terme dangereuse car la barrière cutanée est alors altérée (28). De nombreux ingrédients utilisés dans les formulations ont cet effet promoteur d'absorption comme les tensioactifs ou les alcools. Différents modes d'action ont été identifiés, en particulier la capacité de ces composés à interagir avec les constituants du *stratum corneum*, à en modifier les lipides en fluidifiant les bicouches et à réduire la résistance de la peau à la diffusion. La concentration et le pH de la formulation peuvent aussi modifier la diffusion cutanée des actifs. Dans les domaines pharmaceutiques et cosmétiques, les nanosystèmes ont été largement étudiés comme transporteurs pour améliorer la pénétration cutanée des actifs. Récemment, les mélanges eutectiques ayant le point de fusion bas sont utilisés pour faciliter la solubilisation et améliorer le passage cutané des actifs pharmaceutiques. (29)

Partie 2

Solvants eutectiques profonds : définitions, méthodes d'obtention et caractérisations physicochimiques

1. Définitions

La faible biodisponibilité des médicaments peu solubles dans l'eau est un véritable défi dans le développement pharmaceutique. Il faut donc parfois utiliser des solvants, substances chimiques ayant la propriété de dissoudre, de diluer ou d'extraire d'autres composés sans qu'ils réagissent chimiquement entre eux. Les solvants organiques traditionnels comme l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'éther, ou le chloroforme sont utilisés comme milieux d'extraction, de dissolution ou de formulation contenant des substances actives hydrophobes. A cause de leur volatilité, de leur inflammabilité et de leur toxicité pour la santé humaine ainsi que l'environnement, de nouveaux solvants, souvent appelés « verts », sont développés comme alternative. Ces solvants alternatifs sont souvent qualifiés d'écologiques, biodégradables, durables et moins toxiques. Parmi ces solvants, on peut citer les liquides ioniques, les fluides supercritiques comme le CO₂ supercritique, ou les solvants eutectiques profonds. Les liquides ioniques (ionic liquid - IL) - également connus sous le nom de premier système eutectique - sont des sels possédant une température de fusion relativement basse, souvent inférieure à la température ambiante (30). Ils sont constitués de cations et d'anions. Les cations sont généralement de type imidazolium, ammonium, pipéridinium, alors que les anions associés sont principalement de type fluorés, acétate ou triflate. Cette nouvelle classe de solvants présente des caractéristiques intéressantes telles que la non-volatilité, la stabilité chimique et thermique, l'ininflammabilité, la bonne conductivité et la grande capacité de solubilisation des composés organiques. Néanmoins, ils sont de moins en moins utilisés en raison de leur toxicité et de la faible dégradabilité de leurs composants, ainsi que leur coût généralement très élevé.

Une nouvelle génération de liquides ioniques a ensuite été développée au début des années 2000, les solvants eutectiques profonds (deep eutectic solvent - DES), également appelés IL eutectiques profonds, mélanges à bas point de fusion ou mélanges à basse température de transition (31). Un mélange eutectique peut être défini comme un système de deux ou plusieurs composants solides ou liquides constitué a minima d'un accepteur de liaisons hydrogène (HBA) et d'un donneur de liaison hydrogène (HBD), dont le point de fusion est inférieur à ceux de ces composants pris séparément. La liaison hydrogène ou pont hydrogène est une interaction attractive intermoléculaire ou intramoléculaire impliquant un atome d'hydrogène et un atome plus électronégatif que l'hydrogène comme l'oxygène, l'azote ou le fluor. La formation du réseau de liaisons hydrogène permet l'abaissement du point de fusion du mélange à un niveau nettement inférieur de n'importe lequel de ses composants purs. Ce réseau n'est formé qu'à des ratios molaires spécifiques.

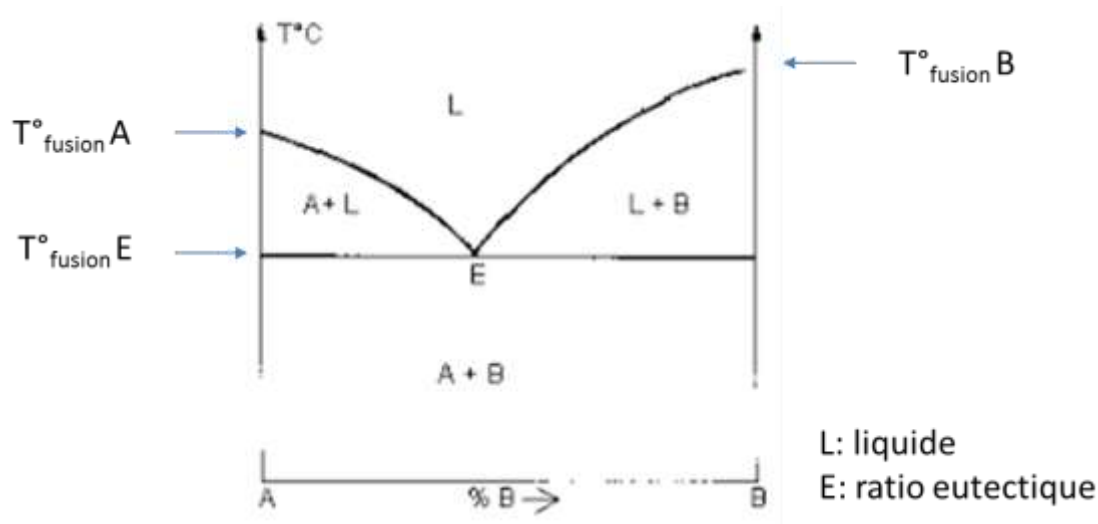


Figure 4. Représentation schématisée d'un diagramme de phases solide-liquide des DES à base de deux substances A et B. D'après le site <http://ressources.univ-lemans.fr/AccesLibre/UM/Pedago/chimie/06/deug/CHIM201A/phases.html>, consulté le 27/11/2022.(32)

Au début des années 2010, les DES naturels, ou NaDES, généralement composés de molécules issues de biomasses végétales, telles que les dérivés de la choline, les sucres, les acides aminés, les acides organiques et les polyols, ont été largement étudiés. La découverte de ces NaDES a constitué une avancée majeure dans le domaine des sciences végétales, ces solvants étant considérés comme le 3^e liquide végétal, en plus de l'eau et des huiles. Les NaDES sont décrits

comme des «solvants verts » non toxiques, très prometteurs pour différentes applications biomédicales et pharmaceutiques. Très récemment, sont apparus dans la littérature les DES hydrophobes (HDES), dont la version NaDES regroupe essentiellement des systèmes à base de menthol, thymol et acides gras. La très grande diversité de composition des NaDES confère une grande diversité de propriétés (33). Ils permettent ainsi d'améliorer la solubilité et la biodisponibilité de substances actives peu solubles dans l'eau, tel que l'ibuprofène, et de potentialiser la pénétration cutanée de certains actifs pharmaceutiques (API) (34,35). L'une des applications les plus développées des NaDES est l'extraction de molécules d'intérêt à partir de biomasses, par exemple : l'extraction d'antioxydants de la fleur d'*Osmanthus fragrans*, l'extraction de pigments et d'acides gras libres de la spiruline, l'extraction de la vanilline des gousses de vanille ou l'extraction des polyphénols du houblon (*Humulus lupulus* L) (36–38). Ce fort développement des NaDES dans le domaine des sciences extractives s'explique par les propriétés particulières de ces solvants, notamment leur pouvoir de solubilisation très élevé, leur sélectivité d'extraction inédite ainsi qu'une capacité de stabilisation pour des molécules sensibles.

Récemment est apparu dans la littérature le concept de THEDES (therapeutic deep eutectic solvents) (39), où un API fait partie intégrante de la formulation du DES permettant ainsi la potentialisation de l'activité des API ou de moduler leur biodisponibilité (40,41). Stott et ses collaborateurs ont décrit pour la première fois un système THEDES composé de menthol et d'ibuprofène (42). L'objectif principal était d'améliorer la pénétration cutanée et de développer des systèmes d'administration transdermique d'ibuprofène, un anti-inflammatoire non stéroïdien utilisé comme molécule active modèle. Les études de pénétration de l'ibuprofène dans les THEDES à base de terpène ou de menthol en particulier ont démontré l'intérêt de ces systèmes pour la délivrance cutanée de l'actif, grâce à la propriété de promoteur de passage cutané des terpènes.

De plus, Morrison et ses collègues ont démontré une augmentation de 5 à 22000 fois de la solubilité des antifongiques comme le danazol, la griséofulvine et l'itraconazole dans les DES chlorure de choline et d'urée (32,3% : 67,7%, mol/mol), et de chlorure de choline et d'acide malonique (1 : 1, mol/mol) (43). Les résultats de ces études ont mis en évidence l'effet des DES ou THEDES sur la dissolution et la pénétration des actifs pharmaceutiques dans et à travers la peau.

2. Méthodes d'obtention des solvants eutectiques

2.1. Composants

Les DES sont préparés par le mélange des HBA et HBD à des proportions appropriées. Ils sont en général choisis parmi des composants peu coûteux, sûrs et faciles à obtenir (origine renouvelable). Les HBA (porteurs d'un doublet non liant) les plus utilisés sont les sels d'ammonium quaternaire tels que le chlorure de choline, tandis que les amides ou les alcools comme l'urée ou le glycérol sont fréquemment trouvés parmi des HBD (possédant un atome d'hydrogène non labile) (44).

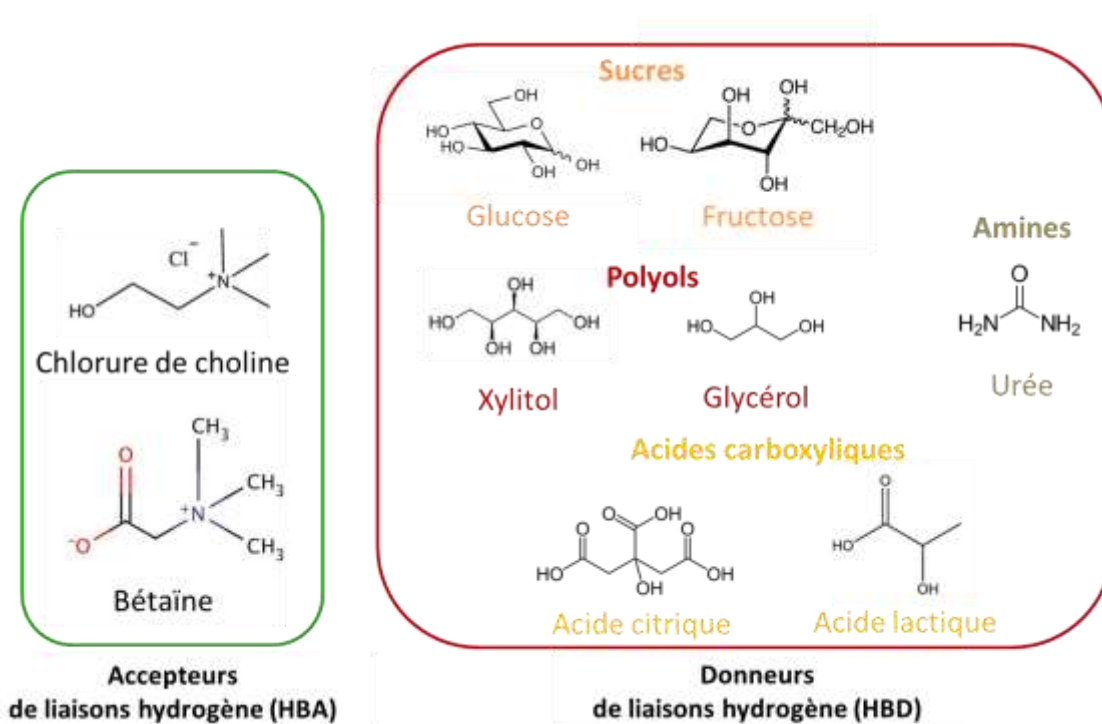


Figure 5. Structure chimique des donneurs de liaisons hydrogènes (HBD) et des accepteurs de liaisons hydrogènes (HBA) fréquemment utilisés pour formation des solvants eutectiques profonds (DES) (45)

Dans le domaine de la cosmétologie, ces composants doivent être sélectionnés dans la liste des ingrédients autorisés par l'Inventaire des Ingrédients Cosmétiques de la Commission Européenne (Inventory of Cosmetic Ingredients of European Commission ou CosIng). De plus, d'après le règlement européen CE 1223/2009 applicable aux produits cosmétiques, les substances utilisées ne doivent pas apparaître dans l'annexe II (Liste négative des produits

exclus de tout produit cosmétique). En Chine, le règlement de surveillance et d'administration des cosmétiques (Cosmetic Supervision and Administration Regulation - CSAR) publié en 2020 vise à améliorer la qualité et la sécurité des produits cosmétiques avec des règles pour la mise sur le marché, l'encadrement de fabrication, le contrôle de qualité. L'Inventaire des Ingrédients Cosmétiques existants en Chine (Inventory of Existing Cosmetic Ingredients in China (IECIC) de 2021) doit aussi être respecté. Par conséquent, le chlorure de choline, l'HBA le plus utilisé dans la littérature pour la préparation des DES, est interdit dans les produits cosmétiques et remplacé notamment par la bétaine (triméthylglycine). La bétaine est référencée en Europe et en Chine comme agent de conditionnement de la peau ou agent humectant. D'autres HBD et/ou HBA généralement trouvés dans des produits hydratants ou conditionnement de la peau ont été utilisés pour la synthèse des DES : urée en tant qu'agent humectant/conditionneur de la peau, les sucres (le glucose, le fructose, le galactose, le saccharose et le maltose) et les polyols (le glycérol, le xylitol, le sorbitol et le maltitol). Un acide organique (acide lactique) utilisé comme agent tampon/chélateur fait également partie des composants autorisés des DES en cosmétique. L'éthylène glycol est aussi autorisé, au départ comme tensioactif, émulsifiant et humectant (3–5).

2.2. Méthodes d'obtention

Les méthodes les plus utilisées pour préparer un mélange eutectique sont la méthode par chauffage et la méthode par broyage (Figure 6). (46)

La méthode par chauffage consiste à chauffer le mélange de HBA et HBD individuellement pesés avec précision sous agitation constante jusqu'à la formation d'un liquide homogène (31). Cette préparation se fait classiquement sur une plaque chauffante dans un récipient fermé. Une approche plus respectueuse de l'environnement utilisant des micro-ondes a également été utilisée pour l'obtention plus rapide de solvants eutectiques profonds. Dans ce cas, le DES peut être obtenu en quelques secondes (47,48). La température de chauffage est généralement comprise entre 30 et 100°C. Pour éviter toute contamination du DES par l'humidité atmosphérique qui entraîne une variation de la teneur d'eau pouvant perturber la structure du DES, les composants fortement hygroscopiques de la préparation peuvent d'abord être séchés sous vide avant utilisation (49).

La méthode par chauffage peut être accompagnée d'une évaporation sous vide (Figure 6B), qui comprend deux étapes (1). La première étape consiste à la dissolution complète des constituants

dans l'eau, avec l'aide de chauffage, vortex ou ultrasons ; suivie par la seconde étape d'évaporation d'eau sous vide à environ 50°C avec un évaporateur rotatif. Le liquide obtenu est ensuite placé dans un dessiccateur contenant du gel de silice pour éliminer tout résidu d'eau. Ces méthodes basées sur le chauffage sont à faible coût, rapides et simples à réaliser. Elles sont adaptées pour la plupart des DES, à part ceux contenant des actifs thermosensibles ou dégradables par micro-ondes.

Des approches mécano-chimiques ont également été mises au point, à savoir le broyage, le broyage à billes et l'extrusion à chaud. La méthode de broyage consiste à mélanger les composants du DES à l'aide d'un mortier et d'un pilon, jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène à température ambiante (31). Cette méthode, facile à appliquer et qui convient aux produits thermosensibles, présente cependant des problèmes de reproductibilité, surtout pour les DES formés à partir de composés hygroscopiques. La quantité d'eau dans le DES peut donc varier dans différentes préparations.

La méthode de broyage à billes (Figure 6D) est une autre approche mécano-chimique, dans laquelle les composants du DES interagissent physiquement par la force centrifuge générée par la rotation du cylindre (50). Par conséquent, les propriétés physico-chimiques des DES formés varient en fonction des paramètres du broyage tels que la fréquence de rotation, la durée de broyage et le nombre ainsi que le diamètre des billes utilisées. Rubin Pedrazzo et al. ont démontré que l'utilisation d'un grand nombre de petites billes pouvait conduire à des systèmes homogènes, mais entraînait une augmentation indésirable de la température du mélange final en raison de la plus grande surface de contact et de plus de frottement (51) ; d'où l'inconvénient principal de cette méthode : le contrôle de température au sein du système. En plus de cela, il est difficile d'éliminer l'eau du système venant de ses composants hygroscopiques.

L'extrusion à chaud est une autre méthode mécanique consistant à mélanger des matériaux par passage au travers d'une filière en maîtrisant le cisaillement et l'agitation. Elle peut être combinée avec la méthode par chauffage dans différentes zones de l'appareil pendant l'extrusion pour un processus de fabrication à des températures parfaitement maîtrisées. Crawford et ses collègues ont réussi à préparer des DES chlorure de choline/urée (1 : 2, mol/mol) à environ 6 kg/heure avec cette méthode (52). Le temps de passage considérablement réduit en extrusion permet d'éviter le problème de dégradation des substances thermosensibles, de plus elle est adaptée aux matériaux visqueux comme les DES. Ces deux avantages font de l'extrusion une méthode de choix par rapport aux autres méthodes mécaniques. Grâce aux appareils industriels de grande capacité de broyage qui ont la possibilité de connecter avec

d'autres machines dans le processus de fabrication, elle peut être appliquée à une large échelle pour la production continue de produits pharmaceutiques et cosmétiques finaux. Cette méthode présente en revanche comme inconvénient son coût énergétique.(53)



Figure 6. Les principales méthodes de préparation des DES (A: heating = chauffage, B: evaporating = évaporation, C: grinding = broyage, D: ball milling = broyage à billes, E: hot-melt extrusion = extrusion à chaud, F: freeze-drying = lyophilisation, hydrogen bonding = liaison hydrogène). D'après Liu et al., 2022 (46)

La dernière méthode abordée dans la littérature est celle de lyophilisation (Figure 6F) (54). Des solutions aqueuses (avec un minimum d'eau) des différents composants du DES sont mélangées à un rapport molaire approprié. La solution obtenue est congelée à des températures de l'ordre de -20°C à -80°C pour que l'eau liquide se transforme en glace (solide). Le mélange solide est ensuite mis sous pression réduite pour que l'eau se sublime, passant directement de l'état solide

à l'état gazeux sans effet d'ébullition (transition de phase liquide en phase gazeuse). Résulte du processus un mélange eutectique avec un minimum de résidus d'eau. Cette méthode de lyophilisation peut être appliquée pour la synthèse des DES à base de composants thermosensibles sans les dénaturer. Néanmoins, deux inconvénients majeurs sont fréquemment rapportés avec cette technique : une teneur en eau résiduelle difficile à anticiper/maîtriser, un coût énergétique élevé permettant difficilement d'envisager son utilisation à l'échelle industrielle pour un « simple solvant ».

En général, les méthodes de fabrication des DES sont simples à mettre en œuvre avec des paramètres faciles à atteindre et maîtriser. En fonction des caractéristiques physicochimiques des composants (volatilité, thermo-sensibilité, hygroscopie...), certaines méthodes seront plus ou moins adaptées à chaque préparation. En plus de cela, les appareils utilisés pendant ces processus constituent un autre paramètre à prendre en compte pour choisir des méthodes transposables à l'échelle industrielle. Les méthodes par chauffage ou l'extrusion à chaud peuvent être largement appliquées à grande échelle grâce aux appareils existants en industrie ; alors que les méthodes de broyage à l'aide d'un mortier, un pilon ou des

billes, ou encore celle de lyophilisation nécessitant des équipements à coût élevé sont difficilement transposables pour la fabrication industrielle.

3. Introduction des molécules d'intérêt dans les DES : applications et méthodes

3.1. Intérêt de l'utilisation de DES comme solvant de dissolution des API/ACI

a) Amélioration de la solubilité des molécules actives

L'incorporation de l'actif dans les systèmes eutectiques permet d'améliorer sa solubilité et potentiellement d'augmenter la dose administrée, ce qui est par exemple le cas du fluconazole et du furoate de mométasone. En effet, leur concentration maximale dans le solvant eutectique d'acide caprique/menthol (4 : 1, mol/mol) est de 26 et 2,4 mg/mL respectivement, alors qu'en solution aqueuse elle est limitée à 1,0 mg/mL pour le fluconazole et 0,02 mg/mL pour le furoate de mométasone. Ce résultat démontre la capacité de solubilisation équivalente des solvants

eutectiques par rapport aux solvants organiques de type d'éthanol, DMSO ou diméthylformamide. (34)

Etant théoriquement moins toxiques pour la peau que les solvants traditionnels, ces solvants alternatifs se montrent intéressants pour la solubilisation des actifs peu solubles dans l'eau (34). Cette propriété est principalement due à au réseau de liaisons hydrogène des DES. D'autres mécanismes de l'amélioration de la solubilité et de la dissolution des DES doivent être étudiés par des recherches plus approfondies afin d'ouvrir la porte à la maîtrise de la libération des médicaments incorporés dans les systèmes DES.

b) Extraction de molécules actives à partir des plantes médicinales

Afin d'étudier le potentiel des DES pour l'extraction des actifs des plantes médicinales, Espino et al. ont extrait des composés phénoliques et alcaloïdes à partir de différentes plantes *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Larrea divaricata* ou *L. cuneifolia* connues pour leur propriété antifongique contre *Candida albicans*. Ils ont comparé le rendement d'extraction de ces substances par les solvants conventionnels comme le méthanol ou de l'eau et par un solvant eutectique d'acide lactique/ glucose (5 : 1, mol/mol) avec 15% d'eau (% volumique). Les résultats ont démontré que le solvant eutectique présente une très bonne capacité d'extraction pour à la fois des composés polaires et faiblement polaires par rapport au méthanol et l'eau. (55) Cette capacité dépend non seulement de la polarité mais aussi de la densité ou encore la viscosité des solvants eutectiques (56).

c) Stabilisation des actifs

La dernière application des DES consiste à stabiliser des molécules actives, en particulier les macromolécules fragiles comme des protéines facilement dénaturées *in vitro* et *in vivo*. Les études de Kumari et al. ont confirmé la très bonne stabilité du lysozyme incorporé dans le DES chlorure de choline/urée (1 : 2, mol/mol) (57). En plus de cela, les molécules actives fragiles de plus petite taille peuvent être également stabilisées par les DES. C'est le cas de l'aspirine ou de l'imipénème (antibiotique de la famille des bêta-lactamines) (58,59). L'incorporation de ces molécules dans des DES les rend beaucoup plus stables que leur solution aqueuse, ce qui peut être expliqué par l'effet protecteur de bétaïne sur la sphère de solvation de molécule active, boosté par l'urée (faisant partie des composants du DES de bétaïne/urée/eau (1 : 1,5 : 1,25, mol/mol)) vis-à-vis des molécules actives. La matrice rigide constituée par le réseau de liaisons hydrogène peut être une autre raison pour laquelle les molécules actives sont protégées lorsqu'elles sont dissoutes dans des DES. (58,60)

3.2. Méthodes d'introduction de l'actif dans les DES

Différentes méthodes sont utilisées pour extraire des molécules d'intérêt à partir de biomasses ou incorporer des actifs dermo-pharmaceutiques dans les DES.

L'extraction de biomasses peut être effectuée par les méthodes d'extraction assistée par ultrasons (UAE), l'agitation, le chauffage ou le chauffage + agitation. La biomasse pesée avec précision peut être mélangée directement avec le système DES, à l'aide d'ultrasons, d'un agitateur magnétique ou d'un vortex, à température ambiante ou à une température supérieure (40°C ou 60°C), pendant 6-10 minutes, 30 minutes jusqu'à 72 heures. Le mélange est ensuite centrifugé et le surnageant est filtré pour éliminer les résidus de biomasse. Les DES obtenus dans lesquels l'actif a été extrait pour former des mélanges clairs sans particules non dissoutes visibles ont été sélectionnés pour des études de caractérisation par la suite.

Pour l'incorporation de molécules actives dans les DES, l'actif pesé avec précision peut être dissout directement dans les DES pour former les solutions d'actif dans le DES à la concentration souhaitée (34,58). Une autre méthode consiste à mélanger un excès d'actif dans les DES sous agitation. Le surnageant clair transparent contenant l'actif incorporé dans les DES est ensuite récupéré après la centrifugation (61,62).

Une étude sur l'extraction du thé vert a démontré que les méthodes avec seulement l'agitation ($p < 0,001$) ou le chauffage ($p < 0,05$) produisaient des rendements en catéchine significativement inférieurs à celle d'UAE ou de chauffage + agitation ; alors qu'il n'y avait pas de différence significative de rendements entre la méthode d'UAE et de chauffage + agitation. Ces résultats suggèrent que la méthode de chauffage + agitation peut remplacer celle d'UAE en fonction des applications (54).

4. Caractérisations physicochimiques des DES

4.1. Propriétés physicochimiques des solvants eutectiques

La masse volumique de la plupart des DES est supérieure à celle de l'eau (1g.cm^{-3}) : de 1,08 à $1,63\text{g.cm}^{-3}$ à 25°C (4). Comme tout mélange liquide, la masse volumique des DES diminue avec l'augmentation de la température, ce qui correspond à une augmentation du volume molaire du mélange (Figure 7).

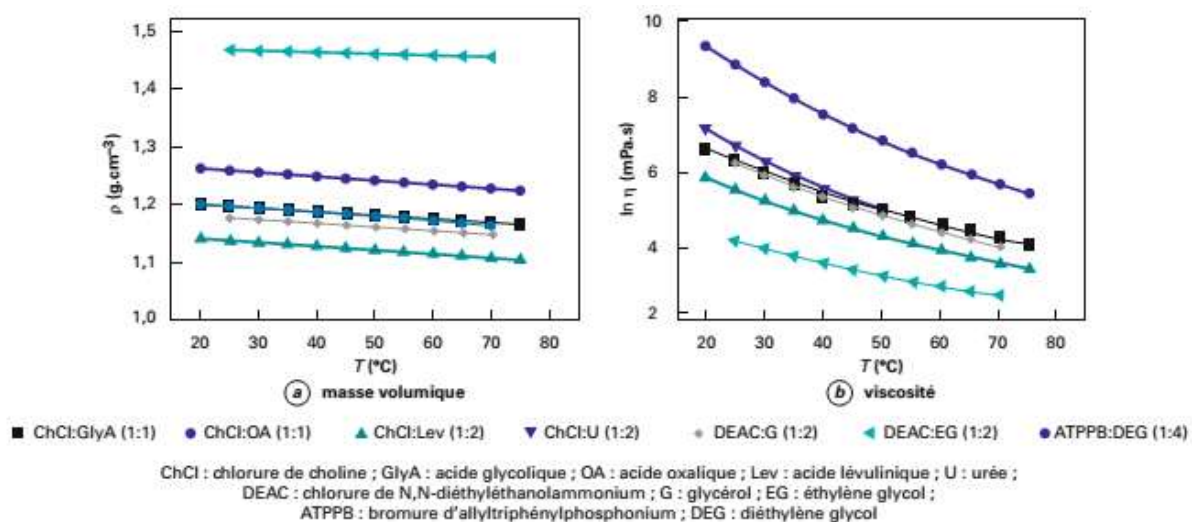


Figure 7. Variation de la masse volumique et de la viscosité des DES avec la température. D'après Moufawad et al., 2021 dans les Techniques de l'Ingénieur : Solvants eutectiques profonds - Vers des procédés plus durables (63)

La viscosité est l'une des caractéristiques les plus importantes et aussi l'un des plus grands obstacles à l'utilisation des IL et DES en tant que solvants dans les processus d'extraction végétale. Elle est variée en fonction de la nature des composants du mélange, en particulier celle du donneur de liaisons hydrogène, ainsi que la composition du mélange. La viscosité relativement élevée des DES hydrophiles (souvent supérieure à 100 mPa.s à température ambiante), notamment ceux à base de sucre (64), s'explique par le réseau de fortes interactions intermoléculaires (telles que liaisons hydrogène, van der Waals et autres liaisons ioniques) du système eutectique obtenu (4),(36). Un moyen simple de réduire la viscosité est le chauffage. En effet, la viscosité des DES diminue avec la température beaucoup plus rapidement que la densité (Figure 6). Lors du chauffage, les liaisons hydrogène sont rompues ou fragilisées. L'étude de la viscosité en fonction de la température est utile pour définir la température idéale à laquelle l'extraction végétale peut être effectuée. Si la chute de viscosité apparaît à une température au-dessus de 50°C, le solvant peut être utilisé pour l'extraction solide-liquide des API/ACI des plantes. En présence d'impuretés à faible viscosité, comme l'eau, le changement de viscosité est aussi très important. En effet, l'ajout d'une faible quantité d'un autre composant au mélange constituant le DES a été envisagé pour réduire la viscosité du mélange à une température donnée sans affecter les autres propriétés physico-chimiques. Cette sensibilité de la viscosité du DES aux traces d'impuretés est souvent à l'origine des écarts entre les valeurs rapportées dans la littérature pour un même DES.

En ce qui concerne les DES hydrophobes, la faible viscosité rapportée (64,65) est proche de celle des solvants organiques de référence, ce qui peut favoriser un bon transfert de masse lors du processus d'extraction. (36)

Tableau 1. Exemple de propriétés physicochimiques de DES d'après Moufawad et al., 2021 dans les Techniques de l'Ingénieur : Solvants eutectiques profonds - Vers des procédés plus durables (63)

Composant A	Composant B	Ratio molaire A:B	T_f (°C)	T_d (°C)	Densité (g.cm ⁻³)	Viscosité (mPa.s)	Conductivité (mS.cm ⁻¹)
Chlorure de choline	Urée	1:2	12	172	1,25 (25 °C)	750 (25 °C)	0,20 (40 °C)
Chlorure de choline	Glycérol	1:2	- 40	-	1,18 (25 °C)	376 (20 °C)	1,05 (20 °C)
Chlorure de choline	Ethylène glycol	1:2	- 66	265	1,12 (25 °C)	36 (20 °C)	7,61 (20 °C)
Chlorure de choline	Acide malonique	1:1	10	-	1,33 (25 °C)	721 (25 °C)	0,55 (25 °C)
Chlorure de choline	Acide lévulinique	1:2	- 82 (T_g)	245	1,14 (20 °C)	362 (20 °C)	0,18 (25 °C)
ZnCl ₂	Urée	1:3,5	9	-	1,63 (25 °C)	11340 (25 °C)	0,18 (42 °C)
Chlorure d'acétylcholine	Imidazole	1:1	- 65	215	1,13 (30 °C)	304 (30 °C)	-
Chlorure d'acétylcholine	Imidazole	1:1,5	- 62	126	1,13 (30 °C)	233 (30 °C)	-
Chlorure d'acétylcholine	Imidazole	1:2	- 63	143	1,12 (30 °C)	103 (30 °C)	-
Chlorure d'acétylcholine	Imidazole	1:3	- 66	133	1,15 (30 °C)	336 (30 °C)	-
d/-menthol	Acide laurique	2:1	7 14 (T_g)	231	0,89 (25 °C)	24 (25 °C)	-
T_f , température de fusion ; T_d , température de décomposition ; T_g , température de transition vitreuse [3] [5] [28] [40] [41] [42]							

Le processus d'extraction, et plus particulièrement la sélection du solvant d'extraction, est souvent basée sur la polarité du solvant. Des colorants solvatochromiques comme celui de Reichardt sont souvent utilisés pour déterminer la polarité de chaque solvant (66). Leur spectre d'absorption et leur couleur sont modifiés en fonction de la polarité du solvant dans lequel il est dissous. La polarité de chaque solvant étudié peut ainsi être caractérisée par une longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{max}) du colorant utilisé.

L'énergie de transition calculée suivant l'équation E_T (kcal.mol⁻¹) = $h \times c \times N_A / \lambda_{max}$ (nm) représente la polarité du solvant ($h = 6,6261 \times 10^{-34}$ J s : constant de Planck, $c = 2,9979 \times 10^8$ m s⁻¹ : vitesse de la lumière, $N_A = 6,02214 \times 10^{23}$ mol: nombre d'Avogadro).

Les DES à base d'acides organiques sont les plus polaires ($44,81 \text{ kcal.mol}^{-1}$), suivis des acides aminés et des DES à base de sucre pur avec une polarité similaire à l'eau ($48,21 \text{ kcal.mol}^{-1}$). Les DES à base de sucre et de polyols sont les moins polaires, avec une polarité proche de celle du méthanol ($51,89 \text{ kcal.mol}^{-1}$). De plus, la polarité de DES peut être modifiée par l'ajout d'eau, très probablement en raison de la rupture de la liaison hydrogène entre les deux composants. La polarité des DES étudiés dans le domaine dermo-cosmétique est souvent comprise entre celles du glycérol et de l'eau, et modulable par différents paramètres comme la température ou la proportion d'eau, ce qui permettrait une extraction efficace des nombreux composés phytochimiques polaires et moyennement polaires des plantes (1,4).

4.2. Caractérisations de la matrice eutectique et son comportement thermique

Dans une matrice eutectique, il y a un réseau de liaisons hydrogène via des interactions intermoléculaires qui modifient leur environnement physico-chimique. Au moins deux stratégies de base peuvent être utilisées pour déterminer les interactions physico-chimiques. Une stratégie consiste à utiliser la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) et de résonance magnétique nucléaire (RMN) pour observer les modifications de la structure moléculaire, surtout celles des groupes fonctionnels (groupes hydroxyle et carbonyle en particulier) en les comparant aux composants isolés. Les analyses de RMN permettent également de déterminer la quantité d'eau maximale qui peut être ajoutée dans les DES tout en préservant leur structure supramoléculaire. La deuxième stratégie implique principalement la détection de l'effet Overhauser nucléaire (NOE) via la relaxation dipôle-dipôle $1H$, $1H$. Un NOE entre de petites molécules peut être observé entre des protons à distance de 2 à 5 Å. En général, les expériences NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) ou HOESY (Heteronuclear Overhauser Effect Spectroscopy) sont appliquées pour mesurer l'interaction dipôle-dipôle $1H$ intermoléculaire. Dans cette stratégie, les signaux des protons interagissant sont étudiés pour identifier l'existence de liaisons hydrogène. (1,56)

Le comportement thermique des DES a été étudié par l'analyse thermogravimétrique (TGA) et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour mesurer la température de décomposition et le point de fusion (4). La TGA est une technique d'analyse thermique qui consiste en le suivi de la variation de masse d'un échantillon en fonction du temps, à une température ou une plage de températures donnée. Alors que la DSC est une autre technique d'analyse thermique qui

permet de mesurer les différences des échanges de chaleur entre un échantillon à analyser et une référence (par exemple l'alumine ou l'air) par la détermination de la température de transition vitreuse (l'intervalle de température à travers lequel la matière passe d'un état solide/vitreux à un état mou/caoutchouteux, ou vice versa) et les températures de fusion et de cristallisation. Quelques DES ont une température de décomposition basse (T_{decomp}) d'environ 125°C mais la plupart d'entre eux ont une bonne stabilité thermique avec T_{decomp} même au-dessus de 200°C voire jusqu'à 270°C (tableau 1). Presque tous les DES évalués par DSC ont des points de transition vitreuse (T_g) inférieurs à -50°C sans point de fusion, ce qui confirme que ces DES sont des complexes supramoléculaires, avec un état liquide stable sur une large plage de température. L'état liquide des DES à basse température implique que les DES peuvent être utilisés comme solvants entre au moins 0 et 100°C (4,63).

Le point de fusion du système DES dépend des composants DES et de leur proportion dans le mélange. Les DES décrits dans la littérature ont généralement des points de fusion inférieurs à 150°C (Tableau 1), beaucoup d'entre eux avec des températures de fusion inférieures à 50°C sont considérés comme les systèmes les plus intéressants car ils peuvent être utilisés à des températures proches de la température ambiante, où il y a peu de risque de dégrader les molécules actives.

4.3. Dosage de l'actif incorporé dans les DES

La plupart des extraits eutectiques sont en général caractérisés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP), parfois combinée à la spectrométrie de masse (LC-MS). Cette méthode est largement utilisée, en particulier dans la quantification de différents composants phénoliques, alcaloïdes ou pigments végétaux dans les extraits eutectiques des plantes (36,55,67). Les difficultés majeures restent la complexité des extraits eutectiques ainsi que leur viscosité, nécessitant des adaptations des méthodes au cas par cas.

Par exemple, dans le cas des extraits eutectiques contenant des acides gras libres, ils doivent être prétraités à l'aide d'une colonne SPE C18 (extraction en phase solide), avec une élution par gradient de solvants afin de limiter l'effet de la matrice eutectique sur les molécules actives analysées. Les fractions organiques sont quantifiées par la suite par LC-MS (36,68).

Les résultats de ces études ont démontré une bonne capacité d'extraction des biomasses par les DES. Le profil d'extraction des molécules actives varie en fonction de la composition du DES, permettant de choisir les DES les plus appropriés pour chacune ou classe des molécules extraites souhaitées.

Partie 3

Utilisation des solvants eutectiques profonds en cosmétologie et dermatologie

Cette partie consiste en une revue de la littérature concernant le développement de formules à base de DES, NaDES ou THEDES dans un objectif de soin de la peau, ou de traitement d'une pathologie dermatologique. Les aspects de formulation seront évoqués, ainsi que les essais d'efficacité réalisés.

1. Tolérance cutanée des DES

Compte tenu du potentiel des solvants eutectiques profonds pour les applications cutanées, il est important de déterminer dans un premier temps si une irritation ou toute autre toxicité des DES est observée au niveau de la peau. Cet aspect peut être évalué sur les cellules cutanées *in vitro* ainsi que sur la peau d'animal ou la peau humaine *ex vivo*. Concernant la cytotoxicité, elle doit être étudiée non seulement sur les kératinocytes (les cellules principales de l'épiderme) mais également sur les fibroblastes, l'une des cellules les plus abondantes des tissus conjonctifs (situés entre l'épiderme et le derme). En effet, les extraits eutectiques ne pourront être utilisés en tant qu'actifs cosmétiques ou pharmaceutiques qu'après avoir démontré leur innocuité.

Dans les études de Wils et al. en 2021, six systèmes NaDES ont été évalués sur les kératinocytes humains à l'aide du test de réduction du XTT : glucose/glycérol/eau (1 : 2 : 4, mol/mol), bétaïne/glycérol (1 : 2, mol/mol) et (1 : 8, mol/mol), acide octanoïque/acide laurique (3 : 1, mol/mol), acide nonanoïque/ acide décanoïque/ acide laurique (3 : 2 : 1, mol/mol/mol) et menthol/acide lévulinique (1 : 2, mol/mol). Ce test est basé sur le clivage du sel de tétrazolium XTT (de couleur jaune) pour former un formazan hydrosoluble (de couleur orange) par l'activité déshydrogénase dans les mitochondries actives des cellules vivantes. Une diminution du nombre de cellules viables entraîne une diminution de l'activité globale des déshydrogénases mitochondriales, donnant lieu à la baisse de formazan formé. Cette réduction est directement liée à la quantité de formazan formée, déterminée par mesure de l'absorption dans le visible. Les résultats ont montré que la toxicité cellulaire des NaDES dépendait des composants HBA et/ou HBD. Les NaDES hydrophiles sans actif (glucose/glycérol/eau (1 : 2 : 4, mol/mol),

bétaïne/glycérol (1 : 2, mol/mol) et (1 : 8, mol/mol) et les extraits eutectiques de spiruline correspondants n'ont présenté aucune cytotoxicité significative sur les kératinocytes, avec une viabilité proche de 90% à la concentration la plus élevée testée. Pour les NaDES lipophiles, avec ou sans spiruline, la toxicité n'a été observée qu'à haute concentration (200 µg/mL) pour trois NaDES sélectionnés : acide octanoïque/acide laurique (3 : 1, mol/mol), acide nonanoïque/acide décanoïque/ acide laurique (3 : 2 : 1, mol/mol/mol) et menthol/acide lévulinique (1 : 2, mol/mol). Ces résultats ont confirmé que les systèmes NaDES utilisés dans cette étude sont biocompatibles avec les kératinocytes épidermiques humains et potentiellement adaptés à l'utilisation cosmétique/dermatologique. (36)

La cytotoxicité des DES de géranate de choline (bicarbonate de choline/ acide géranique (1 : 2, mol/mol)) a également été évaluée sur les cellules kératinocytes HaCaT par le test MTT dont le principe est similaire de celui du test XTT. Le sel de tétrazolium MTT est réduit en formazan par la déhydrogénase mitochondriale des cellules vivantes. La quantité de formazan formé de couleur violette est proportionnelle à celle des cellules vivantes après le contact avec des DES et dosée par la spectrophotométrie. Par la suite, la génotoxicité de ces DES a été explorée sur les cellules 3T3 qui est une lignée de fibroblastes embryonnaires. Ces études ont confirmé l'absence de effets toxiques des DES étudiés sur les cellules de la peau (69).

Punzo et al. (68) ont évalué la cytotoxicité de l'extrait eutectique contenant la maldivine dans le marc de raisin rouge (par des NaDES composés de bétaïne/acide citrique (1 : 1, mol/mol), bétaïne/urée (1 : 2, mol/mol) ou bétaïne/éthylène glycol (1 : 2, mol/mol)) sur les kératinocytes en quantifiant la libération de lactate déshydrogénase (LDH) à partir de sphéroïdes HaCaT (cultivés à partir des kératinocytes immortalisés provenant de peau humaine adulte) à l'aide de la méthode spectrophotométrique standard. La LDH libérée dans le milieu de culture est un marqueur de la mort cellulaire à la fois *in vitro* et *in vivo*. C'est un enzyme cytoplasmique stable présent dans toutes les cellules vivantes et rapidement libéré dans le milieu de culture cellulaire lorsque l'intégralité de la membrane plasmique est perturbée. Cet enzyme transforme le pyruvate en lactate en réduisant le NAD⁺ en NADH. Un composé le tétrazolium est ensuite utilisé comme substrat de diaphorase et est converti en formazan, un produit fortement coloré qui peut être mesuré en spectrophotométrie (Figure 8). Les sphéroïdes HaCaT ont été mis en contact avec différentes concentrations d'extraits par les NaDES pendant 24 heures à 37°C et l'absorbance du milieu de culture de ces cellules a été analysée avant et après ce temps de contact. Les résultats ont montré que toutes les formulations testées à fortes concentrations (à 1,1 µg/mL de malvidine) augmentaient significativement la libération de LDH ($p < 0,001$),

tandis que celles à des dilutions inférieures n'étaient pas cytotoxiques et donc considérées comme sûres à utiliser. De plus, cette étude sur les cellules cultivées en 3D permet de reproduire les conditions plus proche des conditions *in vivo* avec la morphologie, le phénotype et l'interaction entre les cellules plus proches que celles dans l'environnement naturel, ce qui rend les résultats plus fiables. Par contre, ce qui manque dans cette étude, c'est le test sur les NaDES seuls sans actifs.

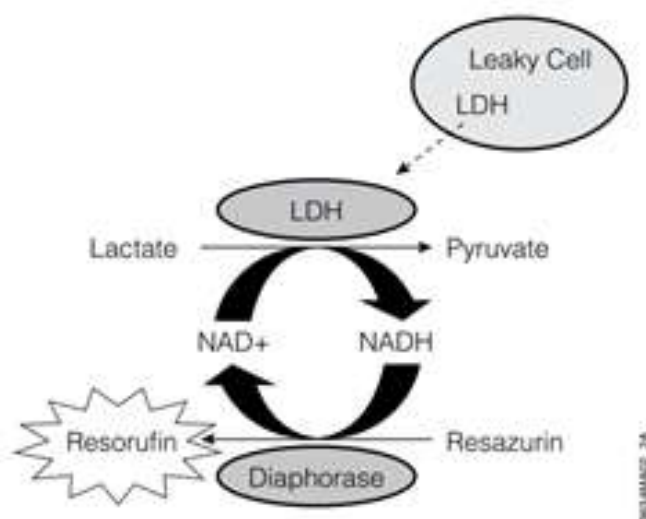


Figure 8. Schéma du principe du test de cytototoxicité de lactate déshydrogénase (LDH), selon [https://france.promega.com/c/blog/articles/methodes-utilisees-pour-etudier-la-cytotoxicite% C3%A9-cellulaire/](https://france.promega.com/c/blog/articles/methodes-utilisees-pour-etudier-la-cytotoxicite-C3%A9-cellulaire/), consulté le 02/12/2022 (70). (leaky cell = cellule altérée)

Sur les fibroblastes, la cytototoxicité des NaDES bétaine/urée/eau (1 : 1,5 : 1,25, mol/mol/mol) a été évaluée *in vitro* sur les cellules normales dermiques primaires humaines provenant de prépuce néonatal, qui ont un métabolisme plus proche de celui des cellules normales que les cellules immortalisées fréquemment étudiées. La viabilité des cellules a été analysée après 24 heures de contact avec différentes concentrations de NaDES à l'aide du test de fonction mitochondriale CellTiterBlue® (Promega). Le test est basé sur la capacité des cellules vivantes de réduire un colorant faiblement fluorescent (résazurine) en un produit final fluorescent (résorufine). Les cellules non viables perdent rapidement leur capacité métabolique et ne génèrent donc pas de signal fluorescent. Les résultats de cette étude ont confirmé la faible cytototoxicité des systèmes NaDES sur ce type de cellules. (58)

Le système NaDES bétaine/urée/eau (1 : 1,5 : 1,25, mol/mol/mol) a été appliqué sur des explants de peau humaine issus de patients ayant une chirurgie esthétique, maintenus en survie dans les plaques multi-puits sur du milieu de culture adapté (58). Ce modèle de test cutané *ex vivo* a été décrit comme le plus performant car la structure tridimensionnelle de la peau et une partie de l'activité métabolique sont conservées. Des explants traités par du tampon PBS ont été utilisés comme témoins. Après 24 heures ou 48 heures de contact peau-NaDES, des coupes cutanées ont été observées par un pathologiste. Tous les échantillons testés, traités ou non par le NaDES, ont montré une architecture dermique et épidermique très similaire à 24 heures et à 48 heures après le contact, et l'analyse histopathologique n'a pas montré de différences significatives entre les échantillons. Ces résultats complètent le profil de biocompatibilité et l'utilisation potentielle en toute sécurité des systèmes NaDES sur la peau humaine.

Un test d'irritation cutanée a également été effectué *in vivo* chez l'animal afin d'évaluer la réaction de la peau suite à l'application d'un produit fini crème contenant un DES. Le fluconazole – un antifongique pour traiter des infections à candidose – et le furoate de mométasone – un corticoïde puissant à usage externe pour le traitement symptomatique des affections cutanées inflammatoires – ont été utilisés comme molécules actives modèles. Une crème contenant la molécule active préalablement dissoute dans le DES acide caprique/menthol (4 : 1, mol/mol) a été appliquée sur un patch de gaze. Le patch a ensuite été placé sur la peau d'un lapin pendant 4 heures, en parallèle d'un patch contenant une crème placebo. Des zones de peau saine sans patch ont servi de témoin. La peau du lapin a été observée pendant 14 jours afin de détecter des anomalies (érythème, inflammation, dermatite...). A la fin de ce test, après l'euthanasie des animaux testés, la peau a été excisée puis soumise à un examen histopathologique. Les résultats obtenus n'ont montré aucun changement morphologique significatif sur la peau, en présence de la crème contenant le DES ou de la crème placebo, par rapport au témoin. Les auteurs en concluent que ni l'actif pharmaceutique, ni le DES, ni les composants de la crème topique testé ne provoque l'irritation cutanée. (34)

2. Effet des DES sur la pénétration cutanée des substances actives

Afin d'étudier l'intérêt des systèmes de DES pour l'administration de substances actives dans le derme ou les zones sous-jacentes de la peau (muscle), des cellules de diffusion de Franz ont été utilisées pour effectuer un test de perméation spécifique aux formulations topiques. Il s'agit d'un dispositif en verre composé d'un compartiment donneur supérieur et d'un compartiment receveur inférieur maintenus à 37°C. Des biopsies de peau dermatomées sont positionnées entre les deux compartiments, le *stratum corneum* étant positionné en direction du compartiment donneur où sera disposé le produit à tester (Figure 9). Les échantillons de peau peuvent être substitués par des membranes polymériques adaptées. Une quantité précise de chaque formulation de DES va être appliquée à la surface de la peau/membrane dans le compartiment donneur. Un liquide récepteur, en général du tampon PBS ou une solution adaptée à la substance active remplit le compartiment receveur. A intervalles réguliers, une partie du liquide récepteur est prélevée et la concentration de la molécule active est déterminée. Ce milieu est ensuite immédiatement remplacé par du milieu frais. La peau peut également être récupérée et analysée par différentes techniques pour évaluer la quantité de molécule active présente dans le tissu à la fin de l'expérience.

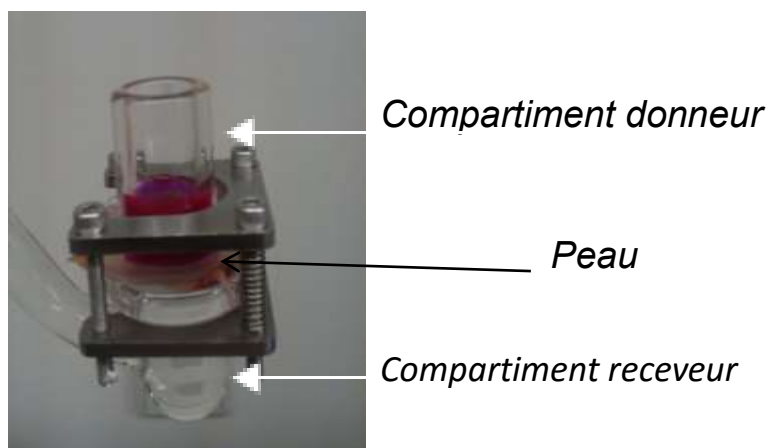


Figure 9. Cellule de diffusion de Franz

Les anthocyanes constituent le plus grand groupe de composants polyphénols hydrophiles et sont présentes dans un grand nombre des végétaux. Elles sont connues pour leur fort pouvoir colorant, leur solubilité en milieu aqueux, leur faible toxicité ainsi que leur activité antioxydante. Cependant, à cause de leur forte hydrophilie, elles diffusent peu dans la peau. Pour un usage topique, leur pénétration cutanée doit être améliorée par des formulations qui permettent une meilleure répartition de l'actif dans la partie lipidique de la peau. La malvidine, l'anthocyanine principale présente dans le raisin, a été extraite par les NaDES bêtaïne/acide citrique (1 : 1, mol/mol), bêtaïne/urée (1 : 2, mol/mol) ou bêtaïne/éthylène glycol (1 : 2, mol/mol). La pénétration cutanée de la malvidine *ex vivo* a été étudiée par Punzo et al. à l'aide de cellules de diffusion de Franz sur la peau d'oreille de porc après 6 heures, 12 heures et 24 heures de contact avec les NaDES. L'extrait de malvidine dans le NaDES bêtaïne/acide citrique (1 : 1, mol/mol) a montré la meilleure perméation à travers la peau parmi les 3 NaDES testés. Par conséquent, ce NaDES pourrait être un excipient prometteur dans un produit à usage topique grâce à sa faible toxicité, sa biodégradabilité, ses propriétés solubilisantes et stabilisantes associées à une action promotrice de passage (71).

Le test de perméation cutanée a également été réalisé sur les DES bicarbonate de choline/ acide géranique (1 : 2, mol/mol) contenant la curcumine comme marqueur avec de la peau d'oreille de porc. Des analyses histologiques des échantillons ont démontré que l'augmentation de la perméation de la curcumine était observée sans modification morphologique significative provoquée par le DES (69). Cependant, des modifications structurales au niveau de la kératine ont été observées avec certaines concentrations de DES. Le derme quant à lui n'a présenté aucun changement en termes de quantité ainsi que disposition des fibres de collagène. Une hypothèse est posée par les auteurs pour expliquer le phénomène d'augmentation de la perméation : les molécules de géranate de choline dans le système DES seraient passées entre les cornéocytes du *stratum corneum* (voie intercellulaire) puis elles auraient traversé la couche lipidique (voie intracellulaire) afin de créer de petites ouvertures transitoires à travers lesquelles les molécules actives pourraient s'infiltrer. Ces systèmes de DES de géranate de choline permettraient donc l'administration cutanée non-invasive de molécules bioactives à faible solubilité dans l'eau pour traiter les maladies chroniques de la peau ou les infections bactériennes localisées dans les couches profondes de la peau, voire l'administration non-invasive de l'insuline dans la prise en charge du diabète (administration transdermique).

Une autre expérience de perméation a été réalisée à l'aide d'un appareil de diffusion automatisé avec des cellules de diffusion en acier inoxydable sur le même principe que les cellules de Franz (42). Cette étude a été réalisée sur de la peau abdominale de donneurs *post mortem*. L'épiderme a été détaché du derme puis laissé flotter sur une solution d'azide de sodium à 0,002% (m/v) pendant 72 heures pour permettre une hydratation complète de la couche cornée. La perméation de l'ibuprofène sous forme de THEDES a été évaluée. Les THEDES ibuprofène/terpène (L-menthol, LD-menthol, thymol ou 1,8-cinéole) ont été comparés à diverses solutions d'ibuprofène dans les terpènes ainsi qu'à une solution aqueuse saturée de l'ibuprofène. Dans un premier temps, les auteurs ont étudié l'effet d'un prétraitement de la peau par les solutions saturées de terpènes dans le propylène glycol (connues pour leur capacité d'activateur de pénétration) pendant 12 heures avant la mise en contact avec les THEDES ou les solutions d'ibuprofène. Aucune différence significative n'a été observée avec ou sans prétraitement, ce qui suggère que l'amélioration de la perméation de l'ibuprofène ne vient pas uniquement de la propriété des terpènes mais principalement du système eutectique. De plus, en comparant le flux transdermique obtenu avec différents ratios ibuprofène/terpène, les auteurs ont mis en évidence que l'augmentation de la pénétration cutanée était observée avec le ratio auquel le système eutectique est formé, non pas avec les échantillons les plus concentrés en ibuprofène. Ces résultats confirment l'intérêt potentiel des formulations de type THEDES pour amélioration de la délivrance cutanée des substances actives.

3. Effets pharmacologiques des actifs incorporés dans les DES

3.1. Développement de formulations à visée antimicrobienne

Certains NaDES ont démontré une capacité à augmenter l'efficacité de molécules antibiotiques (72,73). C'est par exemple le cas des DES chlorure de choline/urée/acide malonique (1 : 2 : 0,05, mol/mol), proline/urée/acide malonique (1 : 1 : 0,05, mol/mol) ou acide citrique/xylitol (2 : 1, mol/mol) qui sont capables d'améliorer l'effet de la ciprofloxacine contre à la fois des bactéries de Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et des bactéries de Gram positif (*Staphylococcus aureus*). Des DES seuls, sans incorporation de molécule antibiotique, ont démontré une efficacité antimicrobienne. Il s'agit par exemple des systèmes acide citrique/saccharose (1 : 1, mol/mol) ou acide malique/fructose/glucose (1 : 1 : 1, mol/mol/mol) qui ont montrés une activité antimicrobienne sur *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*.

Parmi les solvants eutectiques profonds étudiés pour une application cutanée, le système de géranate de choline (bicarbonate de choline/acide géranique (1 : 2, mol/mol)) présente une activité antimicrobienne à large spectre contre un grand nombre de bactéries, de champignons et de virus résistants aux médicaments grâce à ses propriétés anti-biofilms, notamment sur *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus baumannii*, *Candida albicans*, des souches de laboratoire du virus de l'Herpès simplex, ainsi que l'infection due à *Propionibacterium acnes*. La faible toxicité de ce système et sa bonne capacité de pénétration dermique démontrée dans l'étude de Zakrewsky et al. promettent des applications préventive et thérapeutique efficaces de ce type de DES en tant que produit antiseptique (74).

Wils et al. ont évalué l'effet de six systèmes NaDES (trois NaDES hydrophiles : glucose/glycérol/eau (1 : 2 : 4, mol/mol), bétaine/glycérol (1 : 2, mol/mol) et (1 : 8, mol/mol) et trois NaDES lipophiles : acide octanoïque/acide laurique (3 : 1, mol/mol), acide nonanoïque/ acide décanoïque/ acide laurique (3 : 2 : 1, mol/mol/mol) et menthol/acide lévulinique (1 : 2, mol/mol)) sur quatre espèces bactériennes du microbiote cutané : *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis* et *Cutibacterium acnes* à l'aide du test de réduction du XTT, en présence de ménadione, accélérant la réaction. La présence en quantité excessive de trois des bactéries étudiées est associé à des troubles cutanés : *S. epidermidis* et *C. acnes* sont impliqués dans l'acné et *S. aureus* est un pathogène opportuniste responsable d'infections cutanées et notamment impliqué dans la dermatite atopique (75–77). Les extraits eutectiques hydrophiles de spiruline contiennent des chlorophylles, des caroténoïdes, la phycocyanine et des acides gras libres, alors que ceux lipophiles ne contiennent que des chlorophylles, des caroténoïdes et des acides gras libres. Les bactéries ont été incubées en présence de NaDES seuls ou d'extraits eutectiques de spiruline à différentes concentrations pendant 4 heures à 37°C avant d'ajouter le réactif XTT/ménadione. Cette étude n'a montré aucun impact des NaDES hydrophiles ou de leurs extraits, sur toutes les bactéries testées. Ils pourraient ainsi être utilisés en cosmétique sans impact négatif sur le microbiote cutané. En ce qui concerne les extraits de spiruline hydrophobes, les extraits eutectiques à base d'acide gras à chaîne moyenne ont montré des propriétés antibactériennes dose-dépendantes, en particulier sur *S. aureus* et *S. epidermidis*. Ce qui est intéressant, c'est que les NaDES seuls avaient un effet bactéricide similaire, ce qui suggère que les composants des NaDES étaient les ingrédients principalement responsables de l'activité antibactérienne. En effet, le menthol et les acides gras libres sont connus pour leur effet antibactérien contre les agents pathogènes humains et végétaux. Le menthol induit une perturbation de la fraction

lipidique des membranes de surface des micro-organismes, entraînant une augmentation de la perméabilité et des fuites de matériaux intracellulaires (78). Quant à la chaîne hydrophobe, elle pourrait jouer le rôle de détergent, conduisant à la solubilisation du peptidoglycane des membranes biologiques (79) et provoquant la lyse cellulaire par autolyse (80).

L'activité antimicrobienne d'extraits naturels à base de NaDES a également été étudiée sur une levure en culture, *Candida albicans*, par la méthode de diffusion sur disque par Espino et al (55). Cette levure se trouve normalement sur la peau et ne provoque habituellement pas de lésions. Dans certaines conditions telles que l'immunodépression ou le manque d'hygiène, *Candida* peut devenir pathogène et être responsable d'infections cutanées nommées candidoses. Les zones les plus fréquemment touchées sont le contour de la bouche, les aisselles et les plis cutanés. Dans cette étude, les extraits de quatre plantes *Larrea cuneifolia*, *Larrea divaricata*, *Thymus vulgaris* et *Origanum vulgare* ont été produits avec un NaDES composé d'acide lactique et de dextrose (5 : 1, mol/mol) avec 15% d'eau (% volume). Des disques de papier filtre stériles ont été imprégnés d'extraits de plante. Un disque de fluconazole à une forte concentration a été utilisé comme témoin positif. Après 48 heures d'incubation à 35°C, l'activité antifongique a été déterminée par des mesures de diamètres de la zone d'inhibition de la croissance microbienne. La forte activité antifongique du fluconazole a été observée et a confirmé la conformité de ce test. Les résultats ont montré que l'inhibition la plus élevée était obtenue avec les extraits de *L. divaricata* et *L. cuneifolia*, tandis que *T. vulgaris* et *O. vulgare* présentaient les inhibitions antifongiques les plus faibles. Cette inhibition est plus faible que celle du fluconazole, ce qui peut s'expliquer par la quantité de fluconazole plus importante utilisée dans cette étude. Les extraits des deux espèces de *Larrea* ont été alors retenus pour d'autres études plus approfondies.

La chromatographie liquide (CLHP) a été utilisée pour déterminer la composition de ces extraits avec le dosage de chacun des composants phénoliques et alcaloïdes (Tableau 2). L'activité antifongique de ces composants a été ensuite étudiée par la même méthode de diffusion sur disques sur *Candida* en culture. Il a été observé que tous ces composants participaient à l'inhibition de la croissance fongique des extraits.

Tableau 2. Concentration des molécules bioactives détectées dans les extraits des plantes *L. divaricata* et *L. cuneifolia* par Espino et al., 2019 (55)

		Extracts ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
		<i>L. cuneifolia</i>	<i>L. divaricata</i>
Phénoliques	Quercetine	170.98 ± 4.97	n.d.
	Acide caféique	7.65 ± 0.07	2.94 ± 0.26
	Acide férulique	12.13 ± 0.07	n.d.
	Acide rosmarinique	111.43 ± 0.06	n.d.
	Naringénine	n.d.	1.83 ± 0.04
	Acide nordihydroguaiaretique	5073.88 ± 61.61	6881.27 ± 48.22
	Tyrosol	n.d.	n.d.
	Apigénine	n.d.	n.d.
Alcaloïdes	Théophylline	66.00 ± 0.12	24.73 ± 0.34
	Théobromine	n.d.	n.d.
	Harmaline	n.d.	n.d.
	Pipérine	33.13 ± 0.39	44.84 ± 0.46
	Caféine	n.d.	n.d.

n.d.: non détecté.

La méthode de macrodilution en bouillon nutritif trypto-caseine soja (TSB) a ensuite été réalisée pour déterminer la concentration minimale inhibitrice de ces extraits (CMI). Six dilutions en série des extraits ont été préparées dans le bouillon qui est un milieu nutritif d'enrichissement pour la culture des levures *C. albicans*. L'expérience a été effectuée sur les

six tubes en ajoutant chaque dilution d'extraits dans une suspension diluée de *C. albicans* dans du TSB. Ces mélanges ont été incubés pendant 48 heures à 35°C. Des témoins positifs ont été réalisés avec le fluconazole comme antifongique de référence. Les résultats de la CMI ont été interprétés comme la concentration la plus faible de l'extrait qui présente une inhibition totale de la croissance fongique (premier tube transparent). Enfin, afin d'évaluer l'effet fongistatique et fongicide des extraits, la suspension de ce tube clair et des deux tubes consécutifs (un à une concentration plus élevée et un à une plus faible concentration) a été inoculée dans des boîtes de gélose de Sabouraud dextrose (24 heures à 35°C). Les résultats ont démontré que *C. albicans* est plus sensible à l'extrait de *L. divaricata* que celui de *L. cuneifolia*, avec la CMI inférieure obtenue avec l'extrait de *L. divaricate* (20 mg/mL contre 25 mg/mL de *L. cuneifolia*). Cet effet reste modeste par rapport au fluconazole avec la CMI obtenue à 400 µg/mL. Cependant, ces expériences ne sont pas complètes, il manque en effet les témoins NaDES seuls, sans molécules bioactives, pour conclure sur ces essais. Il faudrait également pratiquer les essais sur les extraits par les solvants organiques classiques pour pouvoir comparer avec les extraits eutectiques.

Pour aller plus loin, Espino et al. ont mis en formulation ces extraits afin d'évaluer le potentiel d'activité antifongique de ces extraits à base de NaDES dans des produits finis adaptés à l'application cutanée. Différentes dilutions d'extraits ont été mélangées avec une base de crème. L'impact de l'incorporation de l'extrait NaDES sur l'homogénéité, l'odeur, la consistance, l'étalement de la crème a été étudié ainsi que la stabilité des produits sur 60 jours, puis ces caractéristiques ont été comparées avec la crème antifongique commerciale. Des résultats similaires ont été obtenus entre les deux groupes. L'activité antimicrobienne de ces formulations a été évaluée par la suite avec la même méthode de diffusion sur disque mentionnée ci-dessus. Les résultats ont révélé que les extraits combinés des deux espèces de *Larrea* (*L. divaricata* et *L. cuneifolia*) en crème présentent un effet synergique améliorant l'activité antifongique contre *C. albicans*, par rapport au extrait seul de chaque espèce. Cette crème enrichie en extraits eutectiques semble donc prometteuse pour le traitement de la candidose.

Les effets antimicrobiens de l'imipénème incorporé le NaDES bétaine/urée/eau (1 : 1,5 : 1,25, mol/mol) (IMP-BU) sur *Pseudomonas aeruginosa* ont été explorés par Olivares et al. L'imipénème est un antibiotique du groupe des carbapénèmes faisant partie des bêta-lactamines. C'est un bactéricide à large spectre indiqué dans des infections intra-abdominales, urinaires ou cutanées compliquées et des pneumonies sévères. Les bactéries ont été incubées pendant 6 heures et 24 heures avec l'imipénème incorporé dans le NaDES, une solution aqueuse

d'imipénème et le NaDES seul étant utilisés comme témoins (58). Les bactéries survivantes ont été comptées par cytométrie en flux. Les résultats de ce test ont démontré une activité antibactérienne supérieure de la formulation d'imipénème-NaDES par rapport à l'imipénème en solution aqueuse sur les formes planctoniques de *Pseudomonas aeruginosa*, avec une réduction significative du nombre de bactéries vivantes après 6 et 24 heures d'exposition avec l'antibiotique ; alors que les NaDES seuls sans actif ne présentent pas d'activité antibactérienne. L'hypothèse avancée par les auteurs est que le NaDES permettrait une meilleure stabilité de l'imipénème ainsi qu'une libération prolongée de la molécule. L'intérêt de la matrice eutectique a été confirmé par un essai anti-biofilm. Les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* ont été cultivés sur un gel de collagène. Ils ont été mis en contact avec la formulation d'imipénème-NaDES et les témoins. Là encore, l'activité antibiofilm de l'imipénème s'est trouvée augmentée en matrice NaDES.

3.2. Développement de formulations à visée anti-inflammatoire

La propriété anti-inflammatoire des NaDES glucose/glycérol/eau (1 : 2 : 4, mol/mol), bétaïne/glycérol (1 : 2, mol/mol) et (1 : 8, mol/mol), acide octanoïque/acide laurique (3 : 1, mol/mol), acide nonanoïque/ acide décanoïque/ acide laurique (3 : 2 : 1, mol/mol/mol) et menthol/acide lévulinique (1 : 2, mol/mol) et des extraits eutectiques de spiruline correspondants a été évaluée dans la littérature sur des cellules cutanées infectées par *Staphylococcus aureus*. Ces bactéries sont connues pour induire la production de médiateurs inflammatoires par les kératinocytes (81). Les résultats ont montré que la plupart de ces systèmes n'affectaient pas la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, à l'exception de l'extrait de spiruline en NaDES glucose/glycérol/eau (1 : 2 : 4, mol/mol), qui réduit la libération de la chimiokine CXCL-8 et de la cytokine TNF- α . Cette propriété anti-inflammatoire n'a pas été observée avec le NaDES seul sans actif (36). Cela pourrait s'expliquer par la propriété anti-inflammatoire de la phycocyanine qui se trouve à une teneur élevée cet extrait eutectique de spiruline par rapport aux autres extraits testés (67).

Punzo et al. ont analysé la sécrétion d'IL-8, une cytokine pro-inflammatoire produite par des sphéroïdes HaCaT en présence d'un agent cytotoxique. Les résultats ont démontré la capacité anti-inflammatoire de la malvidine extraite par le système NaDES bétaïne/acide citrique (1 : 1, mol/mol). Les études sur les NaDES seuls n'ont malheureusement pas été effectuées.

Comme dans le cas des propriétés antimicrobiennes des DES, il manque en général dans la littérature les témoins, NaDES seuls ou extraits obtenus avec les solvants de référence, qui permettraient de conclure sur les effets directs des matrices eutectiques.

3.3. Développement de formulations à visée antioxydante

L'exposition au soleil et particulièrement aux rayons UV qui provoquent le stress oxydatif, c'est-à-dire l'agression des cellules par des radicaux libres générés dans les kératinocytes, génère une série d'événements de signalisation cellulaire conduisant à la production de substances antioxydantes pour protéger l'organisme. Ce processus contribue à un équilibre pro-oxydant-antioxydant qui maintient la stabilité de la structure cellulaire. Punzo et al. ont étudié la capacité antioxydante de la malvidine extraite de marc de raisin rouge par le NaDES bétaine/acide citrique (1 : 1, mol/mol) à contrecarrer le stress oxydatif induit par la ménadione sur des sphéroïdes HaCaT. Les cellules ont été mises en contact avec différentes dilutions de NaDES contenant la malvidine pendant 24 heures puis avec la ménadione. Les résultats ont montré que la malvidine extraite par le NaDES ou directement dissoute dans la même matrice avaient la même activité. La malvidine n'est donc pas altérée par le processus d'extraction. Le pouvoir antioxydant n'a malheureusement pas été étudié sur les NaDES seuls sans malvidine.

Le pouvoir antioxydant d'un extrait de fleurs d'*Ixora javanica* par une association eutectique de chlorure de choline/et de divers HBD (propylène glycol, glycérol, éthylène glycol, polyéthylène glycol, sorbitol, 1,3-propanediol, acide oxalique, acide lactique, acide glycolique, acide malique ou acide citrique) a été étudié afin de mettre au jour une nouvelle famille d'ingrédients cosmétiques. La méthode du DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) a été utilisée. Sous sa forme radicalaire, le DPPH• de couleur violette absorbe à 517 nm, mais lors de sa réduction par un antioxydant (AH) en une forme non radicalaire (DPPH-H), la solution subit une décoloration stœchiométrique du violet au jaune, en fonction du nombre d'électrons gagnés. Ainsi le pouvoir antioxydant de l'extrait eutectique est évalué par le suivi de la diminution de l'absorbance à 517 nm au cours du temps (82,83). Le résultat a montré que les 7 extraits eutectiques à base de chlorure de choline (+ propylène glycol/ éthylène glycol/ sorbitol/ 1,3-propanediol/ acide lactique/ acide malique/ acide citrique) de fleurs d'*Ixora javanica* ont un pouvoir antioxydant significativement plus élevé que l'extrait éthanolique de référence (84). Statistiquement, l'extrait de chlorure de choline/propylène glycol (1 : 1, mol/mol) a montré la plus grande capacité à neutraliser les radicaux libres DPPH• parmi tous

les extraits. Ces composés ayant une activité contre les radicaux libres et le stress oxydatif constituent une nouvelle stratégie pour lutter contre le vieillissement cutané (85). L'étude sur les DES seuls sans actifs aurait dû être réalisée ultérieurement pour compléter ces résultats, afin de comprendre si le pouvoir antioxydant est partiellement dû au système eutectique ou uniquement aux composants d'anthocyanes et de flavonoïdes extraits des fleurs d'*Ixora javanica*.

4. Développement de produits finis pharmaceutiques ou cosmétiques à base de NaDES

Un autre défi pour l'application des solvants eutectiques profonds consiste à la mise en formulation finale. Ayant la structure particulière avec des liaisons hydrogène, ces systèmes eutectiques sont relativement fragiles face à la dilution. A l'heure actuelle, très peu d'études ont été réalisées sur les produits galéniques finis contenant des DES. Espino et al. ont mélangé les extraits eutectiques de *L. divaricata* et *L. cuneifolia* avec une base de crème et des silicones sous agitation mécanique à température ambiante (55), alors que Al-Akayleh et al. ont préparé la crème topique contenant le fluconazole et le furoate de mométasone par la méthode d'émulsification (tableau 3) (34). Le fluconazole et le furoate de mométasone ont été incorporés dans le solvant eutectique acide caprique/menthol (4 : 1, mol/mol) dans un premier temps. La phase huileuse se compose d'acide stéarique, de triéthanolamine, d'alcool éthylique et de vaseline. Le système eutectique a été ensuite rajouté dans la phase huileuse avant l'émulsification avec la phase aqueuse contenant la gomme xanthane, la glycérine (humectant) et le phénoxyéthanol (conservateur). Les propriétés organoleptiques similaires entre ces crèmes et les versions sans NaDES sont prometteurs, cependant des études de poussées de stabilité des actifs et des produits finis doivent être menées pour valider ces approches.

Tableau 3. Liste des composants de la crème de fluconazole et de mométasone dans les études de Al-Akayleh et al., 2019 (34)

Composition	% masse/masse
Fluconazole	2
Furoate de mométasone	0,1
Acide caprique	4
Menthol	1
Polyéthylène glycol 400	13
Alcool cétylique	4
Huile de paraffine	6
Vaseline	4
Acide stéarique	1
Phénoxyéthanol	0,8
Triéthanolamine	0,1
Glycérine	3
Gomme xanthane	0,1
Eau	60,9

En plus de leur utilisation en tant que solvant, les systèmes NaDES ont démontré qu'ils pouvaient avoir un intérêt intrinsèque. Tout d'abord, certains NaDES ont démontré leur pouvoir plastifiant sur des gels de collagène à but cicatrisant (86). Cet effet a été étudié par la méthode force-déplacement sur des feuilles formées de collagène et des dilutions aqueuses de NaDES d'acide citrique/xylitol (1 : 1, mol/mol) et sur des éponges de collagène sans NaDES utilisées comme témoin. Les résultats ont montré un effet plastifiant significatif des NaDES. Cet effet peut s'expliquer par l'effet réticulant de l'acide citrique (87), par la présence du xylitol, polyol connu pour ses propriétés plastifiantes (88), ou encore une combinaison de ces propriétés. Quoiqu'il en soit, ce NaDES pourrait être utilisé comme alternative aux plastifiants toxiques ou non biodégradables pour former des bioplastiques avec le collagène (89). De plus, l'activité antibactérienne de ce NaDES complèterait l'effet cicatrisant connu du collagène dans ce type de formulation topique (72,73).

Les propriétés physico-chimiques et antimicrobiennes de certains NaDES ont été mises à profit dans la lutte contre les virus, en particulier lors de la pandémie liée au SARS-CoV-2. La maladie à coronavirus 2019 (COVID-19) est causée par l'infection du virus SARS-CoV-2. Le nombre d'infections a atteint plus de 600 millions dans le monde entier jusqu'à présent. L'utilisation de gels ou solutions hydro-alcooliques – ainsi que le lavage des mains au savon – joue un rôle important contre la propagation et la transmission des maladies infectieuses comme celle du coronavirus à l'origine de l'épidémie de Covid-19. Ils sont efficaces pour éliminer les virus et les bactéries et sont particulièrement prisés dans le contexte épidémique actuel. Malheureusement, l'effet protecteur de l'alcool ne dure que jusqu'à ce que l'alcool s'évapore, c'est-à-dire très brièvement, moins de quelques minutes. Le lavage fréquent des mains à l'eau et au savon ou l'application répétée de désinfectants à base d'alcool peuvent assécher et endommager la peau, entraînant potentiellement une dermatite (90).

Certains DES ont démontré des propriétés antimicrobiennes contre des virus, bactéries, et champignons, ainsi qu'une activité anti-biofilm contribuant à la lutte contre les pathogènes résistants aux médicaments (74). En plus de cela, contrairement à l'éthanol qui est très volatil, les solvants eutectiques profonds peuvent rester longtemps sur la peau et offrent potentiellement une protection durable contre les agents pathogènes infectieux avec des applications moins fréquentes de gels. Le gel hydro-alcoolique fabriqué par Shevachman et al. se compose du système eutectique de géranate de choline (bicarbonate de choline/acide géranique (1 : 2, mol/mol)), de glycérol, d'éthanol, d'un gélifiant à base de cellulose et de parfum (91) (Figure 10). Les tests biologiques *in vitro* ont montré que ce gel est capable d'éliminer 99,9% de bactéries du genre *Staphylococcus aureus* après 30 secondes et 99,99% du coronavirus infectant les cellules fibroblastes humaines (MRC-5) en 15 et 30 secondes. L'application du gel testé sur une surface contaminée a inhibé le développement des bactéries *Escherichia coli* jusqu'à 4 heures, alors que le gel hydro-alcoolique classique contenant 70% d'éthanol voit son action efficace seulement 30 minutes, ce qui était également obtenu avec le contrôle négatif (solution saline sans antiseptique). Le potentiel sur la protection contre les agents pathogènes de ces gels eutectiques suite aux études *in vitro* a été renforcé par des tests *in vivo* sur des personnes volontaires par la suite. L'application continue du système eutectique pendant trois semaines n'a pas entraîné de réactions cutanées importantes. L'effet antimicrobien contre *Staphylococcus aureus* a été également démontré sur les volontaires jusqu'à 4 heures après une seule application du gel eutectique. Ces études ont montré l'utilisation très prometteuse de ce gel eutectique pour une bonne hygiène durable des mains contribuant à la lutte contre l'épidémie de Covid-19.

D'autres études cliniques complémentaires à long terme seraient nécessaires avant la mise en commercialisation de ce produit.

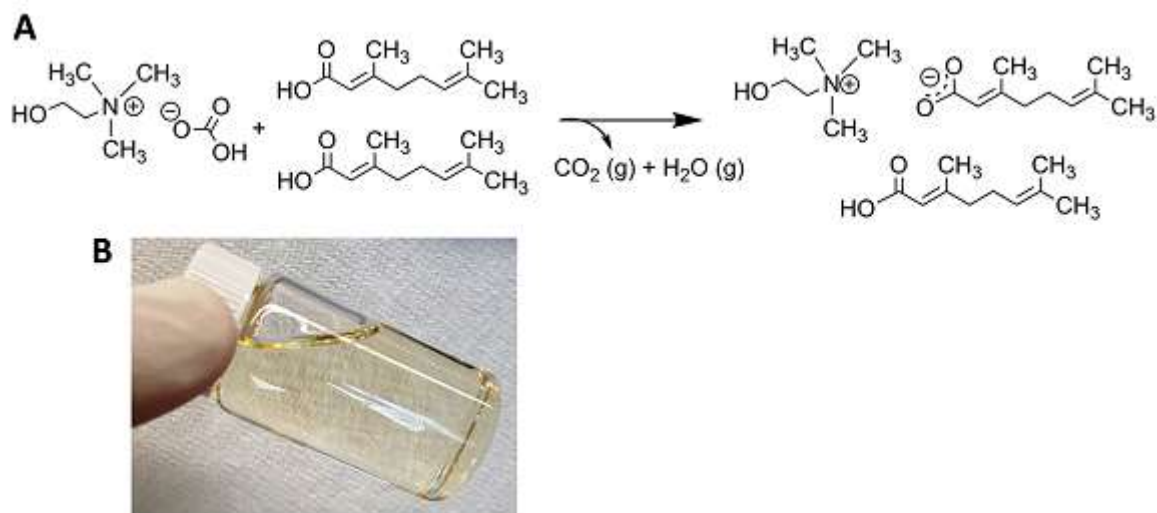


Figure 10. A) Réaction de synthèse des DES bicarbonate de choline/acide géranique (1 : 2, mol/mol). B) Le gel hydroalcoolique eutectique de géranate de choline s'est montré fluide et transparent. D'après Shevachman et al., 2022 (91)

Conclusion générale

A l'heure actuelle, de nombreuses formulations à base de solvants eutectiques profonds pour une application cutanée ont été étudiées. Ils se composent de plusieurs molécules parmi des accepteurs et des donneurs de liaisons hydrogène autorisés pour l'usage pharmaceutique ou cosmétologique. Afin de trouver le système le plus adapté en termes d'interactions moléculaires et d'interaction produits-membranes biologiques, des modélisations *in silico* sont de plus en plus développées en bio-informatique (92,93). Cela permet le criblage des composants potentiels dans un premier temps, puis la prédiction de la toxicité et l'efficacité des produits par la suite. Cela permet d'écourter le temps de recherche en limitant les expérimentations surtout celles qui sont difficiles et chronophages à réaliser comme les tests *in vivo* sur l'animal et sur l'homme.

La plupart des recherches jusqu'à présent se sont concentrées sur les propriétés de solubilisation et de stabilisation des solvants eutectiques profonds, mais ont peu abordé leurs inconvénients potentiels. En effet, le fait que ces solvants soient essentiellement à base de composants naturels ne signifie pas qu'ils ne comportent aucun danger. De plus, si les composants sont individuellement bien tolérés, cela ne veut pas dire que le DES résultant n'est pas nocif pour l'usage cutané. Les tests de stabilité généralement réalisés à court terme et la toxicité étudiée principalement sur des lignées cellulaires *in vitro* sur des échantillons fraîchement préparés ne sont pas suffisants pour garantir la sécurité des produits finis. Il est donc indispensable d'étudier la toxicité et l'efficacité à long terme des formulations à base de solvants eutectiques profonds plus en profondeur avant la mise en commercialisation.

En parallèle, une réflexion doit être menée sur les modalités de leur utilisation. Jusqu'à présent, très peu d'études ont exploré l'intégration des systèmes eutectiques au sein de produits finis adaptés à l'usage cutané. La dilution des DES et l'interaction entre les systèmes eutectiques avec les composants de la formule pourraient altérer des liaisons hydrogène dans le système d'origine et conduire à la déstabilisation des molécules d'intérêt dissoutes ou encore du produit fini.

Au vu de ce travail de thèse, les systèmes eutectiques profonds constituent donc des ingrédients très intéressants pour une amélioration de la prise en charge de pathologies cutanées de par leurs propriétés multiples, mais à l'heure actuelle, des études systématiques doivent être menées afin qu'ils soient utilisés dans la conscience de toutes leurs propriétés physico-chimiques, ainsi qu'en toute sécurité pour le patient ou le consommateur.

Bibliographie

1. Liu Y, Friesen JB, McAlpine JB, Lankin DC, Chen SN, Pauli GF. Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod*. 23 mars 2018;81(3):679-90.
2. Nyqvist-Mayer AA, Brodin AF, Frank SG. Drug release studies on an oil-water emulsion based on a eutectic mixture of lidocaine and prilocaine as the dispersed phase. *J Pharm Sci*. 1986;75(4):365-73.
3. Fiala S, Roman M, Inacio R, Mashal S, Brown MB, Jones SA. New insights into eutectic cream skin penetration enhancement. *Int J Pharm*. 29 févr 2016;499(1):403-11.
4. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta*. 5 mars 2013;766:61-8.
5. Silva JM, Pereira CV, Mano F, Silva E, Castro VIB, Sá-Nogueira I, et al. Therapeutic Role of Deep Eutectic Solvents Based on Menthol and Saturated Fatty Acids on Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater*. 21 oct 2019;2(10):4346-55.
6. Zainal-Abidin MH, Hayyan M, Ngoh GC, Wong WF, Looi CY. Emerging frontiers of deep eutectic solvents in drug discovery and drug delivery systems. *J Controlled Release*. 28 déc 2019;316:168-95.
7. Dubois J. La Peau: De la santé à la beauté - Notions de dermatologie et de dermocosmétologie. Privat; 2007. 208 p.
8. Peau - Dictionnaire Visuel [Internet]. [cité 21 févr 2023]. Disponible sur: <https://infovisual.info/fr/corps-humain/peau>
9. Alexandre M, Christine L. La peau (2e ed.). Lavoisier; 2012. 288 p.
10. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Adv Dermatol Allergol Dermatol Alergol*. févr 2013;30(1):30-41.
11. Allouche J. Différenciation des cellules souches pluripotentes en mélanocytes et applications potentielles : l'exemple des troubles pigmentaires de la neurofibromatose de type 1 [Internet] [These de doctorat]. Evry-Val d'Essonne; 2015 [cité 27 nov 2022]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2015EVRY0015>
12. Gilchrest BA, Park HY, Eller MS, Yaar M. Mechanisms of Ultraviolet Light-Induced Pigmentation. *Photochem Photobiol*. 1996;63(1):1-10.
13. Maeda K, Hatao M. Involvement of Photooxidation of Melanogenic Precursors in Prolonged Pigmentation Induced by Ultraviolet A. *J Invest Dermatol*. 1 févr 2004;122(2):503-9.
14. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and Temporal Diversity of the Human Skin Microbiome. *Science*. 29 mai 2009;324(5931):1190-2.

15. Balato A, Cacciapuoti S, Di Caprio R, Marasca C, Masarà A, Raimondo A, et al. Human Microbiome: Composition and Role in Inflammatory Skin Diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1 févr 2019;67(1):1-18.
16. Meisel JS, Sfyroera G, Bartow-McKenney C, Gimblet C, Bugayev J, Horwinski J, et al. Commensal microbiota modulate gene expression in the skin. *Microbiome*. 30 janv 2018;6(1):20.
17. Belkaid Y, Segre JA. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science*. 21 nov 2014;346(6212):954-9.
18. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res*. 5 janv 2012;22(5):850-9.
19. Blank IH. PENETRATION OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT ALCOHOLS INTO SKIN. I. EFFECT OF CONCENTRATION OF ALCOHOL AND TYPE OF VEHICLE. *J Invest Dermatol*. nov 1964;43:415-20.
20. Scheuplein RJ. Mechanism of Percutaneous Adsorption: I. Routes of Penetration and the Influence of Solubility*. *J Invest Dermatol*. 1 nov 1965;45(5):334-46.
21. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev*. 1 nov 2002;54:S3-17.
22. Kwan YH, Tung YK, Kochhar JS, Hairui L, Poh AL, Kang L. *Handbook of Cosmeceutical Excipients and their Safeties*. Elsevier; 2014. 359 p.
23. Bolzinger MA, Briançon S, Pelletier J, Chevalier Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 1 juin 2012;17(3):156-65.
24. Bos JD, Meinardi MMHM. The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Exp Dermatol*. 2000;9(3):165-9.
25. Zhai Y, Zhai G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. *J Controlled Release*. 10 nov 2014;193:90-9.
26. Förster M, Bolzinger MA, Fessi H, Briançon S. Topical delivery of cosmetics and drugs. Molecular aspects of percutaneous absorption and delivery. *Eur J Dermatol EJD*. 2009;19(4):309-23.
27. Puglia C, Blasi P, Rizza L, Schoubben A, Bonina F, Rossi C, et al. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an in vitro and in vivo investigation. *Int J Pharm*. 5 juin 2008;357(1-2):295-304.
28. Mohammed D, Hirata K, Hadgraft J, Lane ME. Influence of skin penetration enhancers on skin barrier function and skin protease activity. *Eur J Pharm Sci*. 23 janv 2014;51:118-22.
29. Marti-Mestres G. Promotion de l'absorption cutanée en cosmétologie : formulations et instruments. *Ann Dermatol Vénéréologie - FMC*. 1 sept 2022;2(6):448-58.

30. Egorova KS, Gordeev EG, Ananikov VP. Biological Activity of Ionic Liquids and Their Application in Pharmaceuticals and Medicine. *Chem Rev.* 24 mai 2017;117(10):7132-89.
31. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed RK, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem Commun.* 1 janv 2003;(1):70-1.
32. Diagrammes de phases [Internet]. [cité 21 févr 2023]. Disponible sur: <http://ressources.univ-lemans.fr/AccesLibre/UM/Pedago/chimie/06/deug/CHIM201A/phases.html>
33. Makoś P, Słupek E, Gębicki J. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review. *Microchem J.* 1 janv 2020;152:104384.
34. Al-Akayleh F, Mohammed Ali HH, Ghareeb MM, Al-Remawi M. Therapeutic deep eutectic system of capric acid and menthol: Characterization and pharmaceutical application. *J Drug Deliv Sci Technol.* 1 oct 2019;53:101159.
35. Sakuragi M, Maeda E, Kusakabe K. Penetration Process of a Hydrated Deep Eutectic Solvent Through the Stratum Corneum and its Application as a Protein Penetration Enhancer. *ChemistryOpen.* 2020;9(9):953-8.
36. Wils L, Leman-Loubière C, Bellin N, Clément-Larosière B, Pinault M, Chevalier S, et al. Natural deep eutectic solvent formulations for spirulina: Preparation, intensification, and skin impact. *Algal Res.* 1 juin 2021;56:102317.
37. Pan C, Zhao L, Zhao D. Microwave-assisted green extraction of antioxidant components from *Osmanthus fragrans* (Lour) flower using natural deep eutectic solvents. *J Appl Res Med Aromat Plants.* 1 févr 2021;20:100285.
38. Macchioni V, Carbone K, Cataldo A, Frascini R, Bellucci S. Lactic acid-based deep natural eutectic solvents for the extraction of bioactive metabolites of *Humulus lupulus* L.: Supramolecular organization, phytochemical profiling and biological activity. *Sep Purif Technol.* 1 juin 2021;264:118039.
39. Duarte ARC, Ferreira ASD, Barreiros S, Cabrita E, Reis RL, Paiva A. A comparison between pure active pharmaceutical ingredients and therapeutic deep eutectic solvents: Solubility and permeability studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 1 mai 2017;114:296-304.
40. Shamseddin A, Crauste C, Durand E, Villeneuve P, Dubois G, Durand T, et al. Resveratrol formulated with a natural deep eutectic solvent inhibits active matrix metalloprotease-9 in hormetic conditions. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2017;119(11):1700171.
41. Radošević K, Ćurko N, Gaurina Srček V, Cvjetko Bubalo M, Tomašević M, Kovačević Ganić K, et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT.* 1 nov 2016;73:45-51.
42. Stott PW, Williams AC, Barry BW. Transdermal delivery from eutectic systems: enhanced permeation of a model drug, ibuprofen. *J Controlled Release.* 2 janv 1998;50(1):297-308.

43. Morrison HG, Sun CC, Neervannan S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int J Pharm.* 13 août 2009;378(1):136-9.
44. Panda S, Kundu K, Kiefer J, Umapathy S, Gardas RL. Molecular-Level Insights into the Microstructure of a Hydrated and Nanoconfined Deep Eutectic Solvent. *J Phys Chem B.* 18 avr 2019;123(15):3359-71.
45. Chen Z, Ragauskas A, Wan C. Lignin extraction and upgrading using deep eutectic solvents. *Ind Crops Prod.* 1 mai 2020;147:112241.
46. Liu Y, Wu Y, Liu J, Wang W, Yang Q, Yang G. Deep eutectic solvents: Recent advances in fabrication approaches and pharmaceutical applications. *Int J Pharm.* 25 juin 2022;622:121811.
47. Gomez FJV, Espino M, Fernández MA, Silva MF. A Greener Approach to Prepare Natural Deep Eutectic Solvents. *ChemistrySelect.* 15 juin 2018;3(22):6122-5.
48. Santana APR, Mora-Vargas JA, Guimarães TGS, Amaral CDB, Oliveira A, Gonzalez MH. Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods. *J Mol Liq.* 1 nov 2019;293:111452.
49. Florindo C, Oliveira FS, Rebelo LPN, Fernandes AM, Marrucho IM. Insights into the Synthesis and Properties of Deep Eutectic Solvents Based on Cholinium Chloride and Carboxylic Acids. *ACS Sustain Chem Eng.* 6 oct 2014;2(10):2416-25.
50. Wolbert F, Brandenbusch C, Sadowski G. Selecting Excipients Forming Therapeutic Deep Eutectic Systems—A Mechanistic Approach. *Mol Pharm.* 1 juill 2019;16(7):3091-9.
51. Rubin Pedrazzo A, Cecone C, Trotta F, Zanetti M. Mechano-synthesis of β -Cyclodextrin Polymers Based on Natural Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustain Chem Eng.* 8 nov 2021;9(44):14881-9.
52. Crawford DE, Wright LA, James SL, Abbott AP. Efficient continuous synthesis of high purity deep eutectic solvents by twin screw extrusion. *Chem Commun.* 8 mars 2016;52(22):4215-8.
53. Zhou H, Wang Y, Li S, Lu M. Improving chemical stability of resveratrol in hot melt extrusion based on formation of eutectic with nicotinamide. *Int J Pharm.* 25 sept 2021;607:121042.
54. Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, et al. Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J Clean Prod.* 10 mai 2017;151:87-95.
55. Espino M, Solari M, Fernández M de los Á, Boiteux J, Gómez MR, Silva MF. NADES-mediated folk plant extracts as novel antifungal agents against *Candida albicans*. *J Pharm Biomed Anal.* 15 avr 2019;167:15-20.
56. Benoit C, Virginie C, Boris V. Chapter Twelve - The use of NADES to support innovation in the cosmetic industry. In: Verpoorte R, Witkamp GJ, Choi YH, éditeurs. *Advances in Botanical Research* [Internet]. Academic Press; 2021 [cité 24 oct 2022]. p.

- 309-32. (Eutectic Solvents and Stress in Plants; vol. 97). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065229620300525>
57. Kumari P, Kumari M, Kashyap HK. How Pure and Hydrated Reline Deep Eutectic Solvents Affect the Conformation and Stability of Lysozyme: Insights from Atomistic Molecular Dynamics Simulations. *J Phys Chem B*. 31 déc 2020;124(52):11919-27.
 58. Olivares B, Martínez FA, Ezquer M, Morales BJ, Fuentes I, Calvo M, et al. Betaine-urea deep eutectic solvent improves imipenem antibiotic activity. *J Mol Liq*. 15 mars 2022;350:118551.
 59. Lu C, Cao J, Wang N, Su E. Significantly improving the solubility of non-steroidal anti-inflammatory drugs in deep eutectic solvents for potential non-aqueous liquid administration. *MedChemComm*. 19 mai 2016;7(5):955-9.
 60. Hilali S, Wils L, Chevalley A, Clément-Larosière B, Boudesocque-Delaye L. Glycerol-based NaDES as green solvents for ultrasound-assisted extraction of phycocyanin from *Arthrospira platensis*—RSM optimization and ANN modelling. *Biomass Convers Biorefinery*. 1 juill 2022;12(1):157-70.
 61. Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH. Characterization and antimicrobial phototoxicity of curcumin dissolved in natural deep eutectic solvents. *Eur J Pharm Sci*. 1 déc 2015;80:26-32.
 62. Wikene KO, Bruzell E, Tønnesen HH. Improved antibacterial phototoxicity of a neutral porphyrin in natural deep eutectic solvents. *J Photochem Photobiol B*. 1 juill 2015;148:188-96.
 63. Solvants eutectiques profonds [Internet]. Techniques de l'Ingénieur. [cité 2 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/voies-de-synthese-et-solvants-alternatifs-42492210/solvants-eutectiques-profonds-chv4002/>
 64. Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem*. 15 nov 2015;187:14-9.
 65. Ribeiro BD, Florindo C, Iff LC, Coelho MAZ, Marrucho IM. Menthol-based Eutectic Mixtures: Hydrophobic Low Viscosity Solvents. *ACS Sustain Chem Eng*. 5 oct 2015;3(10):2469-77.
 66. Reichardt C. Pyridinium N-phenolate betaine dyes as empirical indicators of solvent polarity: Some new findings. *Pure Appl Chem*. 1 janv 2004;76(10):1903-19.
 67. Prabakaran G, Sampathkumar P, Kavisri M, Moovendhan M. Extraction and characterization of phycocyanin from *Spirulina platensis* and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect. *Int J Biol Macromol*. 15 juin 2020;153:256-63.
 68. Punzo A, Porru E, Silla A, Simoni P, Galletti P, Roda A, et al. Grape Pomace for Topical Application: Green NaDES Sustainable Extraction, Skin Permeation Studies, Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities Characterization in 3D Human Keratinocytes. *Biomolecules*. 10 août 2021;11(8):1181.

69. Boscarior R, Caetano ÉA, Silva EC, Oliveira TJ, Rosa-Castro RM, Vila MMDC, et al. Performance of Choline Geranate Deep Eutectic Solvent as Transdermal Permeation Enhancer: An In Vitro Skin Histological Study. *Pharmaceutics*. avr 2021;13(4):540.
70. Méthodes couramment utilisées pour étudier la cytotoxicité cellulaire | Promega France [Internet]. [cité 5 déc 2022]. Disponible sur: <https://france.promega.com/c/blog/articles/methodes-utilisees-pour-etudier-la-cytotoxicite-cellulaire/>
71. Nystedt HL, Grønlien KG, Tønnesen HH. Interactions of natural deep eutectic solvents (NADES) with artificial and natural membranes. *J Mol Liq*. 15 avr 2021;328:115452.
72. Pedro SN, Gomes ATPC, Oskoei P, Oliveira H, Almeida A, Freire MG, et al. Boosting antibiotics performance by new formulations with deep eutectic solvents. *Int J Pharm*. 25 mars 2022;616:121566.
73. Wikene KO, Rukke HV, Bruzell E, Tønnesen HH. Investigation of the antimicrobial effect of natural deep eutectic solvents (NADES) as solvents in antimicrobial photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 1 juin 2017;171:27-33.
74. Zakrewsky M, Banerjee A, Apte S, Kern TL, Jones MR, Sesto RED, et al. Choline and Geranate Deep Eutectic Solvent as a Broad-Spectrum Antiseptic Agent for Preventive and Therapeutic Applications. *Adv Healthc Mater*. 1 juin 2016;5(11):1282-9.
75. Kim J, Kim BE, Ahn K, Leung DYM. Interactions Between Atopic Dermatitis and *Staphylococcus aureus* Infection: Clinical Implications. *Allergy Asthma Immunol Res*. 8 juill 2019;11(5):593-603.
76. Parlet CP, Brown MM, Horswill AR. Commensal *Staphylococci* Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *Trends Microbiol*. juin 2019;27(6):497-507.
77. Geoghegan JA, Irvine AD, Foster TJ. *Staphylococcus aureus* and Atopic Dermatitis: A Complex and Evolving Relationship. *Trends Microbiol*. 1 juin 2018;26(6):484-97.
78. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother*. juin 2005;49(6):2474-8.
79. Macário IPE, Oliveira H, Menezes AC, Ventura SPM, Pereira JL, Gonçalves AMM, et al. Cytotoxicity profiling of deep eutectic solvents to human skin cells. *Sci Rep*. 8 mars 2019;9(1):3932.
80. Tsuchido T, Hiraoka T, Takano M, Shibasaki I. Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids. *J Bacteriol*. avr 1985;162(1):42-6.
81. Ahama-Eseh K, Bodet C, Quashie-Mensah-Attoh A, Garcia M, Théry-Koné I, Dorat J, et al. Anti-inflammatory activity of *Crateva adansonii* DC on keratinocytes infected by *Staphylococcus aureus*: From traditional practice to scientific approach using HPTLC-densitometry. *J Ethnopharmacol*. 23 mai 2017;204:26-35.

82. Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*. avr 1958;181(4617):1199-200.
83. Sokmen A, Gulluce M, Askin Akpulat H, Daferera D, Tepe B, Polissiou M, et al. The in vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of endemic *Thymus spathulifolius*. *Food Control*. 1 déc 2004;15(8):627-34.
84. Oktaviyanti ND, Kartini, Mun'im A. Application and optimization of ultrasound-assisted deep eutectic solvent for the extraction of new skin-lightening cosmetic materials from *Ixora javanica* flower. *Heliyon*. 1 nov 2019;5(11):e02950.
85. Kanlayavattanukul M, Lourith N, Chaikul P. Biological activity and phytochemical profiles of *Dendrobium*: A new source for specialty cosmetic materials. *Ind Crops Prod*. 15 sept 2018;120:61-70.
86. Grønlien KG, Pedersen ME, Tønnesen HH. A natural deep eutectic solvent (NADES) as potential excipient in collagen-based products. *Int J Biol Macromol*. 1 août 2020;156:394-402.
87. Andonegi M, de la Caba K, Guerrero P. Effect of citric acid on collagen sheets processed by compression. *Food Hydrocoll*. 1 mars 2020;100:105427.
88. Murrieta-Martínez C, Soto-Valdez H, Pacheco-Aguilar R, Torres-Arreola W, Rodríguez-Félix F, Ramírez-Wong B, et al. Effect of Different Polyalcohols as Plasticizers on the Functional Properties of Squid Protein Film (*Dosidicus Gigas*). *Coatings*. févr 2019;9(2):77.
89. Qu W, Häkkinen R, Allen J, D'Agostino C, Abbott AP. Globular and Fibrous Proteins Modified with Deep Eutectic Solvents: Materials for Drug Delivery. *Molecules*. 4 oct 2019;24(19):3583.
90. Beiu C, Mihai M, Popa L, Cima L, Popescu MN. Frequent Hand Washing for COVID-19 Prevention Can Cause Hand Dermatitis: Management Tips. *Cureus* [Internet]. 2 avr 2020 [cité 17 nov 2022];12(4). Disponible sur: <https://www.cureus.com/articles/29917-frequent-hand-washing-for-covid-19-prevention-can-cause-hand-dermatitis-management-tips>
91. Shevachman M, Mandal A, Gelston K, Mitragotri S, Joshi N. A Long-Lasting Skin Protectant Based on CG-101, a Deep Eutectic Solvent Comprising Choline and Geranic Acid. *Glob Chall*. 2022;6(11):2200064.
92. Chen C, Wang Y, Jiang W, Zhu C, Yao S. Transdermal release behaviors of bioactive deep eutectic solvents as natural skin care and mechanism. *J Mol Liq*. 1 déc 2022;367:120412.
93. Panić M, Gunjević V, Radošević K, Cvjetko Bubalo M, Ganić KK, Redovniković IR. COSMOtherm as an Effective Tool for Selection of Deep Eutectic Solvents Based Ready-To-Use Extracts from Graševina Grape Pomace. *Molecules*. janv 2021;26(16):4722.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) NGUYEN Hoang Truc Phuong

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : **21209932**

N° Thèse : **97**

Nom et Prénom : **NGUYEN Hoang Truc Phuong**

Sujet : **Utilisation des solvants eutectiques profonds dans le développement
de médicaments à visée cutanée**

Tours, le : **01/03/2023**

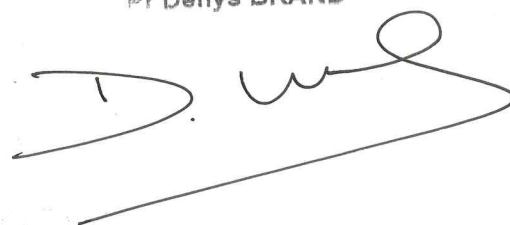
Le(s) Directeur(s) de Thèse :



**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



NOM, PRÉNOM de l'étudiant NGUYEN Hoang Truc Phuong

N° 97

TITRE DE LA THÈSE

Utilisation des solvants eutectiques profonds dans le développement de médicaments à visée cutanée

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain. Elle constitue une voie d'administration courante pour le traitement de pathologies locales mais possède également un grand intérêt en tant qu'alternative aux voies orales et injectables pour une action systémique. Cependant les spécialités pharmaceutiques destinées aux voies cutanées et transcutanées restent peu nombreuses, en particulier à cause de la faible perméabilité de la barrière cutanée aux molécules actives. Un grand nombre de chercheurs sont mobilisés dans le développement de nouvelles formes pharmaceutiques ou de nouveaux ingrédients permettant d'exploiter au mieux les voies cutanées et transcutanées. Parmi les domaines explorés, l'utilisation de solvants eutectiques profonds paraît l'une des plus intéressantes, du fait des multiples propriétés de ces solvants de nouvelles générations en matière de solubilisation des substances actives peu solubles dans l'eau ou les huiles, de stabilisation de ces substances et d'augmentation de la diffusion cutanée. Cette thèse propose, après avoir défini ce que sont ces nouveaux excipients potentiels et présenté leurs spécificités, un instantané des avancées de la recherche concernant les solvants eutectiques profonds dans le domaine de la dermatologie et de la cosmétologie

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

solvant eutectique profond, délivrance cutanée, formulation

JURY

PRÉSIDENT : Mme BOUDESOCQUE-DELAYE Leslie, Professeur, Pharmacien, Faculté de Pharmacie de Tours

MEMBRES :

Mme MUNNIER Emilie, Professeur, Pharmacien, Faculté de Pharmacie de Tours

M. GOMBAULT Louis-Nicolas, Ingénieur, Pharmacien, Novéal (groupe L'Oréal) au Thillay

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE le 13 décembre 2022, à Tours