

Titre: Caractérisation d'une formulation de cannabidiol (CBD) libre et nanoencapsulé dans un polymère biodégradable de poly-(ester amide urée) pour le soulagement de la douleur inflammatoire chronique
Title: Characterization of a free and nanoencapsulated CBD formulation in a biodegradable polymer of poly-(ester amide urea) for the relief of chronic inflammatory pain

Auteur: Ève Lefebvre
Author: Ève Lefebvre

Date: 2024

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Lefebvre, È. (2024). Caractérisation d'une formulation de cannabidiol (CBD) libre et nanoencapsulé dans un polymère biodégradable de poly-(ester amide urée) pour le soulagement de la douleur inflammatoire chronique [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/61097/>

Document en libre accès dans PolyPublie Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/61097/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: L'Hocine Yahia, & Nancy Tawil
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Caractérisation d'une formulation de cannabidiol (CBD) libre et
nanoencapsulé dans un polymère biodégradable de poly-(ester amide urée)
pour le soulagement de la douleur inflammatoire chronique**

ÈVE LEFEBVRE

Institut de génie biomédical

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie biomédical

Octobre 2024

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation d'une formulation de cannabidiol (CBD) libre et nanoencapsulé dans un polymère biodégradable de poly-(ester amide urée) pour le soulagement de la douleur inflammatoire chronique

présenté par **Ève LEFEBVRE**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Marc LAVERTU, président

L'Hocine YAHIA, membre et directeur de recherche

Nancy TAWIL, membre et codirectrice de recherche

Gregory DE CRESCENZO, membre

REMERCIEMENTS

Je voudrais exprimer ma plus sincère gratitude à mon directeur de recherche Dr. L'Hocine Yahia, professeur titulaire du département de génie mécanique de l'école Polytechnique Montréal, et ma co-directrice de recherche Dre. Nancy Tawil, responsable scientifique en chef chez Precisio Biotix Therapeutics, présidente à Qeen-Bio Technologies et professeure adjointe à l'école Polytechnique Montréal pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet de recherche et de m'avoir soutenu et aidé tout au long de cette maitrise. Leurs conseils précieux m'ont permis de réaliser les différentes étapes de ma recherche et d'accomplir mon projet.

De plus, je tiens à remercier Tristan Lépine, candidat au doctorat, et Simon DeGrandpré, MSc, pour leur aide, leurs suggestions et leur mentorat dans mon projet.

Je voudrais également exprimer ma gratitude envers l'organisme MITACS, qui, à travers son programme de bourse Accélération, m'a fourni l'aide financière permettant la réussite de ce projet. Enfin, je voudrais remercier spécialement ma famille et mes amis pour tout leur soutien lors de mes études supérieures.

RÉSUMÉ

L'inflammation est un processus naturel et essentiel au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Cependant, lorsqu'un dérèglement de ce système survient, l'inflammation peut devenir chronique et causer des dommages à l'organisme. Les conditions inflammatoires chroniques résultantes, telle que l'arthrite, ne comportent actuellement aucune cure et atteignent un nombre croissant de gens à chaque année, notamment en raison d'un mode de vie plus sédentaire, d'une population vieillissante ainsi que d'une augmentation de diverses conditions adjacentes, telles que l'obésité. Au Canada, il est estimé que le nombre de personnes souffrant de l'arthrite passera de 6 millions à 9 millions de personnes d'ici 2040. Ainsi, outre que les méthodes non pharmaceutiques, telles que la physiothérapie, la stimulation nerveuse électrique et l'acupuncture, la gestion de la douleur arthritique implique généralement des médicaments qui peuvent soulager la douleur et ralentir les lésions articulaires tout en limitant l'inflammation. On parle notamment d'anti-inflammatoires non stéroïdiens, d'opioïdes, de médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie ainsi que de corticostéroïdes. Cependant, ces modes de traitements conventionnels comportent leur lot d'effets secondaires, tels que le développement de complications gastrointestinales, de maladies cardiovasculaires, d'hépatotoxicité, de dépendance physique et d'immunosuppression, pour n'en nommer que quelques-uns. Cette lacune illustre ainsi le besoin de développer de nouvelles thérapies limitant les effets indésirables chez les patients. Le cannabidiol (CBD) est le composé majoritaire non psychotrope de la plante *Cannabis sativa* et pourrait servir de thérapie alternative. En effet, ce composé présente un lot d'effets bénéfiques, tels qu'un potentiel anti-inflammatoire, analgésique et antioxydant, qui pourraient servir à diminuer l'inflammation et la douleur chez les patients. Cependant, l'administration orale de ce composé est associée à une faible biodisponibilité, soit d'environ 6-19%, notamment en raison de sa dégradation par le premier passage hépatique, de son instabilité en pH gastrique, de sa haute hydrophobicité et des risques d'effets secondaires associés à de hautes doses requises afin d'avoir un effet thérapeutique. Son administration transdermique permettrait ainsi une diminution de la dose requise et des potentiels effets secondaires en raison de l'application locale du composé. Or, la haute hydrophobicité du CBD tend à son accumulation dans le stratum corneum de la peau, ce qui limite la pénétration de ce composé dans les couches profondes de la peau. Ainsi, la nanoencapsulation du CBD dans un polymère biodégradable de poly-(ester amide urée) (PEAU) permet de contourner ce problème tout en permettant un relargage soutenu et constant menant à un soulagement à plus long terme des

symptômes arthritiques. L’encapsulation du CBD lui confère également une protection jusqu’au site inflammatoire, permet de réduire la toxicité potentielle de ce composé et permet un relargage ciblé. Un tel système de relargage, c'est-à-dire de différents systèmes de CBD nanoencapsulé dans un polymère PEAU en suspension dans une phase d'alcool polyvinyle, est présentement en cours de développement dans les laboratoires de Qeen-Bio Therapeutics. Cependant, la caractérisation du système demeure requise. Ainsi, le potentiel de réépithérialisation à la suite d'un dommage tissulaire a été évalué sur un modèle de peau synthétique humain complet en présence de la formulation V2.5 (Tawil et Lépine, 2023). La sécurité de la formulation V8.4 a également été évalué grâce à des tests de mutagénicité sur *Salmonella typhimurium* (test AMES) et de cytotoxicité au MTT sur une lignée de fibroblastes L929. Pour finir, le potentiel préliminaire anti-inflammatoire de la formulation V8.4 a été évalué sur une lignée de macrophages RAW264.7 (Tawil et Lépine, 2023). Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet suggèrent une absence de réépithérialisation de la formulation V2.5 et tend vers une absence de cytotoxicité et de mutagénicité ainsi que la présence d'un potentiel préliminaire anti-inflammatoire de la formulation V8.4.

ABSTRACT

Inflammation is a natural and essential process for maintaining homeostasis in the body. However, when a disruption of this system occurs, inflammation becomes chronic and causes damage to the body. The resulting chronic inflammatory conditions, such as arthritis, currently have no cure and affect an increasing number of people each year, particularly due to a more sedentary lifestyle, an aging population, and an increase in various adjacent conditions, such as obesity. In Canada, it is estimated that the number of people suffering from arthritis will increase from 6 million to 9 million people by 2040. Thus, in addition to non-pharmaceutical methods, such as physiotherapy, electrical nerve stimulation and acupuncture, managing arthritis pain usually involves medications that can relieve pain and slow joint damage while limiting inflammation. These include non-steroidal anti-inflammatory drugs, opioids, disease-modifying anti-rheumatic drugs, and corticosteroids. However, these conventional treatment methods come with their share of side effects, such as the development of gastrointestinal complications, cardiovascular diseases, hepatotoxicity, physical dependence, and immunosuppression to name a few. This gap thus illustrates the need to develop new therapies limiting unwanted effects in patients. Cannabidiol (CBD) is the major non-psychotropic compound in the *Cannabis sativa* plant and could serve as an alternative therapy. Moreover, this compound presents a wide range of beneficial effects, such as anti-inflammatory, analgesic and antioxidant potential, which could serve to reduce inflammation and pain in patients. However, the oral administration of this compound is associated with a low bioavailability, i.e. around 6-19%, due to its degradation by the first hepatic passage, its instability in gastric pH, its high hydrophobicity and the risks of side effects associated with high doses required to have a therapeutic effect. Its transdermal administration would thus allow a reduction in the required dose and potential side effects due to the local application of the compound. However, the high hydrophobicity of CBD tends to the accumulation of this compound in the stratum corneum of the skin, which limits its penetration into the deeper layers of the skin. Thus, nanoencapsulation of CBD in a biodegradable poly- (ester amide urea) polymer (PEAU) circumvents this problem while allowing sustained and constant release, leading to longer-term relief of arthritic symptoms. The encapsulation of CBD also gives it protection up to the inflammatory site, helps reduce the potential toxicity of this compound and allows targeted release. Such release systems of CBD nanoencapsulated in a PEAU polymer suspended in a polyvinyl alcohol phase are currently under development in the Qeen-Bio Therapeutics laboratories. However, characterization of the system

remains required. Thus, the potential for re-epithelialization following tissue damage was evaluated on a complete human synthetic skin model in the presence of the V2.5 formulation (Tawil et Lépine, 2023). The safety of the V8.4 formulation was also evaluated using mutagenicity tests on *Salmonella typhimurium* (AMES test) and MTT cytotoxicity on an L929 fibroblast line. Finally, the preliminary anti-inflammatory potential of the V8.4 formulation was evaluated on a RAW264.7 macrophage line (Tawil et Lépine. 2023). The results obtained in this project suggest an absence of re-epithelialization of the V2.5 formulation, an absence of cytotoxicity and mutagenicity, as well as a preliminary anti-inflammatory potential of the V8.4 formulation.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	III
RÉSUMÉ.....	IV
ABSTRACT	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XV
LISTE DES ANNEXES.....	XVII
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 La réponse inflammatoire et l'état inflammatoire pathologique.....	4
2.1.1 Le système inné	4
2.1.2 Le système adaptatif.....	6
2.1.3 L'inflammation chronique.....	7
2.1.4 La polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose.....	8
2.1.5 Les traitements actuels de l'arthrite	12
2.1.5.1 Les NSAIDs	12
2.1.5.2 Les opioïdes.....	13
2.1.5.3 Les DMARDs.....	14
2.1.5.4 Les Corticostéroïdes	14
2.2 Les cannabinoïdes	17
2.2.1 Le système endocannabinoïde.....	17
2.2.2 Les phytocannabinoïdes	19
2.2.3 Les effets thérapeutiques du CBD.....	20

2.2.3.1	Les effets directes et indirectes sur le système endocannabinoïde.....	20
2.2.3.2	Les GPCRs	22
2.2.3.3	Les canaux ioniques	23
2.2.3.4	Le récepteur nucléaire	23
2.2.4	Les traitements à base de cannabinoïdes présentement approuvés dans les pays occidentaux.....	25
2.2.4.1	Santé Canada au Canada	25
2.2.4.2	Food and Drug Administration (FDA) au États-Unis	25
2.2.4.3	L'agence européenne de médecine (EMA) en Europe.....	26
2.2.5	L'administration de CBD	26
2.2.5.1	L'administration orale	27
2.2.5.2	Les routes alternatives : intranasale, rectale et intraveineuse.....	27
2.2.5.3	L'administration topique et transdermique	28
2.2.6	Des nanocapsules de poly- (ester amide urée)	30
CHAPITRE 3	PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF DU PROJET	34
3.1	Problématique.....	34
3.2	Question de recherche	34
3.3	Hypothèses	34
3.4	Objectifs	35
CHAPITRE 4	MÉTHODES	36
4.1	Réactifs.....	36
4.2	Culture cellulaire	36
4.3	Test de fermeture de la plaie	36
4.4	Test de mutagénicité sur <i>Salmonella typhimurium</i> (test AMES)	37
4.5	Test de cytotoxicité MTT sur fibroblastes L929	38

4.6	Quantification par ELISA de TNF- α et IL-10 sécrété par des macrophages RAW264.7 conditionnés au LPS	39
4.7	Analyses	39
CHAPITRE 5 RÉSULTATS ET DISCUSSION.....		40
5.1	Test de fermeture de la plaie	40
5.2	L'absence de mutagénicité sur les 4 souches de <i>Salmonella typhimurium</i> est observée à la suite du traitement de V8.4.....	42
5.3	Il y a une absence de cytotoxicité chez les fibroblastes L929 en présence des capsules vides, de l'huile de CBD et de la formulation V8.4.....	47
5.4	Un effet préliminaire anti-inflammatoire chez les macrophages RAW264.7 en présence de la formulation V8.4 (1 :100) est observé.....	48
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		52
RÉFÉRENCES		53
ANNEXE		64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 État actuel des traitements pharmacologiques de l'arthrite.....	16
Tableau 2.2 Paramètres de fabrication des formulations V2.5 et V8.4.....	32
Tableau 4.1 Contrôles utilisés dans le test AMES.	38
Tableau 5.1 Croissance bactérienne attendues des souches utilisées pour le AMES	44
Tableau 5.2 Effet de V8.4 à différentes concentrations sur 4 souches de <i>Salmonella</i> mesuré AMES.	
.....	46

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Étapes clés de la réponse inflammatoire innée (adapté de Penk, 2020). Dans cet exemple, les PRRs activés modulent la réponse inflammatoire en engendrant la vasodilatation des vaisseaux sanguins ainsi que le recrutement accru de cellules immunitaires, menant ultimement à la phagocytose et à l'élimination du stimuli nocif.	5
Figure 2.2 Proportion de personnes souffrant d'arthrite également atteintes d'autres maladies chroniques (Badley et al., 2019). Les personnes atteintes d'arthrite présentent un risque accru de développer une autre condition chronique sous-adjacente.	8
Figure 2.3 Structure de l'articulation synoviale (Biorender, 2023). La capsule synoviale englobe la membrane synoviale sécrétrice du liquide synovial, le cartilage articulaire à l'interface os-articulation, ainsi que la cavité articulaire abritant le liquide synovial.	9
Figure 2.4 Mécanismes impliqués dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde (adapté de Team, 2023). La formation de néoantigènes face à des protéines biochimiquement modifiées mène à la production d'anticorps pouvant activer les cellules immunitaires. Les médiateurs inflammatoires libérés mènent à l'activation de RANK/RANKL/OPG et entraînent la formation d'ostéoclastes et d'érosion osseuse, tout en acquérant des caractéristiques invasives. L'activation chondrocytaire par les médiateurs inflammatoires mène également à la dégradation cartilagineuse.....	10
Figure 2.5 Développement de l'arthrose débutant avec le relâchement de DAMPs dans l'articulation (adapté de Pons, 2022). La liaison des alarmines aux PPRs de l'espace synovial induit l'activation de voies transcriptionnelles inflammatoires, telle que NF-κB et AP-1, menant à une amplification du phénotype inflammatoire, notamment la dégradation articulaire et cartilagineuse, le remodelage osseux, l'hypertrophie de la capsule articulaire et l'inflammation synoviale.....	12
Figure 2.6 Structures chimiques des 2 endocannabinoïdes principaux.....	18
Figure 2.7 Structures chimiques des deux phytocannabinoïdes principaux.....	19
Figure 2.8 Aperçu simplifié des principaux effets anti-inflammatoires et analgésiques du CBD (Lefebvre et al., 2024). Le CBD agit directement et indirectement sur le système endocannabinoïde (CB1/2 :récepteurs à cannabinoïdes 1/2, AEA : anandamide, 2AG : 2-	

arachidonoyl glycérol, FAAH : hydrolase d'amide d'acide gras 1), sur les canaux ionotropiques (TRPV1/2 : canal potentiel de récepteur transitoire vanilloïde 1/2, TRPA1 : canal potentiel de récepteur transitoire ankyrine 1), sur des récepteurs couplés à la protéine G (GPR55, 5-HT : récepteur de la sérotonine 1A, A2AR : le récepteur de l'adénosine A2A) et sur un récepteur nucléaire (PPAR γ : récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes).	24
Figure 2.9 Récepteurs du cannabidiol de la peau (Lefebvre et al., 2024). La présence de récepteurs à CBD dans la peau suggère une action locale de la part du composé dans ce tissu, menant à une biodisponibilité augmentée du composé au site actif, à des effets secondaires minimaux ainsi qu'à une dose administrée plus basse que celle associée aux modes conventionnels. .	29
Figure 2.10 Stratégie de livraison du CBD (Xu et al., 2020). La perméation du CBD dans la peau peut être réalisée grâce à l'une ou plusieurs des stratégies mentionnées ci-dessus.	30
Figure 2.11 Structure générale à la base du polymère PEAU (Tawil et al. 2020). Celui-ci est composé d'acide aminés, notamment de L-leucine.	31
Figure 2.12 Méthode simplifiée de fabrication des nanocapsules utilisées dans le projet. La solution aqueuse de cannabidiol et de kolliphore P188 est ajoutée à la solution organique de polymère PEAU et de dichlorométhane, puis homogénéisée. L'émulsion 1 « eau-huile » est ensuite ajoutée à une solution aqueuse d'alcool polyvinyle et homogénéisée pour former l'émulsion 2 « eau-huile-eau ». L'évaporation du DCM permet le durcissement des capsules.	33
Figure 5.1 Effet du système de relargage (avec et sans CBD) sur la fermeture d'une plaie dans un modèle de peau synthétique EpiDermFT TM , teint à l'hématoxylene and éosine. La formulation et les capsules ne semblent pas contribuer à la fermeture de la plaie.	42
Figure 5.2 Le phénotype des souches TA98, TA100, TA1535 et TA1537 correspond au génotype attendu de ces souches. Celle-ci sont ainsi propices à l'évaluation du caractère mutagénique de la formulation.	43
Figure 5.3 Effet du système de relargage (avec et sans CBD) sur la viabilité de fibroblastes L929, mesuré par MTT (n=3). Les conditions sont les suivantes 1. DMEM + 10% FBS + 1% PS 2. Triton X-100 (1%) 3. Capsules (1 :1000) 4. Huile (1,5 μ g/ml) 5. V8.4 (1 :100) 6. V8.4	

(1 :1000) **7.** V8.4 (1 :10000). Les résultats significatifs ($p<0,05$) sont indiqués par des astérides.....48

Figure 5.4 Effets du système de relargage (avec et sans CBD) sur la production de TNF- α et d'IL-10 de macrophage RAW264.7, mesuré par ELISA (n=2 et n=3). Les conditions sont les suivantes **1.** Hydrocortisone 50 μ M **2.** Cellules non traitées **3.** Capsules (1 :1000) **4.** Huile (100ng/ml) **5.** V8.4 (1 :100) **6.** V8.4 (1 :1000) **7.** V8.4 (1 :10000). Les lettres signifient les résultats significatifs ($p<0,05$).....51

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

AA	Acide arachidonique
AEA	Arachidonoyl éthanolamide/anandamide
A2AR	Récepteur de l'adénosine A2A
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	Protéine activatrice 1
CB1/2	Récepteur de cannabinoïde 1/2
CBD	Cannabidiol
CBDA	Acide cannabidiolique
CBR	Récepteur de cannabinoïde
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX	Cyclooxygénase
CYP450	Cytochrome P450
DAMP	Modèles moléculaires associés aux dommages
DMARD	Médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie
ECS	Système endocannabinoïde
EMA	Agence européenne de médecine
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
IL	Interleukines
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Protéine kinase activée par les mitogènes
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NF-κB	Facteur nucléaire kappa B
NP	Nanoparticule

NSAID	Anti-inflammatoire non stéroïdien
OA	Arthrose
PAMP	Modèles moléculaires associés aux agents pathogènes
PEAU	Poly-(ester amide urée)
PPAR γ	Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes
PR	Polyarthrite rhumatoïde
PRR	Récepteurs de reconnaissance de formes
PVA	Alcool polyvinyle
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SC	Stratum corneum
SNC	Système nerveux central
TGF- β	Facteur de croissance transformant bêta
Tc	Lymphocytes T cytotoxiques
Th	Lymphocytes T auxiliaire
THC	Tétrahydrocannabinol
THCA	Acide tétrahydrocannabinolique
Treg	Lymphocytes R régulateurs
TRP	Canal potentiel de récepteur transitoire
TRPA	Canal potentiel de récepteur transitoire ankyrine
TRPV	Canal potentiel de récepteur transitoire vanilloïde
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale alpha
2-AG	2-arachidonoyl glycérol
5-HT1A	Récepteur de la sérotonine 1A

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A : Article 1 : Transdermal Delivery of Cannabidiol for the Management of Acute Inflammatory Pain: A Comprehensive Review of the Literature	64
--	----

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Les maladies et conditions inflammatoires chroniques, telle que l'arthrite, ne comportent actuellement aucune cure et engendrent des conséquences économiques, sociales et personnelles pour les gens atteints. D'autant plus, ces personnes sont confrontées à des risques accrus de problèmes de mobilité, de difficultés professionnelles, de problèmes de santé mentale et de problèmes de santé en général par rapport aux gens n'étant pas atteint. De plus cette conditions atteint actuellement 6 millions de Canadiens à elle seule, et ce chiffre devrait dépasser les 9 millions d'ici 2040 (Badley et al., 2019). Autres que les méthodes non-pharmacologiques, telles que la physiothérapie, la stimulation électrique et l'acupuncture, la gestion de la douleur inflammatoire chronique se fait habituellement grâce à des médicaments servant à soulager la douleur et à limiter la progression des dommages articulaires en limitant l'inflammation (Badley et al., 2019; Maqbool et al., 2021). Ainsi, les spécialistes de la santé se tournent habituellement vers les anti-inflammatoires non-stéroïdiens, les corticostéroïdes, les médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie et les opioïdes pour la gestion de cette condition. Cependant, ces traitements comportent leur lot d'effets secondaires, notamment des complications gastrointestinales, des maladies cardiovasculaires, de l'hépatotoxicité, de la dépendance physique et de l'immunosuppression pour n'en nommer que quelques-uns (Benjamin et al., 2022; Benyamin et al., 2008; Bijlsma et al., 1995; Bindu et al., 2020; Goodwin et al., 2009; Katz et al., 2021; Mrid et al., 2022). Ainsi, ces complications adjacentes aux traitements conventionnels pour le traitement et la gestion de la douleur chronique illustrent le besoin flagrant de développer de nouvelles thérapies permettant de minimiser les effets secondaires chez les patients souffrant de ces maladies.

Les phytocannabinoïdes sont une classe de composés biologiques provenant de la plante *Cannabis* ayant un historique d'utilisation remontant à plus de 5000 ans dans la médecine traditionnelle chinoise, et d'environ 3000 ans en Égypte et en Inde. Dans les années 70, certains pays, incluant le Canada et les États-Unis, ont criminalisé et classifié cette plante comme étant une substance illicite en raison des effets psychotropes associés au tétrahydrocannabinol (THC). Or, le changement législatif récent et la décriminalisation du cannabis sont associés à un regain d'intérêt marqué pour cette substance comme agent thérapeutique (Amin et Ali, 2019). Les phytocannabinoïdes les plus abondants et pharmacologiquement pertinents dans les pays occidentaux sont le cannabidiol (CBD) et le Δ^9 -THC, qui sont en majorité dérivés de la plante *Cannabis sativa* (Gülck et Møller, 2020).

Cependant, les effets psychotropes associés au THC limitent son usage thérapeutique. Conséquemment, les chercheurs focussent majoritairement leurs efforts sur le CBD pour le développement de nouveaux traitements, car celui-ci évite les effets psychotropes et euphorisants, maintient un profil sécuritaire, démontre un bas potentiel d'abus et offre un large éventail de bénéfices, incluant des effets antioxydants, anticonvulsifs, analgésiques, anti-tumorigènes, anxiolytiques et anti-inflammatoires (Boyaji et al., 2020; Pagano et al., 2022). Ainsi, le CBD est un candidat attrayant pour le traitement d'une variété de conditions, notamment le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives et les conditions inflammatoires (Pagano et al., 2022).

Malgré les effets thérapeutiques du CBD, l'un des plus grands défis associés à son utilisation comme agent thérapeutique demeure son mode d'administration. En effet, le CBD comporte une faible biodisponibilité, notamment en raison de sa dégradation par le premier passage hépatique, son instabilité en conditions gastriques, sa haute hydrophobie et le risque d'effets secondaires associés à de hautes concentrations plasmatiques (Tijani et al., 2021). Ainsi, de nouvelles stratégies pour son administration se doivent d'être développées afin de compenser ces caractéristiques défavorables. Étant donné que plusieurs récepteurs à CBD sont localisés dans la peau, l'application topique et transdermique de ce composé est attrayante, car elle évite les problèmes associés aux modes d'administration conventionnels et peut ainsi procurer une haute biodisponibilité avec un niveau plasmatique constant tout en maintenant un profil sécuritaire associé à de plus petites doses administrées. D'autant plus, les effets du CBD sont majoritairement locaux, ce qui contribue à diminuer les effets secondaires, ainsi que la dose totale requise afin d'avoir un effet thérapeutique au site inflammatoire (Mahmoudinoodezh et al., 2022).

Ainsi, ce projet portera sur la caractérisation d'un système transdermique de nanocapsules de CBD dans un polymère biodégradable de poly-(ester amide urée) (PEAU) pour la gestion de la douleur inflammatoire chronique, telle que rencontrée dans le cas de l'arthrite, ayant été développé dans les laboratoires de Qeen-Bio Therapeutics (Tawil et Lépine, 2023). Ainsi, ce projet débutera par un bref rappel sur les notions d'inflammation ainsi sur les deux pathologies inflammatoires arthritiques les plus fréquemment rencontrée, soit l'arthrose et la polyarthrite rhumatoïde, ainsi que leurs traitements actuels. La revue de littérature de ce projet poursuivra sur les cannabinoïdes et les cibles anti-inflammatoires et analgésiques du CBD. Les traitements à base de cannabinoïdes présentement approuvés par les agences de réglementation pharmaceutique occidentales de même que les modes d'administration par lequel le CBD peut être administré seront couverts. L'état de

l'art concernant ce projet se terminera sur un bref survol du système de nanocapsules, ainsi que sur les deux formulations ayant été utilisées au cours de ce projet, soit la formulation V2.5 et la formulation V8.4, toutes deux étant composées, selon différents ratios et différents temps d'émulsion, de CBD nanoencapsulé dans un polymère PEAU en suspension dans un phase d'alcool polyvinyle.

Ce projet poursuivra sur les objectifs et hypothèses à la base de ce projet, puis la méthodologie ayant été employée dans la caractérisation du système sera abordée. Ensuite, les résultats et les discussions associés, portant notamment sur le potentiel de réépithérialisation d'une plaie de la formulation V2.5, la caractérisation de la mutagénicité, de la cytotoxicité et du potentiel anti-inflammatoire de la formulation V8.4, seront présentés. À priori, celle-ci comporte tend vers un profil sécuritaire, soit non-mutagénique et non-cytotoxique sur une lignée de fibroblastes L929, n'aide pas à la guérison de plaie et pourrait démontrer des effets préliminaires anti-inflammatoires sur une lignée de macrophages RAW264.7. Ce projet se terminera sur la présentation de l'article ayant été publié dans le cadre de ce projet.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 La réponse inflammatoire et l'état inflammatoire pathologique

Lorsque le corps rencontre des stimuli ou des conditions nocives, tels que des agents pathogènes, des cellules endommagées, des composés toxiques ou des lésions tissulaires, il déclenche une cascade complexe d'événements appelée inflammation (Chen et al., 2017 ; Medzhitov, 2008). Lorsqu'elle est contrôlée, cette inflammation joue un rôle essentiel dans l'homéostasie de l'organisme en éliminant les stimuli nocifs et en initiant le processus de guérison (Chen et al., 2017). Ce système comprend deux parties : les systèmes inné et adaptatif, qui seront tous deux brièvement abordés dans le sous-chapitre suivant. L'inflammation peut également être aiguë, qui survient immédiatement après une insulte tissulaire et qui dure quelques jours, ou chronique, qui dure plusieurs mois, voire plusieurs années (Hannoodee et Nasuruddin, 2021 ; Pahwa et al., 2022). Ainsi, l'évolution de l'état pathologique de l'inflammation, soit l'état chronique, sera également abordée, ainsi que deux pathologies y étant associée et leurs traitements actuels.

2.1.1 Le système inné

Le système inné constitue la première ligne de défense de l'organisme. Qu'il soit activé par un organisme pathogène ou par une particule appartenant au corps, telles qu'une particule associée aux dommages, le système inné déclenche une réponse rapide et non spécifique, assurant l'élimination rapide du stimuli dans les minutes ou les heures suivant l'activation. L'activation du système immunitaire se produit grâce à des modèles moléculaires spécifiques, tels que les modèles moléculaires associés aux agents pathogènes (PAMPs), lorsqu'il s'agit d'un agent infectieux, ainsi que les modèles moléculaires associés aux dommages (DAMPs), lorsqu'il s'agit d'une insulte tissulaire stérile, en se liant aux récepteurs de reconnaissance de formes (PRRs) des cellules résidant dans les tissus, tels que les macrophages, les mastocytes et les cellules dendritiques. Peu importe l'origine inflammatoire, l'interaction de PAMPs ou de DAMPs avec les PRRs induit la libération de diverses cytokines (TNF- α , IL-1 et IL-6), de chimiokines (prostaglandines) et d'autres médiateurs solubles (histamine, espèces réactives de l'oxygène (ROS) et espèces réactives de l'azote (RNS)) à proximité du site d'infection. Simultanément, une phagocytose par les cellules résidantes du tissu se produira pour tenter d'éliminer le stimulus nocif (Owen et al., 2013).

Les médiateurs libérés induisent en autre la vasodilatation des vaisseaux sanguins afin d'augmenter le volume sanguin local, augmentant ainsi la perméabilité des vaisseaux et régulant positivement l'expression des molécules d'adhésion cellulaire. Par conséquent, des signes physiques d'inflammation seront apparents sous forme d'œdème, de rougeur et de chaleur dans les tissus. Cet épithélium enflammé facilite la migration de cellules immunitaires non-résidentes, tels que les leucocytes, vers le site d'infection par extravasation. Les neutrophiles sont les premiers à arriver dans les tissus, où ils améliorent la réponse innée locale en contribuant au processus de phagocytose, suivis par les monocytes qui se différencient en macrophages pour faciliter l'élimination des particules et/ou pathogènes nocifs et ainsi favoriser le processus de guérison. La résolution de l'inflammation et la cicatrisation impliquent l'action de médiateurs anti-inflammatoires, comme l'IL-10 et le TGF- β . Ces médiateurs inhibent la libération de médiateurs pro-inflammatoires, tempèrent l'activation des cellules immunitaires et favorisent les mécanismes de guérison (Owen et al., 2013). Les étapes clés de ce processus sont illustrées dans la figure 2.1.

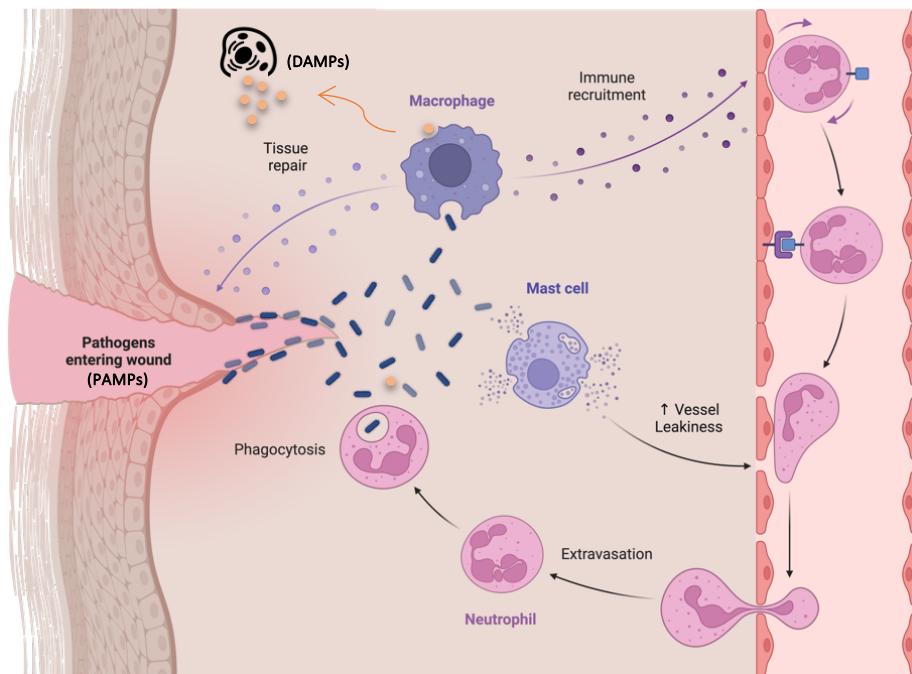


Figure 2.1 Étapes clés de la réponse inflammatoire innée (adapté de Penk, 2020). Dans cet exemple, les PRRs activés modulent la réponse inflammatoire en engendrant la vasodilatation des vaisseaux sanguins ainsi que le recrutement accru de cellules immunitaires, menant ultimement à la phagocytose et à l'élimination du stimulus nocif.

Bien que la réponse innée soit essentielle au maintien de la sécurité de l'organisme, elle ne suffit pas à protéger adéquatement l'organisme contre tous les stimuli nocifs. En effet, ces derniers ont développé des mécanismes afin d'échapper à notre système immunitaire. Par conséquent, des réponses antigéniques spécifiques deviennent nécessaires pour neutraliser ces agents pathogènes (Owen et al., 2013).

2.1.2 Le système adaptatif

En plus de ralentir les infections en générant des réponses antimicrobiennes et pro-inflammatoires, le système immunitaire inné active également des réponses immunitaires adaptatives en initiant la présentation d'agents pathogènes aux lymphocytes, soit les principaux acteurs de la réponse adaptative. Les PRRs des cellules dendritiques peuvent lier des éléments pathogènes à leur surface ou les internaliser pour les transporter vers le tissu lymphoïde. Ainsi, les lymphocytes T et B peuvent reconnaître ces agents pathogènes, conduisant à une activation ultérieure. Dans de nombreux cas, les agents pathogènes internalisés seront dégradés et les peptides dérivés seront présents sur les molécules du CMH de classe II à la surface de la cellule présentatrice de l'antigène (Owen et al., 2013).

Simultanément, la liaison des PAMPs aux PRRs des cellules dendritiques favorise la maturation cellulaire, augmentant le nombre de protéines CMH de classe II à leur surface et l'expression de facteurs de costimulation, tels que CD80 et CD86, reconnus par les lymphocytes T. Les lymphocytes T matures peuvent être classés en trois types : les lymphocytes T auxiliaires (Th), les lymphocytes T cytotoxiques (Tc) ou les lymphocytes T régulateurs (Treg), chacun jouant un rôle essentiel dans la réponse adaptative. Les cellules Th, exprimant le récepteur CD4, activent les cellules Tc, les cellules B et d'autres cellules immunitaires, tandis que les cellules Tc, exprimant le récepteur CD8, éliminent les cellules pathogènes ou infectées. Les cellules Treg, exprimant les récepteurs CD4 et CD25, aident à distinguer les molécules du soi des molécules non-soi pour prévenir les maladies auto-immunes (Owen et al., 2013).

D'autre part, les lymphocytes B peuvent être activés de manière dépendante des lymphocytes T (activation par les lymphocytes Th) ou de manière indépendante des lymphocytes T (par exemple par des polysaccharides étrangers et de l'ADN CpG non méthylé). La protéine complémentaire C3 peut également améliorer l'activation des cellules B en se liant à leur récepteur CD21. Par conséquent, lorsque les cellules B naïves rencontrent un antigène, leur processus de maturation

commence. Ces cellules B naïves expriment ensuite des anticorps liés à la membrane à leur surface. Lorsqu'ils rencontrent un antigène correspondant à leurs récepteurs, ils se divisent pour devenir soit des lymphocytes B mémoires, exprimant les anticorps d'origine à leur surface, soit des lymphocytes B effecteurs capables de sécréter des anticorps plasmatiques. Ces anticorps peuvent à leur tour identifier les pathogènes circulants et contribuer à leur élimination (Owen et al., 2013).

2.1.3 L'inflammation chronique

Certains effecteurs de la phase d'inflammation aiguë, libérés par les cellules du système immunitaire inné, ont des effets cytotoxiques pour faciliter l'élimination des stimuli nocifs. Cependant, ceux-ci n'ont pas la capacité de différencier les cellules hôtes de ces stimuli, ce qui entraîne des lésions tissulaires collatérales (Germolec et al., 2018). Par conséquent, lorsque la réponse inflammatoire aiguë ne parvient pas à les éliminer et ainsi passer à la phase de réparation (impliquant le nettoyage et la réparation des tissus), l'inflammation persiste et acquiert de nouvelles caractéristiques, conduisant à une inflammation à long terme, communément appelée inflammation chronique (Pawha et al. 2022). Outre les causes typiques de l'inflammation, d'autres facteurs, telle qu'une maladie immunitaire, peuvent également déclencher ce type d'inflammation (Medzhitov, 2008).

Pour tenter d'éliminer les stimuli nocifs, la population infiltrante de globules blancs subit des modifications au niveau du site d'inflammation. Les macrophages, les lymphocytes et les protéines plasmatiques infiltrant le tissu deviennent prédominants au niveau local par rapport à la réponse initiale, principalement basée sur les neutrophiles. Ces cellules qui s'accumulent dans les tissus produisent des quantités accrues de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α , ainsi que des peptides, des protéines et des enzymes. Cela amplifie la formation de lésions tissulaires et de mécanismes de réparation secondaires, notamment la formation de fibrose et de granulomes (Germolec et al., 2018 ; Pawha et al., 2022).

Malgré cela, l'inflammation chronique est l'un des principaux contributeurs à l'apparition de nombreuses maladies chroniques. En outre, elle pourrait jouer un rôle important dans le développement de diverses pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète, l'asthme allergique, les maladies rénales chroniques, les maladies inflammatoires de l'intestin et les maladies articulaires (Pahwa et al., 2022). Les maladies telles que la polyarthrite rhumatoïde (PR) et l'arthrose (OA) ne comprennent actuellement aucune cure et représentent non

seulement un fardeau économique, mais entraînent également des conséquences personnelles et sociales pour les personnes qui en sont atteintes (Lodzki et al., 2003). De plus, les personnes souffrant d'arthrite sont confrontées à des risques accrus de problèmes de mobilité, de travail, de santé mentale et de santé générale par rapport aux autres, comme le montre la figure 2.2. Ainsi, l'arthrite demeure l'un des problèmes courant, affectant 6 millions de Canadiens. De plus, les projections indiquent une augmentation touchant les 9 millions d'ici 2040 (Badley et al., 2019).

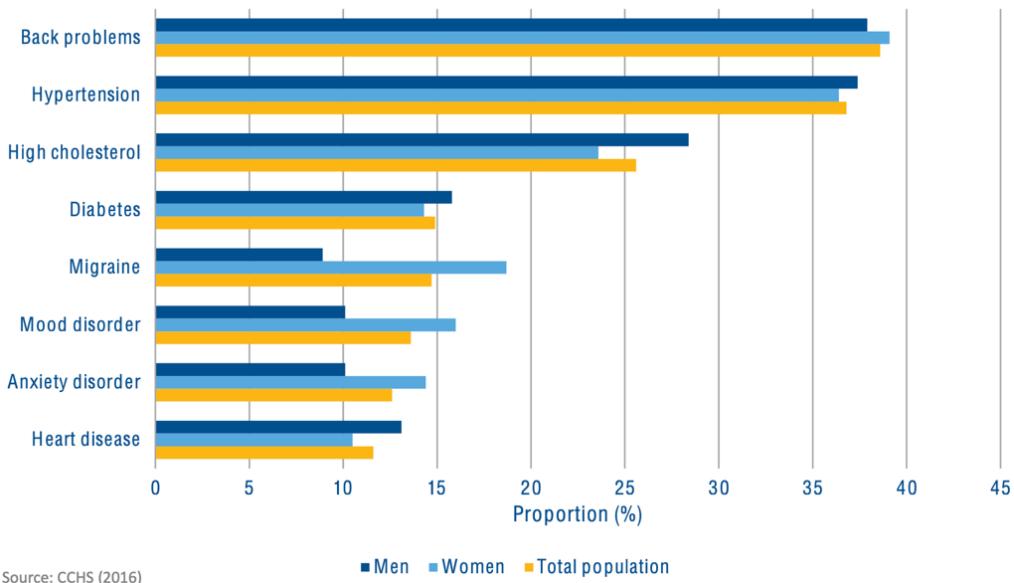


Figure 2.2 Proportion de personnes souffrant d'arthrite également atteintes d'autres maladies chroniques (Badley et al., 2019). Les personnes atteintes d'arthrite présentent un risque accru de développer une autre condition chronique sous-adjacente.

2.1.4 La polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose

L'arthrite est une maladie touchant les articulations, soit la région où deux os entrent en contact. Les articulations synoviales préviennent les frictions pouvant survenir entre les os impliqués dans les mouvements du corps. Brièvement, elles sont composées d'une cavité articulaire contenant le liquide synovial. Cette région est entourée par le cartilage articulaire, également appelé cartilage hyalin, en périphérie des os impliqués dans l'articulation, de la membrane synoviale, sécrétant notamment le liquide synovial, et enfin de la capsule synoviale, soit le tissu conjonctif fibreux attaché aux os. Certaines articulations, telle que le ménisque du genou, peuvent également contenir du fibrocartilage associé entre les os articulaires (Juneja et al., 2024). La figure 2.3 résume les structures anatomiques articulaires.

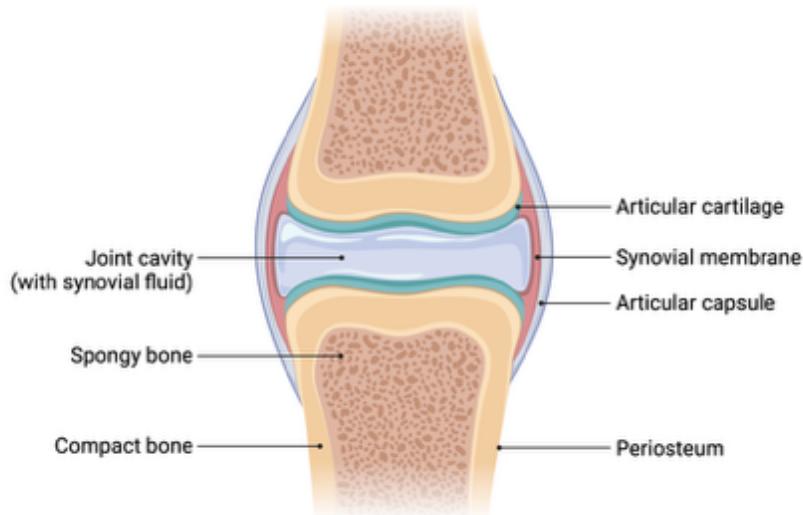


Figure 2.3 Structure de l'articulation synoviale (Biorender, 2023). La capsule synoviale englobe la membrane synoviale sécrétrice du liquide synovial, le cartilage articulaire à l'interface os-articulation, ainsi que la cavité articulaire abritant le liquide synovial.

La PR est une maladie auto-immune inflammatoire chronique affectant principalement les articulations synoviales et, lorsque non traitée, elle entraîne une destruction articulaire, une perte de cartilage et une érosion osseuse. La PR est également associée à une comorbidité et une mortalité accrue en raison d'un risque augmenté de maladie cardiovasculaire (Chauhan et al., 2023).

La progression de la PR est généralement lente et le diagnostic à un stade précoce est difficile dû à l'absence de test pathognomonique. Cependant, la réponse immunitaire liée à la PR provient souvent de tissus éloignés des articulations synoviales. Il est présumé que l'activation répétée de l'immunité innée, observée chez les individus qui fument par exemple, peut entraîner la formation de protéines modifiées par des réactions biochimiques telle que la citrullination. Ce processus conduirait à la formation de néoantigènes, donnant éventuellement naissance à des anticorps anti-citrulline, présents chez environ 40 % des patients atteints de PR. Ces anticorps sont produits par les plasmocytes (monocytes, cellules dendritiques, mastocytes, cellules Th et cellules B) qui ont infiltré l'espace synovial en raison de l'angiogenèse accrue dans le compartiment synovial et de la production de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales activées (Chauhan et al., 2023).

Par la suite, les cellules immunitaires libèrent diverses cytokines et chimiokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et facteurs de stimulation des colonies de granulocytes et de

monocytes), contribuant à attirer davantage de cellules immunitaires dans l'environnement synovial. L'activation de la voie de signalisation osseuse (RANK/RANKL/OPG) par les médiateurs de l'inflammation entraîne la formation d'ostéoclastes et l'érosion osseuse. De plus, ces médiateurs activent les synoviocytes fibroblastiques, qui peuvent proliférer avec des caractéristiques invasives, leur permettant de migrer d'une articulation à l'autre provoquant ainsi des dommages supplémentaires. L'activation des chondrocytes par le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-17 s'accompagne également de la sécrétion d'enzymes matricielles, dégradant davantage le cartilage (Chauhan et al., 2023). Les principaux mécanismes impliqués dans le développement de la pathologie sont illustrés dans la figure 2.4.

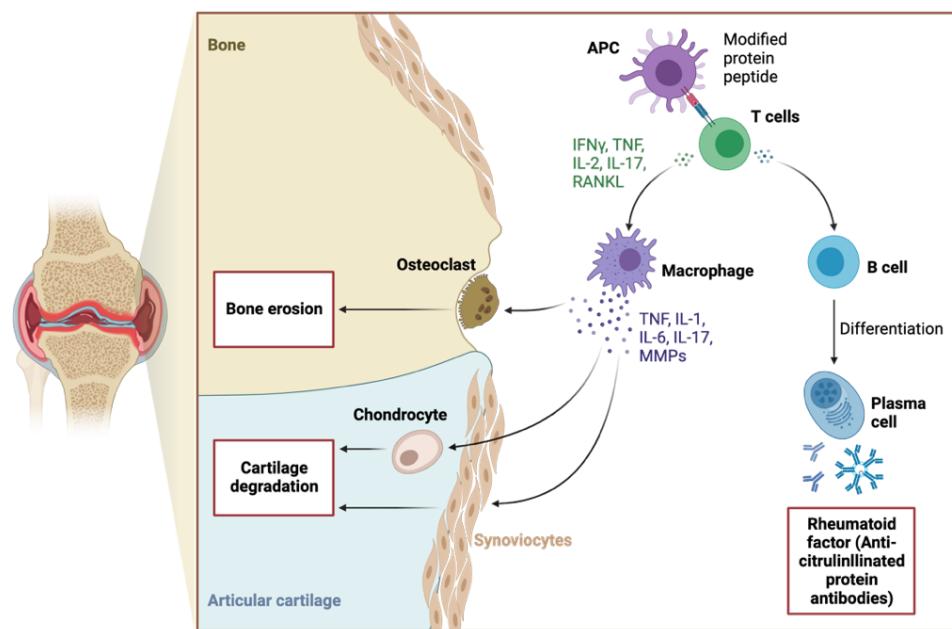


Figure 2.4 Mécanismes impliqués dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde (adapté de Team, 2023). La formation de néoantigènes face à des protéines biochimiquement modifiées mène à la production d'anticorps pouvant activer les cellules immunitaires. Les médiateurs inflammatoires libérés mènent à l'activation de RANK/RANKL/OPG et entraînent la formation d'ostéoclastes et d'érosion osseuse, tout en acquérant des caractéristiques invasives. L'activation chondrocytaire par les médiateurs inflammatoires mène également à la dégradation cartilagineuse.

L'OA, une condition dégénérative et progressive liée à des lésions articulaires, est le type d'arthrite le plus courant. Contrairement à la PR, l'OA se développe principalement en raison d'une surutilisation de l'articulation conduisant à un stress mécanique, bien que d'autres facteurs puissent également influencer son développement, notamment les traumatismes, l'inflammation, les réactions biochimiques et les dérangements métaboliques (Mora et al., 2018). Par conséquent, cette pathogenèse implique non seulement une dégradation du cartilage due à un stress mécanique, mais englobe également le remodelage de l'os sous-jacent, la formation osseuse ectopique, l'hypertrophie de la capsule articulaire et l'inflammation de la muqueuse synoviale (Robinson et al., 2016). Par conséquent, les douleurs articulaires reliées à l'arthrose peuvent provenir de diverses composantes non cartilagineuses, tels que la capsule articulaire, la synoviale, l'os sous-chondral, les ligaments et les muscles.

D'un point de vue moléculaire, l'arthrose implique principalement le système immunitaire inné. L'infiltration de cellules inflammatoires dans l'espace synovial est généralement observée au stade précoce du développement de la maladie, accompagnée de médiateurs inflammatoires, tels que les protéines plasmatiques, les prostaglandines, les leucotriènes, les cytokines, les facteurs de croissance, l'oxyde nitrique et les composantes du complément. Par conséquent, certains de ces médiateurs peuvent induire une action enzymatique hydrolytique, contribuant ainsi à la dégradation du cartilage par la destruction des protéoglycans et du collagène (Mora et al., 2018). La reconnaissance des DAMPs par les cellules immunitaires est également associée à l'arthrose. Les produits de dégradation de la matrice extracellulaire, les protéines plasmatiques en provenance des vaisseaux sanguins à proximité, les alarmines intracellulaires libérées par les cellules stressées, endommagées ou nécrotiques et les microcristaux de cartilage libérés dans l'espace synovial peuvent tous activer les PRRs. L'activation de ces récepteurs, généralement issus de la famille des récepteurs Toll-like, conduit à l'induction de voies transcriptionnelles inflammatoires, notamment NF-κB et AP-1, renforçant le phénotype inflammatoire de la maladie (Robinson et al., 2016). Les étapes critiques du développement de la maladie induite par la libération des DAMPs sont présentées dans la figure 2.5.

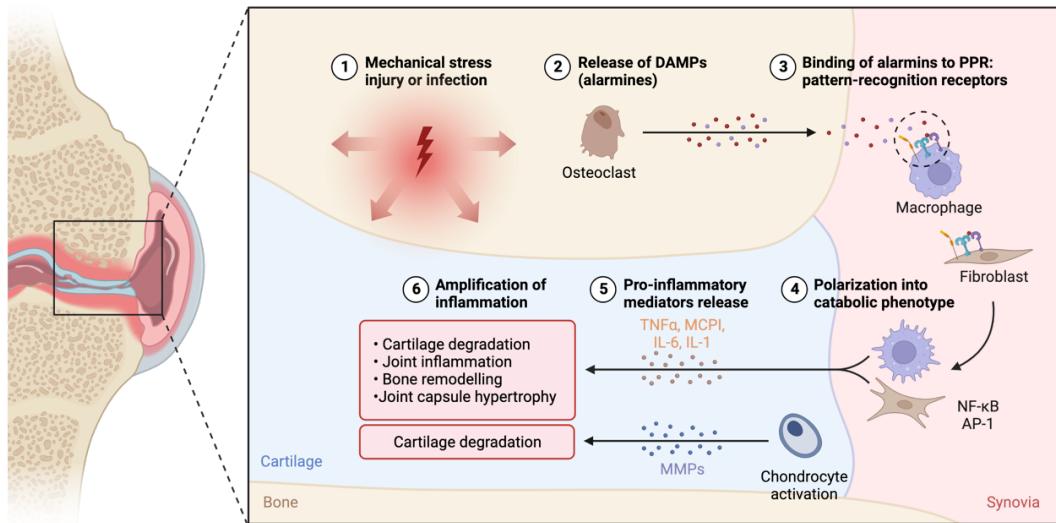


Figure 2.5 Développement de l'arthrose débutant avec le relâchement de DAMPs dans l'articulation (adapté de Pons, 2022). La liaison des alarmines aux PPRs de l'espace synovial induit l'activation de voies transcriptionnelles inflammatoires, telle que NF-κB et AP-1, menant à une amplification du phénotype inflammatoire, notamment la dégradation articulaire et cartilagineuse, le remodelage osseux, l'hypertrophie de la capsule articulaire et l'inflammation synoviale.

2.1.5 Les traitements actuels de l'arthrite

Comme mentionné précédemment, l'arthrite est présentement incurable, mais les symptômes de celle-ci peuvent être apaisés. Par conséquent, l'un des principaux défis associés à l'arthrite est la gestion de la douleur. En plus des méthodes de gestion non pharmacologiques telles que la physiothérapie, la stimulation nerveuse électrique et l'acupuncture, la gestion de la douleur arthritique implique généralement des médicaments qui peuvent soulager la douleur et ralentir les lésions articulaires en limitant l'inflammation (Badley et al., 2019 ; Maqbool et al., 2021). Le tableau 2.1 à la fin de cette section résume les traitements pharmacologiques actuels qui sont expliqués dans les paragraphes suivants.

2.1.5.1 Les NSAIDs

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAIDs) sont une classe de médicaments approuvés par les agences de régulation pharmaceutiques, utilisés pour leurs propriétés antipyrrétiques, anti-inflammatoires et analgésiques. Les NSAIDs, tels que l'ibuprofène, le diclofénac, le célecoxib et le naproxène, constituent la première ligne de traitement de l'arthrite. Leur principal mécanisme d'action implique l'inhibition des enzymes COX, nécessaires à la synthèse des eicosanoïdes (Ghlichloo et Gerriets, 2023). Cependant, malgré leurs avantages de soulager la douleur et de lutter

contre l'inflammation, l'utilisation prolongée des NSAIDs, comme chez les patients souffrant d'arthrite, présente de nombreux inconvénients. Celle-ci est souvent associée, sans s'y limiter, à des lésions de la muqueuse gastrique, des ulcères gastriques, une perforation lumineuse, des saignements occultes, une obstruction intestinale, une insuffisance cardiaque, une hypertension, des accidents vasculaires cérébraux, des maladies rénales chroniques, une nécrose papillaire rénale et une acidose tubulaire rénale (Bindu et al., 2020). En raison de ces effets secondaires, les professionnels tentent de limiter l'utilisation des NSAIDs dans la gestion des douleurs chroniques non cancéreuses (Goodwin et al., 2009).

2.1.5.2 Les opioïdes

L'utilisation d'opioïdes, lorsque correctement dosés et surveillés, est approuvée pour la gestion de la douleur arthritique lorsque des approches plus conservatrices ont échoué ou s'il existe des contre-indications, une non-efficacité ou une mauvaise tolérance de l'utilisation des NSAIDs (Goodwin et al., 2009). Bien que les opioïdes procurent un soulagement de la douleur, ils ne sont généralement pas recommandés pour la prise en charge de l'arthrite. Leur principal mécanisme d'action consiste en leur liaison aux récepteurs d'opioïdes mu, delta et kappa et à les hyperpolariser, conduisant à une réduction de l'excitabilité des neurones (Bovill, 1997). Ainsi, l'utilisation prolongée d'opioïdes pour soulager la douleur chronique entraîne généralement une perte du potentiel analgésique, nécessitant une augmentation de la dose (Benyamin et al., 2008). Cette situation peut être problématique, car certains patients peuvent présenter une hyperalgie associée à ce médicament lorsqu'il est utilisé à long terme à des doses élevées. Cet effet secondaire augmente la sensibilité à la douleur malgré les doses croissantes d'opioïdes. L'administration chronique de doses élevées peut également conduire à une dépendance physique, dans laquelle l'état physiologique présente des symptômes de sevrage impliquant une hyperactivité autonome et somatique. De plus, la consommation chronique d'opioïdes est corrélée à une incidence accrue d'infection et constitue un cofacteur dans la pathogenèse du virus de l'immunodéficience humaine (Benyamin et al., 2008). Il diminue la capacité proliférative des cellules progénitrices des macrophages et des lymphocytes, provoque des effets inhibiteurs sur la réponse immunitaire humorale et cellulaire et affecte la fonction de différenciation des cellules immunitaires (Benyamin et al., 2008 ; Roy et Loh, 1996).

2.1.5.3 Les DMARDs

Les médicaments antirhumatismaux modificateurs de la maladie (DMARD) conventionnels et biologiques sont l'un des principaux traitements utilisés pour la gestion de la PR. Ils exercent un contrôle strict sur la pathologie en ciblant directement la voie impliquée dans la maladie, retardant ainsi les déformations articulaires et le développement de la maladie (Mrid et al., 2022). Cependant, ils peuvent entraîner une détérioration rapide de la fonction rénale et du système nerveux central (SNC) en raison de leurs effets toxiques, de même que des troubles gastro-intestinaux. En raison de leur mécanisme d'action, qui cible les voies critiques du système immunitaire (telles que la réduction de l'adhésion des neutrophiles, l'inhibition des leucotriènes, de l'IL-1, de l'IL-6 et de la synthèse des enzymes hydrolytiques), les DMARDs peuvent également avoir des effets immunosuppresseurs et immunomodulateurs, augmentant ainsi le risque d'infection (Benjamin et al., 2022 ; Mrid et al., 2022).

2.1.5.4 Les Corticostéroïdes

Les médecins ont parfois recours aux corticostéroïdes pour soulager l'arthrite. Étant donné que la probabilité d'effets secondaires dépend de la durée, de la dose et de facteurs spécifiques au patient, ce traitement est souvent prescrit comme traitement temporaire en attendant les DMARDs ou d'autres options de traitement (Van der Goes et al., 2016). Les corticostéroïdes soulagent rapidement les symptômes de l'inflammation et ont généralement un effet prolongé (Katz et al., 2021). Étant donné que les corticostéroïdes couramment utilisés sont structurellement similaires à l'hormone naturelle produite par la glande surrénale, le cortisol, l'utilisation prolongée de ces médicaments peut provoquer une insuffisance surrénalienne en agissant sur la boucle de rétroaction négative, diminuant ainsi la production d'hormones en amont (Katz et al., 2021). Ils peuvent également provoquer l'ostéoporose et l'ostéonécrose en réduisant le nombre d'ostéoblastes et en entravant leur fonction (Katz et al., 2016 ; Bijlsma et al., 1995). Les corticostéroïdes contribuent à ce phénomène en augmentant la résorption osseuse, en stimulant l'action et la formation d'ostéoclastes, en réduisant l'absorption du calcium et en augmentant l'excrétion rénale (Van der Goes, 2016). Ils peuvent également provoquer une immunosuppression en altérant l'activation, l'adhésion, la prolifération et la fonction des cellules immunitaires, exposant ainsi le patient à un risque d'infection (Bijlsma et al., 1995). De plus, ils modifient la production de glucose, augmentant ainsi le risque d'hyperglycémie (Tamez-Pérez et al., 2015).

Les inconvénients liés à ces méthodes traditionnelles de gestion de la douleur et de traitement des maladies articulaires mettent en évidence un manque à ce niveau. La conception de traitements innovants pour pallier ce manque est donc nécessaire.

Tableau 2.1 État actuel des traitements pharmacologiques de l'arthrite

Type de médicament	Exemples	Avantages	Désavantages	Références
NSAIDs	- Ibuprofène - Diclofénac - Naproxène - Célécoxib	- Effets anti-inflammatoires - Effets analgésiques - Effets antipyrétiques	- Complications gastro-intestinales - Maladies cardiovasculaires - Complications rénales - Hépatotoxicité - Interaction avec d'autres médicaments	- Bindu et al., 2020 - Ghlichloo et Gerriets, 2023 - Goodwin et al., 2009
Opioïdes	- Codéine - Morphine - Oxycodone - Mépéridine	- Alternative au NSAIDs - Effet analgésique	- Dépendance physique - Hyperalgésie - Tolérance pharmacologique - Immunosuppression	- Benyamin et al., 2008 - Goodwin et al., 2009 - Roy et Loh, 1996
DMARDs (synthétiques et biologiques)	- Méthotrexate - Léflunomide - Hydroxychloroquine - Sulfasalazine - Abatacept - Infliximab	- Contrôle stricte - Retarder l'apparition de déformations articulaires - Effet anti-inflammatoire - Effet prolongé	- Néphrotoxicité - Immunosuppression - Toxicité du SNC et rétinienne - Problèmes gastro-intestinaux	- Benjamin et al., 2022 - Mrid et al., 2022
Corticostéroïdes	- Prednisone - Injections stéroïdiennes	- Effets prolongées - Effets anti-inflammatoires	- Immunosuppression - Ostéoporose/ostéonécrose - Insuffisance surrénalienne - Maladies oculaires	- Bijlsma et al., 1995 - Katz et al., 2021 - Van der Goes et al., 2016

2.2 Les cannabinoïdes

Les cannabinoïdes constituent une classe structurelle substantielle de composés biologiques capables de se lier aux récepteurs de cannabinoïdes (CBRs). Ils sont classés en trois groupes : les endocannabinoïdes, les phytocannabinoïdes et les cannabinoïdes synthétiques. Cette section n'abordera que les deux premières classes de cannabinoïdes, tandis que les cannabinoïdes synthétiques ne seront pas abordés plus en détail, étant donné qu'ils ne sont pas pertinents pour ce projet. De plus, les effets anti-inflammatoires et analgésiques du cannabidiol (CBD) seront discutés, ainsi que les traitements à base de cannabinoïdes présentement autorisés par les agences de régulation pharmaceutique des pays occidentaux. Cette section terminera sur les modes d'administration de ce composé.

2.2.1 Le système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde (ECS) est un système neuromodulateur crucial qui joue un rôle dans le développement du SNC, dans la plasticité synaptique et dans les réponses face aux stimuli nocifs endogènes et exogènes. Il peut également réguler des fonctions corporelles, notamment le métabolisme, le comportement alimentaire, l'humeur, l'anxiété, la perception et la modulation de la douleur (Boyaji et al., 2020). Les composants de ce système comprennent au moins deux CBRs, les agonistes endogènes de ces récepteurs appelés endocannabinoïdes, et les enzymes responsables de la synthèse, du transport et de la dégradation de ces endocannabinoïdes (Lu et Mackie, 2016).

Les CBRs comprennent deux récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) qui médient autre autre l'effet de la signalisation cannabinoïde endogène, c'est-à-dire CB1 et CB2. CB1 est principalement localisé dans le SNC et sa distribution pourrait suggérer un rôle essentiel dans le contrôle des fonctions motrices, cognitives et de mémoire. D'autre part, CB2 est principalement localisé dans les terminaisons nerveuses périphériques et dans les cellules immunitaires. Sa régulation positive est corrélée avec l'activation des cellules immunitaires, suggérant un rôle vital dans la réponse inflammatoire (De Almeida et Devi., 2020 ; Howlett et Abood, 2017). Les deux CBRs reconnaissent plusieurs ligands agonistes et antagonistes, induisant différents résultats en aval (Howlett et Abood, 2017). Leurs effets sur les cellules dépendent donc principalement du type de sous-unité α couplée au GPCR (Mlost et al., 2020). Comme ils se lient généralement à la sous-unité $G_{\alpha i/0}$, leur activation inhibe généralement l'adénylyl cyclase, réduisant ainsi les concentrations

intracellulaires d'AMPc. Il inhibe également les canaux Ca^{2+} dépendant du voltage, réduisant ainsi les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} tout en activant la protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK) et en rectifiant les canaux K^+ . Leur activation entraîne donc des changements physiologiques dans la cellule (Lu et Mackie, 2016).

Les endocannabinoïdes sont des neurotransmetteurs lipidiques endogènes qui interagissent avec les récepteurs CBRs. Ils sont synthétisés à la demande dans les terminaisons post-synaptiques en réponse à une activation neuronale de manière dépendante du Ca^{2+} et peuvent ensuite se lier aux CBRs présynaptiques (De Almeida et Devi, 2020). Les dérivés de l'acide arachidonique (AA), le 2-arachidonoyl glycérol (2-AG) et l'arachidonoyl éthanolamide (AEA), également connu sous le nom d'anandamide, sont les plus connus et étudiés. Cependant, même si leur structure chimique est très similaire, comme le montre la figure 2.6, leur synthèse et leur dégradation sont réalisées par des voies enzymatiques différentes pour assurer un rôle physiologique et physiopathologique différent à ces deux molécules (Lu et Mackie, 2016). Par exemple, l'AEA a une forte affinité agonistique pour CB1 et est presque inactive pour CB2 ; alors que le 2-AG est un agoniste complet avec une affinité modérée à faible pour les deux CBRs. Cependant, les deux composés interagissent avec une grande variété de récepteurs autres que les CBRs, y compris, sans s'y limiter, au canal potentiel de récepteur transitoire (TRP) et au récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR γ), qui seront discutés plus en détail dans la section 2.2.3. (Zou et Kumar, 2018).

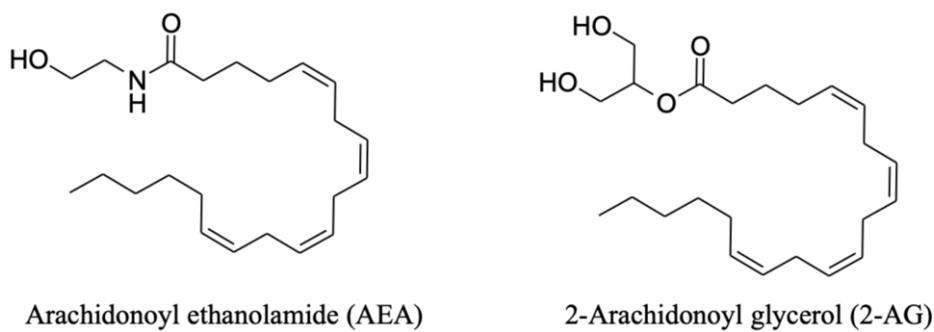
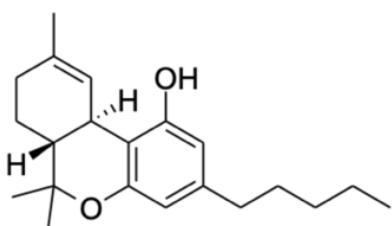


Figure 2.6 Structures chimiques des 2 endocannabinoïdes principaux.

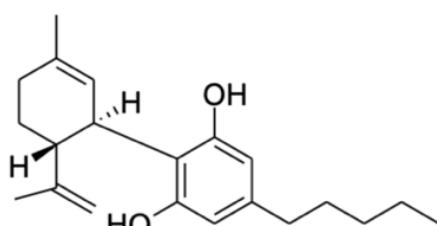
2.2.2 Les phytocannabinoïdes

La deuxième classe de cannabinoïdes d'intérêt est celle des phytocannabinoïdes, provenant de la plante *Cannabis* et dont l'utilisation remonte à plus de 5 000 ans dans la médecine traditionnelle chinoise, et il y a environ 3 000 ans en Égypte et en Inde. Dans les années 1970, certains pays, dont le Canada et les États-Unis, ont criminalisé et classé cette substance comme illicite en raison des effets psychotropes associés au tétrahydrocannabinol (THC). Cependant, le statut légal et la décriminalisation récentes du cannabis ont ravivé l'intérêt pour celui-ci en tant qu'agent thérapeutique (Amin et Ali, 2019).

Les taxonomistes botaniques conviennent que le cannabis appartient à la famille des *Cannabaceae* et, bien qu'il existe plusieurs espèces, il semble y avoir trois variétés principales : *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* et *Cannabis ruderalis*. Le premier isolé et le plus populaire dans les pays occidentaux est *C. sativa L.*, qui contient plus de 150 composés phytocannabinoïdes classés en groupes spécifiques : cannabigérols (CBG), cannabichromènes (CBC), cannabidiols (CBD), (−)-Δ9-trans-tétrahydrocannabinols (Δ9-THC), (−)-Δ8-trans-tétrahydrocannabinols (Δ8-THC), cannabicyclols (CBL), cannabielsoines (CBE), cannabinols (CBN), cannabinodiols (CBND) et cannabitriols (CBT) (Gülck et Møller, 2020). Les phytocannabinoïdes les plus abondants et les plus pertinents sur le plan pharmacologique sont le Δ9-THC et le CBD, partageant une structure chimique similaire, comme le montre la figure 2.7 (Borges et al., 2013 ; Pagano et al., 2022). La biosynthèse de ces composés commence par leurs formes acides, l'acide tétrahydrocannabinolique (THCA) et l'acide cannabidiolique (CBDA), qui se transforment spontanément en leur forme finale en raison de leur faible stabilité oxydative (Gülck et Møller, 2020).



Tetrahydrocannabinol (THC)



Cannabidiol (CBD)

Figure 2.7 Structures chimiques des deux phytocannabinoïdes principaux.

Le CBD et le THC semblent tout deux posséder un potentiel thérapeutique et pourraient agir comme alternative ou comme complément aux traitements conventionnels pour la gestion de la douleur chronique. Cependant, les effets psychotropes associés au THC limitent son utilisation. Par conséquent, les chercheurs se concentrent principalement sur le CBD pour développer de nouveaux traitements, car celui-ci évite les effets psychotropes et euphorisants, maintient un profil sécuritaire, présente un faible potentiel d'abus et offre un large éventail d'avantages, notamment des effets antioxydants, anticonvulsivants, analgésiques, anti-tumorigènes, anxiolytiques et anti-inflammatoires (Pagano et al., 2022 ; Boyaji et al., 2020). Le CBD est donc un candidat considérable pour le traitement des plusieurs maladies, incluant le cancer, le diabète, les troubles neurodégénératifs et les pathologies inflammatoires. (Pagano et al., 2022).

2.2.3 Les effets thérapeutiques du CBD

Bien que la découverte du CBD soit antérieure à celle du THC, ce composé a moins été étudié en raison de son manque d'effets psychotropes. Cependant, le récent regain d'intérêt pour le CBD en tant que composé pharmacologique a incité les professionnels et les chercheurs à approfondir les connaissances portant sur les voies moléculaires qui sous-tendent ses divers effets thérapeutiques. Par conséquent, les données concernant son mécanisme d'action en tant qu'agent thérapeutique sont désormais abondantes et parfois incongrues (Mlost et al., 2020). Par conséquent, cette section fournit une vue d'ensemble des principales voies qui sous-tendent le potentiel thérapeutique du CBD en tant qu'agent anti-inflammatoire et analgésique. De plus, une représentation schématique (figure 2.8) résumant les cibles du CBD est incluse à la fin de cette section pour améliorer la compréhension et alléger cette section.

2.2.3.1 Les effets directes et indirectes sur le système endocannabinoïde

Les premiers rapports ont démontré que le CBD est peu compétitif par rapport aux ligands endogènes au niveau du site orthostérique des CBRs, ce qui suggère que le CBD agit principalement de manière indépendante de ces récepteurs. D'autres études suggèrent toutefois que le CBD pourrait agir directement et indirectement sur le ECS (Mlost et al., 2020).

L'activation de CB1 induit principalement la production de ROS et la synthèse en aval de TNF- α , contribuant à une réponse pro-inflammatoire (Atalay et al., 2019). Le CBD présente donc une très faible affinité agoniste pour ce récepteur, ce qui pourrait également expliquer le manque d'activité psychotrope associé à ce composé (Mlost et al., 2020). Par conséquent, l'activité antagoniste et la

modulation allostérique négative de CB1 par le CBD pourraient être en partie responsables de l'inhibition de la réponse inflammatoire. Cependant, cet effet est faible et critiqué parmi les groupes de recherche. En effet, certains groupes soutiennent que le CBD ne se lierait pas au CB1 et que la réponse anti-inflammatoire dépendante des CBRs est plus probablement associée à l'activation du CB2 (Atalay et al., 2019 ; Mlost et al., 2020), même si les voies de signalisation associées à ce récepteur sont beaucoup moins caractérisées que celles de CB1 (Turcotte et al., 2016).

Les souris dépourvues du récepteur CB2 ont un phénotype inflammatoire amplifié, indiquant l'importance de ce récepteur dans les mécanismes anti-inflammatoires. La stimulation de CB2 inhiberait la libération de cytokines pro-inflammatoires, de ROS, ainsi que la prolifération, la migration et la différenciation de diverses cellules immunitaires (Ashton et Glass, 2007 ; Atalay et al., 2020). Cependant, les études pharmacocinétiques suggèrent que le CBD pourrait être un très faible agoniste du CB2, car il semble avoir un effet détectable uniquement dans la plage du micro-molaire. Cependant, malgré sa faible affinité agoniste pour le CB2, le CBD semble avoir un effet biologique à des concentrations raisonnables de l'ordre du nano-molaire (Pertwee, 2008). Cela a été prouvé plus tard en raison de ses activités d'agoniste inverse et d'antagoniste (Atalay et al., 2018 ; Mlost et al., 2020 ; Pertwee, 2008). Les études suggèrent que le mécanisme agoniste inverse pourrait inhiber la migration des cellules immunitaires et diminuer les symptômes d'inflammation (Lunn et al., 2006 ; Pertwee, 2008). L'équipe de Lunn et al. soutient que la liaison d'un agoniste inverse sélectif au CB2 pourrait inhiber la migration des leucocytes initiée par la liaison du 2-AG, un très bon agoniste de ce récepteur, et que l'injection de cet agoniste inverse, pourrait réduire le trafic leucocytaire chez les rongeurs (Lunn et al., 2006). La modulation indirecte du CB2 par le CBD pourrait également expliquer son effet anti-inflammatoire (Atalay et al., 2020). Il a été démontré que le CBD inhibe l'absorption cellulaire de l'AEA et l'activité de la FAAH responsable de l'hydrolyse de l'AEA. Ainsi, une augmentation des concentrations de cet effecteur anti-inflammatoire peut être constatée dans les cellules en présence de CBD (De Almeida et Devi, 2020).

Les endocannabinoïdes peuvent engendrer des réponses à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. D'une part, il a été constaté que l'AEA régulerait négativement la production de ROS, la libération de médiateurs pro-inflammatoires et les fonctions des cellules immunitaires, telle que la migration leucocytaire, et augmenterait la libération de cytokine anti-inflammatoire telle qu'IL-10. À l'inverse, le 2-AG améliorerait le recrutement et les fonctions des cellules B et T,

des cellules dendritiques, des éosinophiles, des monocytes et des cellules tueuses naturelles et augmenterait la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (Turcotte et al., 2015; Turcotte et al., 2016). Même si le 2-AG pourrait être responsable des effets pro-inflammatoires, les métabolites des endocannabinoïdes pourraient également jouer un rôle important dans la modulation positive des cellules immunitaires (Turcotte et al., 2015). La métabolisation des endocannabinoïdes par les enzymes biosynthétiques des eicosanoïdes augmente les niveaux d'AA, favorisant la biosynthèse des eicosanoïdes, tels que PGH₂-EA, PGE₂-GE et de leucotriène. Ainsi, ces lipides bioactifs jouent un rôle important dans le développement de la réponse inflammatoire (Turcotte et al., 2015), et l'inhibition de leur biosynthèse pourrait contribuer à améliorer l'inflammation.

2.2.3.2 Les GPCRs

Le CBD peut exercer ses propriétés anti-inflammatoires et analgésiques indépendamment du ECS en modulant divers GPCR et voies de signalisation. Les cibles potentielles du CBD comprennent le récepteur de la sérotonine 1A (5-HT_{1A}), le récepteur de l'adénosine A_{2A} (A_{2AR}) et le récepteur 55 couplé à la protéine G (GPR55). Dans le système sérotoninergique, il a été démontré que le CBD a la capacité d'atténuer l'allodynie mécanique en régulant la libération de neurotransmetteurs et l'excitabilité neuronale (De Almeida et Devi, 2020; Jesus et al., 2019). De plus, lorsqu'il est activé par le CBD ou l'AEA, le 5HT_{1A} peut agir à titre d'antioxydant en capturant les ROS, contribuant potentiellement à l'amélioration indirecte de l'inflammation (Atalay et al., 2020).

En contrepartie, le A_{2AR} activé présente des propriétés anti-inflammatoires, réduisant les niveaux de TNF- α et de protéine d'adhésion des cellules vasculaires, qui sont impliqués dans la migration des cellules immunitaires (Atalay et al., 2020). Le CBD peut également inhiber l'absorption cellulaire de l'adénosine, augmentant ainsi son contenu endogène pour l'activation du A_{2AR} (De Almeida et Devi, 2020). A_{2AR} possède également des propriétés antioxydantes, contribuant ainsi à réduire le stress oxydatif (Atalay et al., 2020).

Le récepteur GPR55, présent principalement dans les cellules nerveuses et immunitaires, pourrait également jouer un rôle dans les fonctions immunitaires. Il a été démontré que le CBD exerce une activité antagoniste sur le GPR55, mais le mécanisme exact sous-jacent à cette voie reste vague. L'activité du CBD sur ce récepteur pourrait se faire via la modulation des niveaux d'endocannabinoïdes (Atalay et al., 2020). Cependant, les observations de l'équipe de Staton

suggèrent que les souris knock-out pour GPR55 présentent des niveaux élevés de cytokines anti-inflammatoires et une réduction de l'hyperalgésie, tandis qu'une expression élevée des récepteurs inhiberait la production de ROS (Staton et al., 2008). Par conséquent, l'effet final de l'activation de ce récepteur pourrait dépendre de l'effet dominant de l'activation directe ou indirecte du CBD (Atalay et al., 2020).

2.2.3.3 Les canaux ioniques

Les canaux TRP, tels que le TRP vanilloïde 1/2 (TRPV1/2) et le TRP ankyrine 1 (TRPA1), sont membres d'une grande famille de canaux ionotropes impliqués dans la transduction en réponse à divers stimuli physiques et chimiques en modulant les niveaux de calcium (Etemad et al., 2022). Le CBD peut les activer directement ou indirectement, étant donné que l'un des ligands endogènes du TRPV1 est l'AEA. L'action du CBD dans la réduction du stress oxydatif peut également assurer la présence de la forme active de ce récepteur (Atalay et al., 2020). Cependant, l'activation de ces récepteurs est généralement associée à une inflammation et à des douleurs, mais certains agonistes, comme le CBD et l'AEA, peuvent induire une analgésie paradoxale en désensibilisant ces récepteurs (Etemad et al., 2022). Leur activation peut également inhiber la biosynthèse du 2-AG, réduisant ainsi les niveaux d'endocannabinoïdes pro-inflammatoires (Atalay et al., 2020). Par conséquent, l'activation soutenue de TRPV1/2 et TRPA1 par le CBD, ainsi que l'augmentation de l'AEA, contribuent aux effets analgésiques, anti-inflammatoires et anti-hyperalgésiques, aidant ainsi à la gestion de la douleur chronique (Muller et al., 2019 ; Atalay et al. , 2020 ; Etemad et al., 2022).

2.2.3.4 Le récepteur nucléaire

Le récepteur PPAR γ est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires des facteurs de transcription inductibles par un ligand et joue un rôle essentiel dans la régulation négative de l'inflammation. Lors de son activation par des agonistes, tels que le CBD et les endocannabinoïdes, il peut moduler l'ubiquitination de la sous-unité cytoplasmique et nucléaire NF κ B p65 en interagissant avec une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, soit UbcH3 (Xu et al., 2015 ; Atalay et al., 2020). L'ajout de poly-ubiquitine à cette sous-unité induit une dégradation protéosomale ultérieure, inhibant la voie de signalisation inflammatoire médiée par NF κ B, l'expression génique en aval de COX2 et l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL- 6 (Atalay et al., 2020).

Comme nous l'avons vu dans cette dernière section, le CBD a le potentiel de réguler une grande variété de récepteurs, de canaux ionotropes et d'enzymes, ainsi que les niveaux d'endocannabinoïdes. Les principales cibles directes et indirectes ainsi que les mécanismes d'action du CBD sont résumés dans la figure suivante.

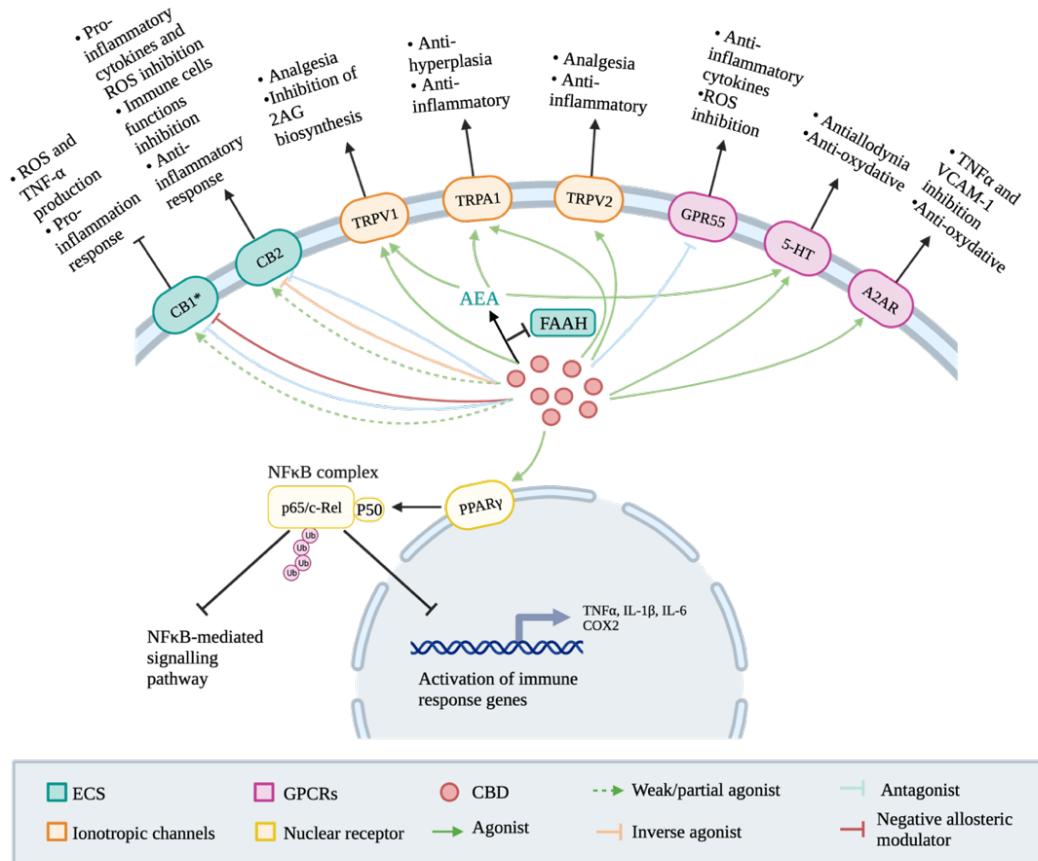


Figure 2.8 Aperçu simplifié des principaux effets anti-inflammatoires et analgésiques du CBD (Lefebvre et al., 2024). Le CBD agit directement et indirectement sur le système endocannabinoïde (CB1/2 :récepteurs à cannabinoïdes 1/2, AEA : anandamide, 2AG : 2-arachidonoyl glycérol, FAAH : hydrolase d'amide d'acide gras 1), sur les canaux ionotropiques (TRPV1/2 : canal potentiel de récepteur transitoire vanilloïde 1/2, TRPA1 : canal potentiel de récepteur transitoire ankyrine 1), sur des récepteurs couplés à la protéine G (GPR55, 5-HT : récepteur de la sérotonine 1A, A2AR : le récepteur de l'adénosine A2A) et sur un récepteur nucléaire (PPAR γ : récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxysomes).

2.2.4 Les traitements à base de cannabinoïdes présentement approuvés dans les pays occidentaux

Tel que mentionné précédemment, le développement de thérapies à base de cannabinoïdes a connu un ralentissement dû à la criminalisation du cannabis dans certains pays occidentaux. Ainsi, très peu de produits sont présentement approuvés par les agences de réglementations pharmaceutiques. Un bref survol des produits à base de cannabinoïdes présentement approuvés par Santé Canada, par la FDA et par l'agence européenne de médecine (EMA) seront donc présentés dans la section suivante.

2.2.4.1 Santé Canada au Canada

À ce jour, Santé Canada a approuvé trois médicaments à base de cannabinoïdes, dont seulement deux sont encore sur le marché. Sativex® (GW Pharma Ltd.), également connu sous le nom de Nabiximols, se présente sous forme d'un spray oro-muqueux et contient un mélange de THC (Tetranabinex®) et de CBD (Nabidiolex®) dans un rapport 1:1. Il est utilisé pour le soulagement symptomatique de la spasticité chez les patients adultes atteints de sclérose en plaques depuis 2005 au Canada (Barnes, 2006; Boyaji et al., 2020; Health Canada, 2022). Marinol® (Solvay Pharmaceuticals, Inc), dont l'agent thérapeutique est un THC synthétique (dronabinol), était utilisé dans les années 90 pour traiter la perte d'appétit chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et les nausées associées à la chimiothérapie. Cependant, le fabricant a volontairement retiré ces capsules orales du marché canadien en 2012 et elles ne sont donc plus disponibles au Canada. Le dernier traitement approuvé est le Nabilone (Cesamet™ ; Bausch Health Compagnies Inc.), qui contient un analogue synthétique du THC. Ce traitement est disponible sous forme de gélules orales depuis 1982 au Canada. Il est utilisé pour réduire les nausées et vomissements associés à la chimiothérapie chez les patients qui n'ont pas répondu de manière adéquate aux traitements antiémétiques conventionnels (Health Canada, 2022).

2.2.4.2 Food and Drug Administration (FDA) au États-Unis

Le développement de produits thérapeutiques contenant des cannabinoïdes progresse rapidement et actuellement, quatre sont autorisés par la FDA pour une utilisation sur le marché. Epidiolex® (GW Pharma Ltd.), approuvé en 2018, est un médicament à base de CBD administré sous forme de solution orale pour le traitement de deux formes rares et sévères d'épilepsie infantile, à savoir le

syndrome de Lennox-Gastaut et le syndrome de Dravet chez les patients âgés d'un an et plus (Office of the commissioner, 2018; Pagano et al., 2022). Également, deux médicaments contenant du dronabinol comme ingrédient actif, soit le Marinol® et le Syndros® (Benuvia Therapeutics), ont obtenu l'approbation en 1985 et 2016, respectivement, pour traiter la perte d'appétit et la nausée chez les patients atteints de SIDA et de cancer, tel qu'il était indiqué au Canada (O'Donnell et al. 2021; Office of the commissioner, 2019; Pagano et al., 2022; Throckmorton, 2021). Le Nabilone (Cesamet™) a également obtenu l'approbation en 1985 aux États-Unis pour les patients sous chimiothérapie (Pagano et al., 2022; Throckmorton, 2021).

2.2.4.3 L'agence européenne de médecine (EMA) en Europe

Il existe actuellement deux produits contenant des cannabinoïdes approuvés par l'EMA. Epidyolex® (Jazz Pharmaceuticals Ireland Ltd) est utilisé comme prévu par les États-Unis depuis 2014 pour le syndrome de Davet et depuis 2019 pour le syndrome de Lennox-Gastaut. Il est également utilisé pour traiter le complexe tuberculeux en complément à d'autres traitements chez les patients âgés de deux ans et plus (European Medicines Agency, n.d.). Le Sativex® détient également une autorisation de mise sur le marché dans plus de 18 États membres de l'UE pour le traitement de la sclérose en plaques (European Medicines Agency, 2022).

Malgré ces excellents produits, du travail reste à faire pour exploiter pleinement le potentiel du CBD tout en minimisant les effets secondaires associés à des doses plus élevées. Pour atteindre cet objectif, il est essentiel de comprendre les différentes voies d'administration ainsi que leurs avantages et limites.

2.2.5 L'administration de CBD

Malgré les effets thérapeutiques du CBD, l'un des principaux défis concernant l'utilisation pharmaceutique de ce composé demeure son mode d'administration. Le CBD a une faible biodisponibilité en raison de sa dégradation par le premier passage hépatique, de son instabilité en conditions gastriques, de son hydrophobicité élevée et d'un risque d'effets secondaires indésirables dus à une concentration plasmatique élevée (Tijani et al., 2021). Ainsi, l'efficacité du traitement varie considérablement en fonction de la voie d'administration. Les paramètres influençant la capacité d'un médicament à se lier à son récepteur sont sa physiologie, sa dissolution, sa stabilité, sa perméation et son métabolisme. Le CBD est hautement lipophile, avec une valeur log P allant

de 6 à 7, et hydrophobe, présentant une miscibilité de 2 à 5 μ g/ml dans l'eau. Il est également sensible à la lumière, à la température et à l'oxydation (Mahmoudinoodezh et al., 2022). De nouvelles stratégies doivent donc être développées pour compenser ces caractéristiques. Cette section abordera les modes d'administration avec lesquels le CBD peut être administré ainsi que le système transdermique caractérisé dans le cadre de ce projet.

2.2.5.1 L'administration orale

L'administration orale du CBD est la voie la plus explorée, mais engendre une faible biodisponibilité. Le problème est en partie attribué à l'environnement très acide de l'estomac et au métabolisme hépatique de premier passage, qui inactive environ 80-95 % du CBD. D'autres facteurs incluent une absorption lente et irrégulière, une faible efficacité thérapeutique et des défis associés au dosage administratif. Par conséquent, seulement 6 à 19 % de la dose a été rapportée dans le plasma sanguin après l'administration orale et n'a été détectable que pendant une courte période avec un pic 1 à 4 heures après l'administration et une diminution significative après 6 heures (Mahmoudinoodezh et al., 2022). Par conséquent, des doses répétées sont nécessaire afin d'obtenir un effet thérapeutique, ce qui pourrait limiter l'acceptation du traitement de la part des patients. De plus, le dosage répété pourrait également être problématique pour les patients sous chimiothérapie en raison de nausées et de vomissements (Tijani et al., 2021).

En revanche, le placement sublingual pourrait éviter la dégradation par les enzymes hépatiques et l'acidité intestinale. De plus, il permet une absorption rapide dans le sang et est facile à utiliser. Cependant, cette voie est associée à une augmentation considérable de production salivaire, provoquant la déglutition du produit. Ainsi, les avantages associés aux applications sublinguales sont perdus (Tijani et al., 2021).

Quant à l'inhalation de CBD, par fumage ou vaporisation, sa biodisponibilité est respectivement de 2 à 56 % et jusqu'à 50 %. Cependant, l'inhalation est associée à des impacts pulmonaires néfastes, à des effets non ciblés et à des effets incohérents en fonction de la longueur, du volume, de la durée et du taux d'inhalation (Mahmoudinoodezh et al., 2022).

2.2.5.2 Les routes alternatives : intranasale, rectale et intraveineuse

Des voies alternatives d'administration du CBD, telles qu'intranasale, rectale et intraveineuse, permettent une absorption rapide dans la circulation systémique en raison de la présence de

plusieurs structures vasculaires ainsi que de la nature des tissus impliqués. Cette approche évite le métabolisme hépatique et l'instabilité gastrique, conduisant à une biodisponibilité améliorée (Mahmoudinoodezh et al., 2022). Cependant, des défis importants sont associés à ces voies. L'administration de doses thérapeutiques de CBD via l'épithélium nasal est difficile en raison du caractère lipophile du composé. Il peut également provoquer une irritation de la muqueuse nasale et une clairance mucociliaire. Par conséquent, les médicaments à action prolongée conviennent mieux à cette méthode d'administration que les doses administrées de manière chronique (Tijani et al., 2021). Quoique l'administration de CBD par voie intraveineuse permet de rejoindre directement le flux sanguin, elle est généralement indésirable en raison de sa nature invasive chez le patient et du risque accru d'infection (Mahmoudinoodezh et al., 2022).

2.2.5.3 L'administration topique et transdermique

Différents récepteurs du CBD sont localisés au niveau de la peau, comme représenté sur la figure 2.9, indiquant qu'il pourrait agir directement dans ce tissu. Par conséquent, une application topique et transdermique pourrait constituer une alternative viable à l'administration du CBD. Ces méthodes d'application sont d'un grand intérêt, car elles évitent les problèmes associés aux modes d'administration conventionnels et peuvent procurer une biodisponibilité élevée avec un niveau plasmatique stable et un bon profil de sécurité. De plus, les effets du CBD sont principalement locaux, ce qui contribue à diminuer les effets secondaires ainsi que la dose totale requise pour atteindre le site inflammatoire (Mahmoudinoodezh et al., 2022). Cependant, l'administration transdermique de médicaments se heurte à des défis, notamment la perméation cutanée. Ainsi, pour développer des technologies efficaces d'administration cutanée pour le CBD, il est essentiel de comprendre la structure de la peau.

La peau est la barrière entre le corps et son environnement. Elle comprend trois couches : l'hypoderme, le derme et l'épiderme. La couche cornée, ou stratum corneum (SC), est la couche externe de l'épiderme et est principalement composée de cornéocytes remplis de kératine enfermés dans une matrice lipidique de céramides, d'acides gras libres et de cholestérol (Kováčik et al., 2020 ; Tijani et al., 2021). Elle protège essentiellement les autres couches de la peau et contribue à la perméabilité cutanée. Ainsi, seuls quelques composants peuvent traverser cette couche, comme l'eau et les molécules de faible poids moléculaire, par des voies paracellulaires (intercellulaires), transcellulaires (intracellulaires) ou trans-appendiculaires (par exemple, les follicules pileux et

glandes sudoripares). Par conséquent, la pénétration des agents thérapeutiques à travers cette couche constitue l'une des étapes limitantes des applications topiques et transdermiques. Un autre défi associé à cette voie concerne les couches hydrophiles de la peau situées sous le SC. Par conséquent, les médicaments doivent être suffisamment lipophiles pour traverser le SC et suffisamment hydrophiles pour pénétrer dans les autres couches de la peau (Tijani et al., 2021).

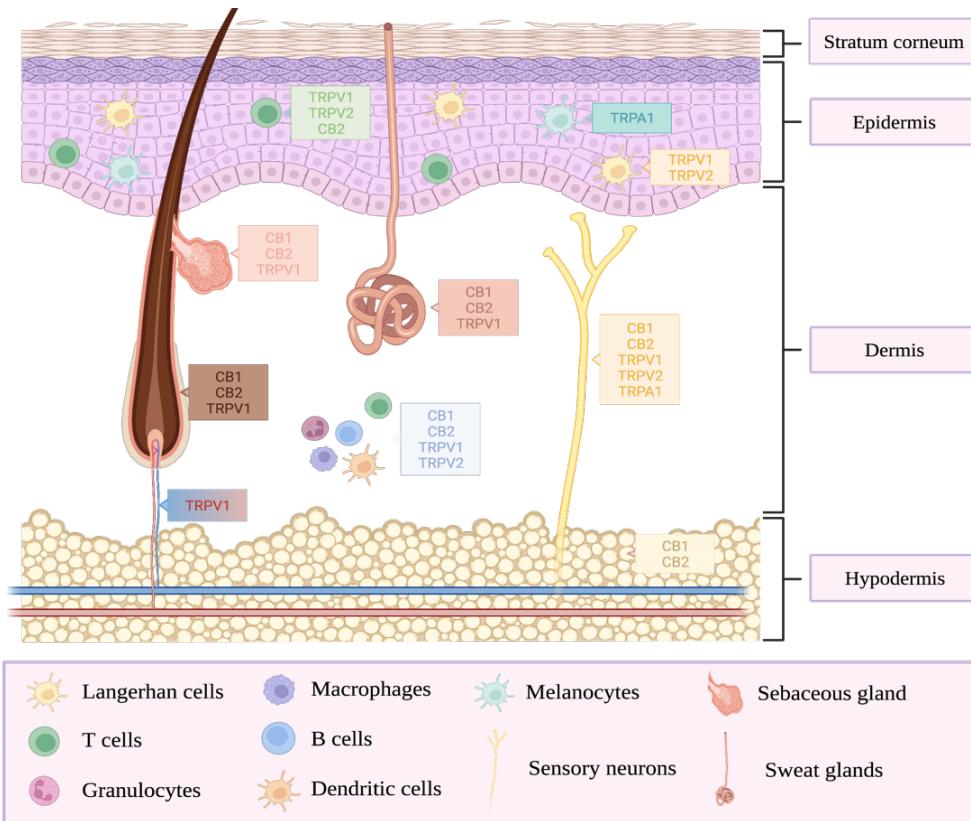


Figure 2.9 Récepteurs du cannabidiol de la peau (Lefebvre et al., 2024). La présence de récepteurs à CBD dans la peau suggère une action locale de la part du composé dans ce tissu, menant à une biodisponibilité augmentée du composé au site actif, à des effets secondaires minimaux ainsi qu'à une dose administrée plus basse que celle associée aux modes conventionnels.

Les médicaments doivent respecter des caractéristiques spécifiques pour assurer une perméation et une diffusion adéquates dans la peau. Idéalement, ils doivent être modérément lipophile, avoir un poids moléculaire inférieur à 500 g/mol, un point de fusion inférieur à 250 °C, une potentialité élevée et une valeur log-P comprise entre 1 et 3 (Kováčik et al., 2020 ; Tijani et al., 2021). Par conséquent, la lipophilie élevée du CBD en fait un candidat inadéquat pour cette application, car il a tendance à s'accumuler dans le SC au lieu de diffuser à travers d'autres couches de la peau. Par conséquent, des stratégies sont en cours de développement pour améliorer l'administration

transdermique de tels composés afin de surmonter ces caractéristiques défavorables. Parmi celle-ci figurent l'ajout d'amplificateurs de pénétration chimique et/ou biologique, l'appariement d'ions, les systèmes eutectiques, les amplificateurs de perméation physique et l'encapsulation dans des systèmes d'administration lipidiques ou polymérique (nanoparticules (NP) et nano-gels), pour n'en nommer que quelques-uns, tel que l'illustre la figure 2.10 (Tijani et al., 2021). Ainsi, un système de nanocapsules polymériques pour le relargage transdermique du CBD est en cours de développement dans nos laboratoires à Qeen-Bio Therapeutics (Tawil et Lépine, 2023).

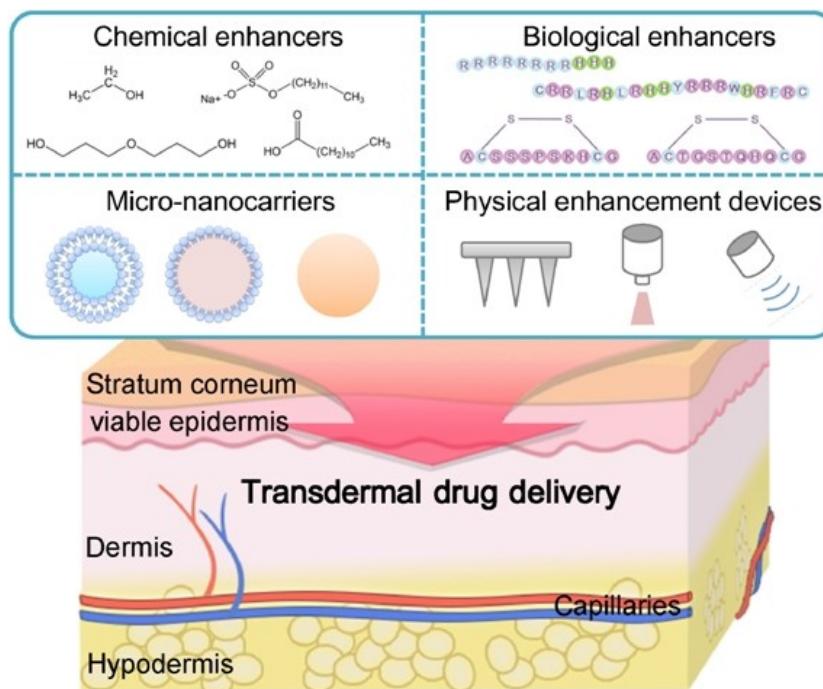


Figure 2.10 Stratégie de livraison du CBD (Xu et al., 2020). La perméation du CBD dans la peau peut être réalisée grâce à l'une ou plusieurs des stratégies mentionnées ci-dessus.

2.2.6 Des nanocapsules de poly- (ester amide urée)

Les systèmes de relargage transdermique du CBD au sein de ce projet consistent en des nanocapsules de poly-(ester amide urée) (PEAU) dont la structure générale est montrée dans la figure 2.11. Dans cette structure, R₁ est un groupement $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, R₃ est un groupement $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ et R₂ et R₄ sont tous deux les chaînes latérales de la L-leucine (Tawil et al., 2020).

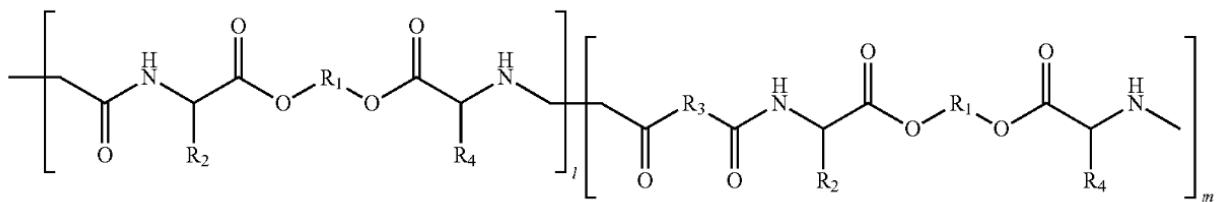


Figure 2.11 Structure générale à la base du polymère PEAU (Tawil et al. 2020). Celui-ci est composé d'acides aminés, notamment de L-leucine.

La composition en acides aminés permet une bonne biocompatibilité entre le polymère et le corps (Tawil et al., 2020). De plus, celui-ci est facile à produire, peu coûteux, stable, biodégradable et ne cause pas de réaction immunologique, ce qui en fait un excellent candidat pour le relargage transdermique de CBD. Sa dégradation graduelle en milieu physiologique, notamment par l'action des estérases, permet d'autant plus un relargage prolongé et contrôlé du CBD tout en lui procurant une protection contre le corps. De plus, les produits de dégradation de PEAU sont biocompatibles étant donné que la dégradation du bloc poly-(ester amide) forme des acides aminés et des diols zwittérioniques, alors que la dégradation du bloc poly-(ester urée) relargue des métabolites normaux tel que du CO₂ ainsi que des acides aminés et diols neutres. La vitesse de dégradation de ce polymère est également modulable, en changeant entre-autres sa composition exacte et son poids moléculaire. Une fois les nanocapsules formées, il est également possible d'ajuster la vitesse de relargage du CBD en changeant la taille et l'épaisseur des nanocapsules. De plus, ce polymère démontre une bonne stabilité thermique et une bonne force mécanique en raison des groupements amides formant de fortes liaisons intermoléculaires (Tawil et al., 2020).

Le polymère PEAU peut être synthétisé par la polycondensation interfaciale de monomère L6 de sel d'acide di-p-sulfonique de bis-(L-leucine)-1,6-hexylènediester avec du trisphogène/chloride de sébacoyl dans un système d'eau et de dichlorométhane (DCM). La synthèse du polymère L6 est exécutée en présence d'acide p-toluène sulfonique par condensation de la L-leucine avec du 1,6-hexadiol dans du cyclohexane reflué, en raison de la faible toxicité de ce solvant en comparaison avec le benzène. La synthèse de celui-ci se termine sur une purification incluant des étapes de recristallisation, de filtration et de séchage sous vide.

La formation des nanocapsules est ensuite réalisée par une technique de double émulsion eau-huile-eau et évaporation de solvant (Tawil et Lépine, 2023). Dans cette technique, la phase huile peut

être remplacée par une phase hydrophobe, tel que par des solvants organiques. Ainsi, le tableau 2.2 résume les paramètres utilisés dans la fabrication des formulations V2.5 et V8.4 qui sont utilisées au sein de ce projet.

Tableau 2.2 Paramètres de fabrication des formulations V2.5 et V8.4

Formulation	Solution aqueuse 1	Solution organique	Solution aqueuse 2	E1	E2
V2.5	720µl d'huile de CBD 1500 + 480µl kolliphore P188 (2.5%)	12ml de polymère PEAU (12.5%) dans DCM	30ml PVA 8-88 (10%)	35000 RPM pour 30s	35000RPM pour 10min sur glace
V8.4	915µl d'huile de CBD 3000 + 285µl Kolliphor P188 (4.21%)	12ml de polymère PEAU (12.5%) dans DCM	30ml PVA 8-88 (10%)	35000 RPM pour 30s sur glace	35000 RPM pour 10min. sur glace

Dans celles-ci, la première phase aqueuse est constituée de 720µl d'huile de CBD ajoutée à 480µl de surfactant aqueux, soit le Kolliphor P188, agissant à titre d'agent stabilisant permettant de créer une phase homogène pour la première émulsion étant donné le caractère lipophile du CBD. Cette phase est ensuite incorporée grâce à une homogénéisation de 30 secondes dans une phase de polymère PEAU (ratio 25 :75, l+m=1, M=30kDa) dissout dans un solvant organique, soit le DCM, remplaçant dans notre cas la phase huileuse dû au caractère immiscible du DCM dans l'eau. Ce solvant aurait pu être remplacé par un autre solvant organique convenable, tel que l'acétate d'éthyle ou le chloroforme (Tawil et Lépine, 2023). L'émulsion « eau dans huile » résultante est ensuite incorporée dans une phase aqueuse d'alcool polyvinyle (PVA) 8-88 par homogénéisation pendant 10 minutes sur glace pour former l'émulsion finale « eau dans huile dans eau ». Le PVA joue ainsi un rôle d'expiant servant d'autant plus à stabiliser le système colloïde ayant été formé. Le solvant organique est ensuite laissé pour évaporation sous agitation constante sur une durée de 18 heures, ce qui permet le durcissement des capsules. La figure 2.12 résume la technique utilisée pour la

synthèse des capsules. Les caractéristiques des capsules synthétisées basées sur les résultats précédemment obtenus au laboratoire démontrent que la taille des capsules générées s'étend de 200-1000nm, avec une majorité de capsules ayant une taille de 400nm. L'efficacité d'encapsulation quant à elle, se situe à environ 51.3% (Tawil et Lépine, 2023).

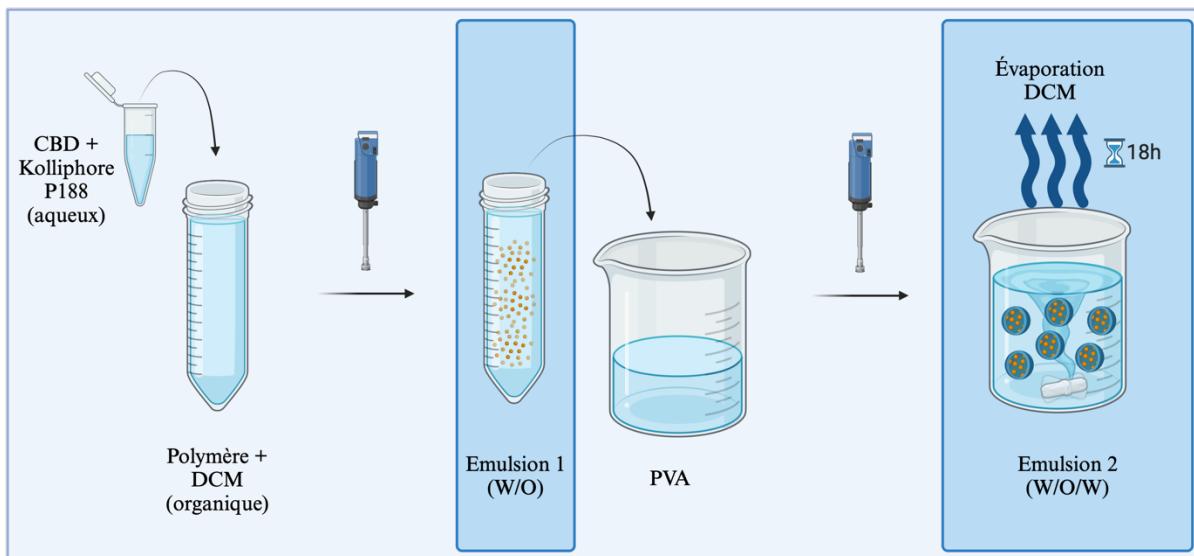


Figure 2.12 Méthode simplifiée de fabrication des nanocapsules utilisées dans le projet. La solution aqueuse de cannabidiol et de kolliphore P188 est ajoutée à la solution organique de polymère PEAU et de dichlorométhane, puis homogénéisée. L'émulsion 1 « eau-huile » est ensuite ajoutée à une solution aqueuse d'alcool polyvinyle et homogénéisée pour former l'émulsion 2 « eau-huile-eau ». L'évaporation du DCM permet le durcissement des capsules.

CHAPITRE 3 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF DU PROJET

3.1 Problématique

Cette section résume la problématique et les enjeux à la base de ce projet :

- Les maladies inflammatoires chroniques sont la cause la plus significative de mort dans le monde. L'organisation mondiale de la santé (WHO) classe les maladies inflammatoires comme étant la plus grande menace à la santé humaine (World Health Organization, 2023).
- À elle seule, l'arthrite affecte environ 350 millions de personnes dans le monde, avec au-delà de 6 millions de Canadiens, soit 1/5 de la population. Ce nombre devrait passer à 9 millions d'ici 2040 (Badley et al., 2019; World Health Organization, 2023)
- Selon le rapport de l'équipe de recherche interdisciplinaire du Service communautaire de recherche et d'évaluation sur l'arthrite (ACREU), les gens atteints d'arthrite sont 4x plus à risque d'avoir un mauvais état de santé, 2x plus à risque de voir leur santé mentale se détériorer, 4x plus susceptibles d'avoir des problèmes de mobilité et 2x plus d'être exclus du marché du travail, que les gens non-atteints. D'autant plus, 40% ont des douleurs limitant leur activité quotidienne (Badley et al., 2019).

3.2 Question de recherche

La formulation de nanocapsules de CBD fabriquées à base du polymère biodégradable PEAU en suspens dans le PVA en cours de développement dans nos laboratoires est-elle sécuritaire et pourrait-elle servir pour le soulagement des douleurs inflammatoires chroniques?

3.3 Hypothèses

Les hypothèses relatives à la question de recherche sont :

- La formulation ne présentera pas de caractères mutagénique ou cytotoxique.
- La formulation devrait contribuer à la guérison de plaies dermatiques.
- La formulation devrait réduire le phénotype inflammatoire.

3.4 Objectifs

L'objectif principal de ce projet est de contribuer à la caractérisation du système de nanocapsules en cours de développement. De façon plus spécifique, les objectifs sont :

- Caractériser l'effet de la formulation V2.5 sur la migration fibroblastique pour la guérison de plaie.
- Évaluer l'effet cytotoxique de la formulation V8.4 sur une lignée de fibroblastes
- Évaluer le caractère mutagène de la formulation V8.4 sur des souches de *Salmonella*
- Évaluer l'effet anti-inflammatoire sur une lignée de macrophages.

Les tests sélectionnés ont été choisi selon les tests utilisés dans des études similaires, puis selon les recommandations de l'OECD tout en présentant l'avantage d'être peu coûteux contrairement à d'autres tests précliniques (Bunman et al., 2023; Dummann et al., 2023; Gerasymchuk et al., 2022; Kongkadee et al., 2022; Moltox, 2021; Mlost et al., 2020; OECD, 2020; Pagano et al., 2022; Parikh et al., 2024; Verrico et al., 2020; Zheng et al., 2022). Aussi, les souches cellulaires et bactériennes ayant été choisies comportent l'avantage d'être bien établies et documentées, tout en étant des souches couramment utilisées pour ces types de tests. Enfin, bien que le test de migration fibroblastique ne contribue pas à démontrer l'effet anti-inflammatoire de la formulation, celui-ci a tout de même été effectué en raison d'une opportunité qui s'est offerte au sein de la compagnie, comme piste d'utilisation alternative de la formulation.

CHAPITRE 4 MÉTHODES

4.1 Réactifs

Le mélange de milieu/nutriments Dulbecco's Modified Eagle Medium Ham's F12 (DME-F12) 1X (Cat# SH30023.01), le sérum fœtal bovin Gibco™ (FBS) (Cat# A4766801), le Gibco™ PBS pH7,4 (1X) (Cat # 10010031), le CyQUANT™ MTT cell Viability Assay (Cat#V13154) et les ensembles d'ELISA TNF alpha Mouse ELISA Kit (Cat#BMS607-3) et IL-10 Mouse ELISA Kit (Cat#BMS614) ont été obtenus auprès de Thermo Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). La solution d'antibiotique de pénicilline-streptomycine (Cat# P4333-100ML), la solution trypsin-EDTA (Cat# T4049-500ML), le bleu de trypan (Cat# T8154-100ML), la solution de lipopolysaccharides de *Escherichia coli* O55: B5 (Cat#L6529) et la solution d'hydrocortisone (50µM) (Cat#H6909-10ML) ont été achetées chez Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). L'ensemble EpiDerm™ a été obtenu de MatTek (Ashland, MA, États-Unis). L'ensemble de test de mutagénicité de Salmonella (Cat # 31-100.2) a été acheté auprès de Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC, États-Unis).

4.2 Culture cellulaire

Les fibroblastes du clone NCTC 929 [cellule L, L-929, dérivé de la souche L] (ATCC® CCL-1™) et les macrophages RAW264.7 (ATCC® TIB-71) ont été achetés chez Cedarlane (Burlington, ON, Canada) et cultivés en monocouche dans des flacons T25 en utilisant du DME-F12 contenant 10 % FBS et 1 % de pénicilline-streptomycine dans un incubateur humidifié à 37°C et 5 % de CO₂. Des passages cellulaires ont été effectués 2 fois par semaine en utilisant la méthode de digestion à la trypsine pour les fibroblastes et de grattage pour les macrophages. Pour assurer la croissance saine des cellules, le milieu de culture a été changé tous les deux jours.

4.3 Test de fermeture de la plaie¹

Les modèles de peau humaine *in vitro* pleines épaisseurs composés de kératinocytes épidermiques humains normaux (NHEK) et de fibroblastes dermiques humains normaux (NHFB) cultivés en multicouche, préalablement perforés par le manufacturier à l'aide d'une biopsie à l'emporte-pièce 3mm, ont été cultivé dans un milieu EFT-400 à 37°C et 5% CO₂ (Mattek Corporation, 2015). Le

¹ Seul test réalisé sur la formulation V2.5

milieu de culture a été remplacé tous les jours par du milieu frais. Les tissus ont été traités avec la formulation V2.5 pour 0, 24, 48 et 72h. Les contrôles positifs et négatifs sont le DMEM + 2% sérum humain et le TMN 10% respectivement. Post-traitement, les tissus ont été fixés au formol à température pièce pour 24 heures et transférés dans du PBS. Les tissus ont ensuite été retourné au fournisseur pour des analyses histologiques grâce à une coloration à l'hématoxyline et l'éosine.

4.4 Test de mutagénicité sur *Salmonella typhimurium* (test AMES)

Le test de mutagénicité a été réalisé selon les directives du manufacturier (Moltox, 2021). Les souches TA98, TA100, TA1535 et TA1537 ont été cultivées dans un bouillon nutritif Oxoid #2 à 37°C sans agitation durant la nuit. Les cultures ont ensuite été mises sous agitation à 125tr/min à 37°C jusqu'à obtention d'une densité de $1-2 \times 10^9$ bactéries/ml ($DO_{650\text{nm}} = 1.0-1.4$). Les conditions tests ont été ajoutées au top agar supplémenté en histidine/biotine, vortexées et ajoutées au pétri contenant préalablement de l'agar glucose minimal. Les contrôles utilisés sont décrits dans le tableau 4.1. Les autres conditions consistent en la version V8.4 ainsi que 4 dilutions en série de celle-ci en facteur de 3 en présence et en absence de fraction hépatique S9 (10%), tel que suggéré par le manufacturier. Des pétris QUAD PCTM ont également été inoculés en parallèle avec les souches afin de valider leur phénotype. Le cadran I de ce pétri contient un milieu d'agar glucose minimal (GM) supplémenté avec un excès de biotin, le cadran II contient un milieu d'agar GM supplémenté en biotine et en histidine sur lequel un disque de crystal violet a été déposé, le cadran III contient un milieu d'agar GM supplémenté en excès en biotine et en histidine ainsi que 24µg/ml d'ampicilline et le cadran IV comprend un milieu d'agar supplémenté en excès en biotine et en histidine avec 2µg/ml de tétracycline. Les pétris sont incubés à 37°C pour 48h et la croissance des colonies bactériennes est évaluée.

Tableau 4.1 Contrôles utilisés dans le test AMES.

	Souche	Sans S9	Avec S9
Contrôle positif	TA98	Daunomycine (6µg/100µl)	2-aminoanthracène (10.0µg/100µl)
	TA100	Azide de sodium (1.5µg/100µl)	
	TA1535	Azide de sodium (1.5µg/100µl)	
	TA1537	ICR 191 Acridine (1.0µg/100µl)	
Contrôle Négatif	Toutes les souches	Solvent (eau) (100µl)	Solvent (DMSO) (100µl)

4.5 Test de cytotoxicité MTT sur fibroblastes L929

La cytotoxicité des capsules, de l'huile de CBD et de la formulation V8.4 a été testée par MTT selon le protocole du manufacturier (ThermoFisher Scientific, 2021). Les fibroblastes ont été ensemencés à une concentration de $1,0 \times 10^5$ cellules/ml dans 100µl de milieu de culture sur une plaque de culture 96 puits, puis laissées pour attachement pour 24h sous incubation. Le milieu de culture a été retiré et les cellules ont été rincées avec 100µl de PBS. Les cellules ont été traitées avec les contrôles et les conditions expérimentales; le milieu de culture non traité et le Triton X-100 (1 % v/v) ont été utilisés comme contrôles, tandis que les autres conditions consistent en les capsules vides (1 :1000), l'huile de CBD (1.5µg/ml), ainsi que la formulation V8.4 diluée à 1 :100, 1 :1000 et 1 :10000. Après 0, 24, 48 et 72h d'incubation, les cellules sont lavées avec 100µl de milieu frais et 10µl de solution MTT (12mM) a été ajouté à chaque puit. Les cellules sont incubées pendant 4h et 100µl d'une solution de SDS-HCl (10mM) est ajoutée aux puits. Les cellules sont remises sous incubation pour un 4h additionnel et les mesure d'absorbance sont prises à l'aide d'un lecteur de plaque à 570nm. Les résultats sont rapportés l'équation suivante :

$$\% Viabilité = \frac{Moyenne D.O.Échantillon}{Moyenne D.O.Ctl+} \times 100 \quad 4.1$$

4.6 Quantification par ELISA de TNF- α et IL-10 sécrété par des macrophages RAW264.7 conditionnés au LPS

Les macrophages RAW 264.7 ont été ensemencées à une densité de 1.5×10^5 cellules/puits sur une plaque 24 puits puis mis sous incubation pour la nuit. Le milieu de culture a été remplacé par $250\mu\text{l}$ de DMEM et $125\mu\text{l}$ de conditions tests, puis mis sous incubation pendant 4h. Les contrôles utilisés sont les cellules non traitées et l'hydrocortisone $50\mu\text{M}$. Les autres conditions sont : les capsules vides (1 :1000), l'huile de CBD (100ng/ml) ainsi que 3 dilutions de la formulation V8.4 (1 :100, 1 :1000, 1 :10000). Ensuite, $125\mu\text{l}$ d'une solution de lipopolysaccharides (LPS) ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) a été ajoutée aux puits et laissé sous incubation pour 20h. Le surnageant a été récolté, puis les niveaux de TNF- α et IL-10 ont été analysés avec des ensembles ELISA, selon les instructions du manufacturier (ThermoFisher Scientific, 2018; ThermoFisher Scientific, 2023).

4.7 Analyses

Les moyennes des données obtenues par MTT en provenance de triplicata ont été analysées par ANOVA à deux côtés, suivi d'une correction post-hoc de Dunnett. Les résultats sont considérés significatifs lorsque $p < 0.05$. Les moyennes des résultats obtenus par ELISA en provenance de duplicita ou triplicata ont été analysées par un test ANOVA à un côté, suivi d'une correction post-hoc de Tukeys. Les tests analytiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prisme [version 10] (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

CHAPITRE 5 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Tel que mentionné, diverses études ont déjà rapporté les effets thérapeutiques et l'aspect sécuritaire du CBD, tel que ses effets anti-inflammatoires et analgésiques, ainsi que l'absence de cytotoxicité et de mutagénicité de ce composé (Atalay et al., 2020; Bunman et al., 2023; Dummann et al., 2023; Mlost et al., 2020; Pagano et al., 2022; Verrico et al., 2020; Zheng et al., 2022). Ainsi, l'objectif de ce projet était de caractériser divers aspects d'une formulation de nanocapsules polymériques de CBD ayant été développée dans nos laboratoires. Les capsules étant composées de polymère PEAU, de CBD et de PVA devraient ainsi démontrer efficacité et sécurité en vue d'une approbation, car les composés utilisés dans sa fabrication ont précédemment été testé et qu'aucun effet néfaste n'a été rapporté.

5.1 Test de fermeture de la plaie

Le test de fermeture de la plaie sur un modèle pleine épaisseur de peau synthétique humaine peut notamment être utilisé pour évaluer les phénomènes dermiques où les interactions fibroblastes-kératinocytes sont importantes, telles que les propriétés antivieillissement, d'hydratation de la peau, de protection contre les rayons UV et de réépithélisation d'une plaie. En effet, ce modèle démontre des propriétés morphologiques et de croissance similaires à un modèle *in vivo* (Mattek Corporation, 2015). Ainsi, une plaie a été infligée à la peau afin d'évaluer l'effet de la formulation V2.5 sur la réépithélisation de la plaie. En effet, plusieurs études ont démontré que le CBD pourrait contribuer à accélérer la guérison de plaies dans divers modèles *in vitro* ainsi que plusieurs études animales (Gerasymchuk et al., 2022; Parikh et al., 2024). Pour ne nommer que quelques exemples, les résultats obtenus par Miller et al. démontrent une fermeture de plaie 75% plus rapide en présence de CBD qu'en son absence chez des fibroblastes primaires porcins, tandis que l'équipe de Gerasymchuk ont obtenu un résultat similaire chez des fibroblastes humain dermiques adultes (Gerasymchuk et al., 2022, Miller et al., 2020).

En se référant à la figure 5.1, il est possible de voir que les capsules ainsi que la formulation V2.5 ne stimulent pas la migration des fibroblastes dans la plaie, soit la couche supérieure en magenta. En effet, après 48h d'incubation, il est possible d'observer un comportement migratoire similaire entre les conditions tests et le contrôle négatif, soit le TMN 10%. En effet, dans les 3 cas, il est possible d'observer l'absence de fibroblastes dans la plaie. À 72h, il est d'autant plus possible de

voir l'absence de migration cellulaire des conditions tests en comparaison avec les deux contrôles. À l'inverse, le contrôle positif, soit le sérum humain 2%, démontre une migration fibroblastique dès 48h, soit le résultat qui était attendu en présence de notre formulation. Il est hypothétisé que l'absence de migration peut être notamment dû à une certaine toxicité de la part du polymère. En effet, le polymère était préparé en masse et entreposé sous forme de solution dans les premières versions de la formulation, ce qui pourrait augmenter la quantité de composés organiques résiduels dans la formulation finale. Pour remédier à la situation, les versions subséquentes ont donc été préparées selon les besoins. De plus, la formulation V2.5 a été délaissée au cours de ce projet, car sa stabilité a été jugée inadéquate et pouvant être optimisée davantage notamment dû à la séparation de la formulation dans les jours suivants l'encapsulation.

Ainsi, il serait intéressant de refaire une expérience similaire afin d'évaluer le potentiel de la formulation V8.4 ayant été synthétisée avec un polymère fraîchement dissout dans le DCM. Il serait également intéressant de faire l'expérience avec un contrôle d'huile de CBD seule afin de voir s'il serait possible de reproduire les résultats des autres études, ce qui n'a pas été réalisé dans ce premier essai dû à un nombre de peaux synthétiques limité.

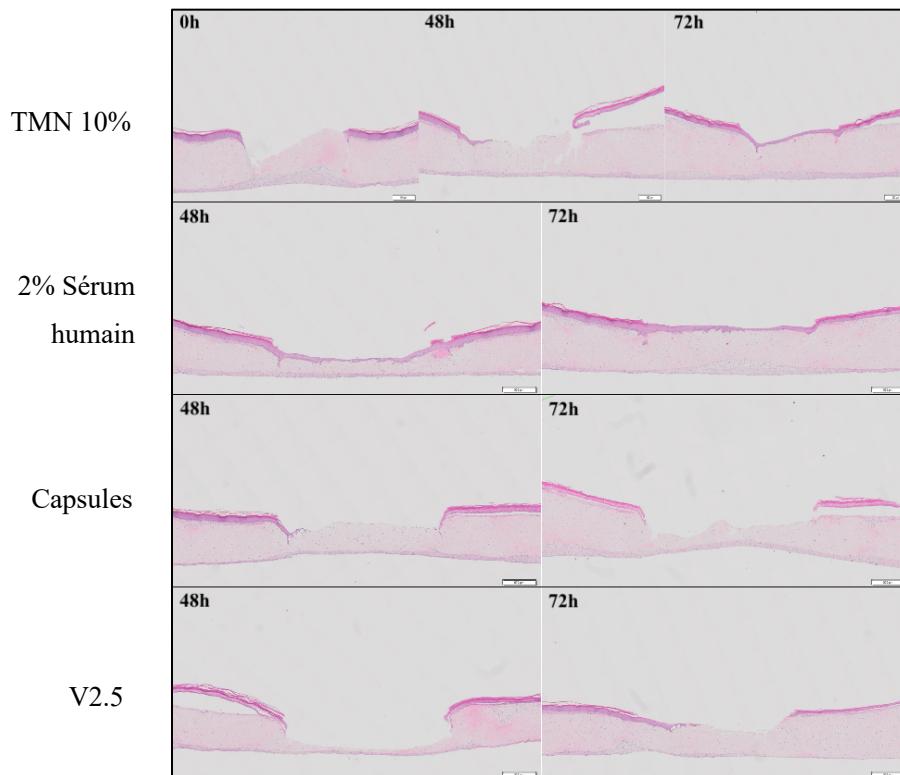


Figure 5.1 Effet du système de relargage (avec et sans CBD) sur la fermeture d'une plaie dans un modèle de peau synthétique EpiDermFTTM, teint à l'hématoxyline and éosine. La formulation et les capsules ne semblent pas contribuer à la fermeture de la plaie.

5.2 L'absence de mutagénicité sur les 4 souches de *Salmonella typhimurium* est observée à la suite du traitement de V8.4.

Certains agents chimiques sont capables d'induire des mutations et peuvent potentiellement endommager les cellules menant notamment à des problèmes de fertilité et des cancers (Mortelmans et Zeiger, 2000). Ainsi, l'identification de ces substances est essentielle lors de l'évaluation et du développement de produits. Différentes souches de *Salmonella* sont utilisées dans le test AMES afin que chacune porte des mutations spécifiques dans les gènes de l'opéron de l'histidine, ce qui assure que diverses classes d'agents mutagènes (tels que les agents alkylants, les agents intercalants et les inhibiteurs enzymatiques) sont couvertes par ce test. Ainsi, lorsque ces souches sont cultivées sur une plaque de gélose à milieu contenant une trace en histidine, seules les bactéries dépendantes à l'histidine (His+) qui reviennent à l'indépendance à l'histidine sont capables de former des colonies. De plus, le nombre de colonies de révertants spontanés, soit les colonies qui révertent même en l'absence d'agent mutagène, est relativement constant. Ainsi, lorsqu'un mutagène est ajouté à un pétri, le nombre de colonies de révertants augmente habituellement en fonction de la dose (Mortelmans et Zeiger, 2000).

Ainsi, les phénotypes des souches bactériennes ont d'abord été testés afin de valider les caractéristiques de chacune des souches. En effet, les souches de *Salmonella* utilisées sont choisies de sorte à répondre différemment aux différentes classes d'agents mutagènes agissant via différents mécanismes (Mortelmans et Zeiger, 2000). Ainsi, les résultats rapportés à la figure 5.2 suggèrent que les souches utilisées pour le test AMES expriment le phénotype attendu. En effet, lorsque la croissance des bactéries sur les pétris QUAD PCTM est comparée aux résultats attendus listés au tableau 5.1, il est possible d'observer que la croissance de TA98, TA100, TA1535 et TA1537 respecte celui-ci (Moltox, 2021).

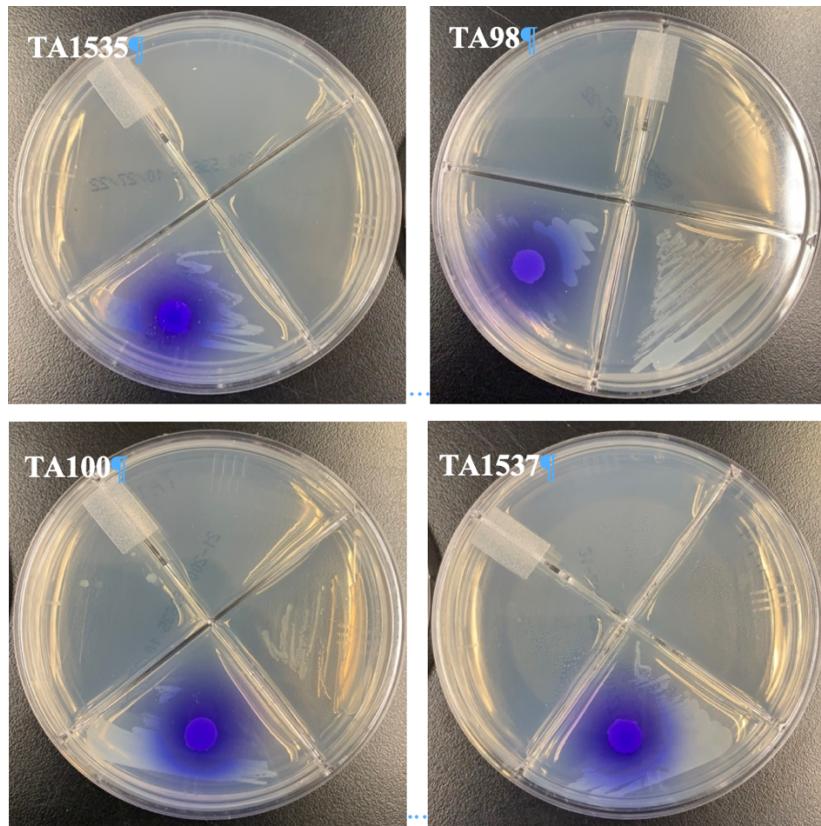


Figure 5.2 Le phénotype des souches TA98, TA100, TA1535 et TA1537 correspond au génotype attendu de ces souches. Celle-ci sont ainsi propices à l'évaluation du caractère mutagénique de la formulation.

En effet, le cadran I sert à tester la dépendance à l'histidine. L'absence de croissance chez toutes les souches confirme cette dépendance. Le milieu du cadran II sert à valider la présence d'une mutation dans le marqueur rfa servant à valider la présence d'un défaut au niveau des LPS constituant la couche de la membrane des bactéries. Ce défaut sert à augmenter la perméabilité des bactéries aux agents chimiques. Ainsi, la zone d'inhibition près du disque valide la présence de cette mutation. Par la suite, seules les souches TA98 et TA100 devraient avoir le plasmide pKM101, soit le plasmide de résistance à l'ampicilline. Ainsi, seules ces souches sont en mesure de croître dans le cadran III. L'absence de croissance dans le cadran IV indique qu'aucune des souches utilisées ne devrait avoir le plasmide de résistance à la tétracycline (pAQ1). Enfin, toutes les souches utilisées comportent une délétion uvrB. Étant donné que cette délétion est située dans la région bio-uvrB, l'absence de cette délétion empêche la réversion des bactéries à leur état sauvage, ce qui est suffisant pour démontrer la dépendance à la biotine des souches en inférant

qu'elles sont également défectueuses dans les voies de réparation exactes de réparation de l'ADN dû à la délétion uvrB (Moltox, 2021; Mortelmans et Zeiger, 2000; Popkin et al., 1989).

Tableau 5.1 Croissance bactérienne attendues des souches utilisées pour le AMES

Cadran	Observation	Génotype
I	Aucune croissance	<i>His</i>
II	Croissance avec inhibition près du disque	His, rfa
III	Croissance pour TA98 et TA100 seulement	pKM101
IV	Aucune croissance	pAQ1

Ainsi, une fois les phénotypes validés, les souches ont donc été testées en présence de la formulation V8.4 ainsi que des dilutions en facteur 3 de celle-ci (Moltox, 2021). Étant donné que le CBD est normalement métabolisé par les cytochromes P450 (CYP450), les conditions ont aussi été testées en présence et en absence de la fraction S9, soit un homogénat de foie riche en CYP450, servant à simuler ce système métabolique normalement absent chez *Salmonella* (Smith et Gruber, 2022; Vijay et al., 2018). En effet, les produits de dégradation de certaines substances peuvent présenter un caractère mutagéniques, ce qui permet d'évaluer celui-ci (Vijay et al., 2018). Les résultats rapportés dans le tableau 5.2 suggèrent l'absence de mutagénicité du produit. En effet, pour qu'une substance soit considérée mutagène, la quantité de colonies de révertants d'une condition expérimentale doit être de 2 à 3 fois supérieure au nombre de colonie du solvant (contrôle négatif), et/ou la présence de toxicité, de précipité et/ou d'une corrélation entre le nombre de colonies de révertants et la concentration de formulation devrait être observable (Moltox, 2021; Mortelmans et Zeiger, 2000; OECD, 2020). Ainsi, les résultats obtenus se comparent à leur contrôle négatif respectifs tout en ne respectant aucune des conditions citées précédemment, ce qui tend vers une absence de mutagénicité chez la formulation V8.4.

Cependant, il est a noté que les résultats des contrôles positifs pour les souches TA1535 et TA1537 en présence de la fraction S9 sont plus bas qu'anticipés, avec des valeurs respectives anticipées à $\geq 200 - 650$ et $\geq 40 - 200$ colonies/pétr. Cela pourrait s'expliquer notamment par une perte d'activité de la part du système d'activation métabolique S9 ou d'une problématique au niveau du

contrôle chimique utilisé. Il serait ainsi intéressant de tester à nouveau ces deux conditions contrôles afin de valider que les valeurs obtenues sont bien et bel aberrantes et ainsi trouver la problématique à la base de ces faibles valeurs. Autrement, les résultats obtenus pour ces souches en absence de la fraction S9 se comparent tout de même à ceux obtenus pour le contrôle négatif, suggérant que le produit est tout de même sécuritaire en ce qui concerne le caractère mutagène dans ces conditions (Moltox, 2021; Mortelmans et Zeiger, 2000). Il est toutefois impossible de tirer des conclusions en présence de la fraction S9, en raison des valeurs obtenues pour les contrôles positifs des souches TA1535 et TA1537.

Tableau 5.2 Effet de V8.4 à différentes concentrations sur 4 souches de Salmonella mesuré AMES.

Échantillon	TA98	TA100	TA1535	TA1537
Colonies/pétris (Moyenne ± SD) (n=3)				
S9- (Sans activation métabolique)				
Contrôle négatif ²	14 ± 3	62 ± 23	9 ± 4	7 ± 0
Contrôle positif ¹	480 ± 267	540 ± 79	520 ± 1	160 ± 6
V8.4 CC	23 ± 1	81 ± 11	8 ± 6	6 ± 1
V8.4 D1	16 ± 3	69 ± 3	11 ± 7	8 ± 4
V8.4 D2	24 ± 1	86 ± 8	14 ± 4	6 ± 4
V8.4 D3	18 ± 0	91 ± 8	9 ± 2	9 ± 1
V8.4 D4	14 ± 6	107 ± 9	8 ± 3	2 ± 0
S9+ (Avec activation métabolique)				
Contrôle négatif ¹	19 ± 1	77 ± 9	11 ± 2	6 ± 1
Contrôle positif ¹	206 ± 133	562 ± 76	12 ± 1	13 ± 2
V8.4 CC	20 ± 1	90 ± 1	3 ± 1	3 ± 2
V8.4 D1	18 ± 2	84 ± 10	0 ± 0	5 ± 2
V8.4 D2	24 ± 4	92 ± 6	12 ± 6	7 ± 1
V8.4 D3	23 ± 5	96 ± 1	7 ± 1	6 ± 3
V8.4 D4	21 ± 1	103 ± 0	10 ± 2	4 ± 1

² Se référer au Tableau 4.1 pour les détails

5.3 Il y a une absence de cytotoxicité chez les fibroblastes L929 en présence des capsules vides, de l'huile de CBD et de la formulation V8.4.

Des tests de viabilité cellulaire sont couramment utilisés lors du développement de produits afin de déterminer si ceux-ci ont un effet sur la prolifération cellulaire ou s'ils engendrent des effets cytotoxiques menant à une mort cellulaire. Les tests de réduction du tétrazolium, tel que le test de réduction du MTT servant à déterminer l'activité métabolique des cellules, reposent sur l'incubation du réactif avec une population cellulaire viable, puis la conversion du substrat en un produit coloré, soit le formazan. Les cristaux de formazan formés peuvent ensuite être solubilisés par un agent solubilisant, notamment l'isopropanol acidifié, le dimethyl sulfoxyde (DMSO), le dimethylformamide, le sodium dodecyl sulfate ou une combinaison de détergeant et de solvant organique, et ainsi être quantifiés par un lecteur de plaque spectroscopique à 570nm. En règle générale, le signal résultant sera proportionnel au nombre de cellules viables présentent dans le puit, étant donné que les cellules mortes perdent la capacité à métaboliser le substrat (Kamiloglu et al., 2020; Riss et al., 2013).

L'effet des capsules, de l'huile de CBD, ainsi que de la formulation V8.4 sur la viabilité des fibroblastes L929 a été évaluée en comparaison des contrôles positifs (DMEM+10%FBS) et négatifs (Triton-X100 1%) à différents intervalles de temps. Comme il est possible de le voir sur la figure 5.3, l'effet des conditions à 0h est non-significatif, tel qu'attendu. En effet, la période d'incubation des composés avec les cellules n'est pas assez longue pour avoir un effet significatif sur celles-ci. À 24h et à 48h, il est possible d'observer que les conditions expérimentales ne diffèrent pas significativement du contrôle positif. À l'inverse, le contrôle négatif est significativement différent ($P<0,05$) du contrôle positif. Enfin, il est possible d'observer une baisse significative de viabilité des fibroblastes après 72h d'incubation pour la formulation V8.4 (1 :100). Ainsi, les capsules vides, l'huile de CBD, ainsi que la formulation V8.4 aux dilutions 1 :1000 et 1 :10000 ne semblent pas affecter à la baisse la viabilité des fibroblastes L929 après 3 jours d'incubation. La baisse de viabilité observée de la formulation V8.4 (1 :100) est potentiellement attribuable à une quantité trop importante de CBD accumulé due à la dégradation du polymère. En effet, certaines études ont démontré que des faibles concentrations de CBD n'engendrent pas d'effet cytotoxique, alors que des concentrations plus importantes pourraient mener à une baisse de viabilité (Kongkadee et al., 2022; Tassaneesuwan et al., 2023). Cependant, la quantité de CBD

estimée à partir des résultats obtenus dans notre laboratoire pour les expériences de relargage *in vitro* est d'environ $0,181\mu\text{g}/\text{ml}^3$, alors que les autres équipes de recherche ne semblent pas observer de diminution de viabilité jusqu'aux environ de $2,5\mu\text{g}/\text{ml}$ (Kongkadee et al., 2022; Tassaneeuwan et al., 2023). De plus, l'huile de CBD seule utilisée dans cette expérience comporte une quantité de CBD plus importante que cette valeur théorique, donc il serait intéressant de refaire une expérience de relargage afin de s'assurer que les valeurs obtenues soient adéquates et de refaire cette expérience afin de s'assurer qu'il ne s'agisse pas d'un problème technique tel qu'un nombre inférieur de cellules ayant été ensemencées dans les puits.

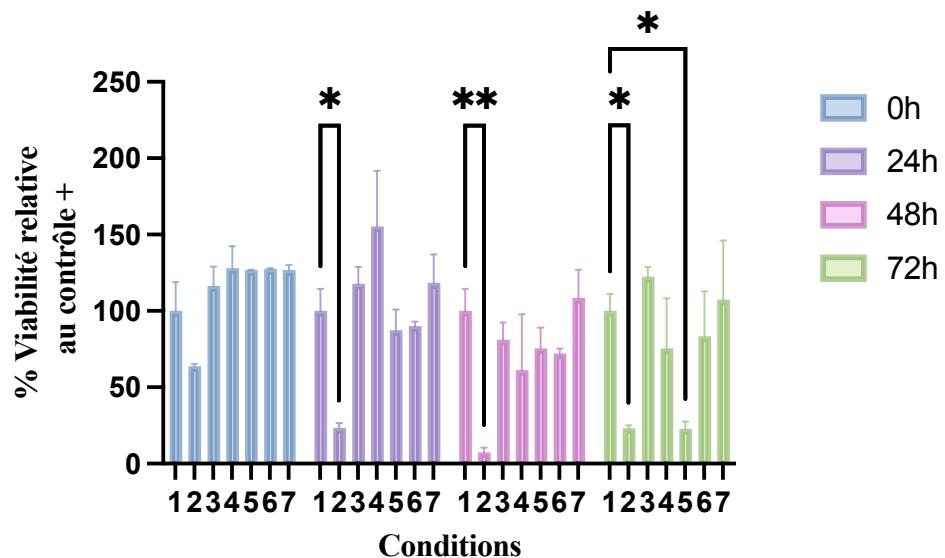


Figure 5.3 Effet du système de relargage (avec et sans CBD) sur la viabilité de fibroblastes L929, mesuré par MTT ($n=3$). Les conditions sont les suivantes **1.** DMEM + 10% FBS + 1% PS **2.** Triton X-100 (1%) **3.** Capsules (1 :1000) **4.** Huile ($1,5\mu\text{g}/\text{ml}$) **5.** V8.4 (1 :100) **6.** V8.4 (1 :1000) **7.** V8.4 (1 :10000). Les résultats significatifs ($p<0,05$) sont indiqués par des astérides.

5.4 Un effet préliminaire anti-inflammatoire chez les macrophages RAW264.7 en présence de la formulation V8.4 (1 :100) est observé

La lignée cellulaire de macrophages de souris RAW264.7 est grandement utilisée pour l'investigation des effets anti-inflammatoire de médicaments et pour évaluer les routes de signalisation qui sont dérégulées dans plusieurs pathologies (Dammann et al., 2023). En effet, la voie pro-inflammatoire médiée par la cascade des récepteurs Toll-like-4 peut être activée dans ces cellules grâce à certains stimuli, tel que les LPS, menant ainsi à une augmentation de la production

³ Basé sur les résultats préliminaires de Tristan Lépine, candidat au doctorat

d'oxyde nitrique et de cytokines pro-inflammatoires pouvant servir de marqueurs inflammatoires validant l'activation des cellules (Palsson-McDermott & O'Neill, 2004). Ainsi, cette lignée cellulaire a été choisie pour évaluer la sécrétion de cytokines, notamment de TNF- α et d'IL-10, en présence de la formulation V8.4. Le contrôle positif utilisé est l'hydrocortisone [50 μ M], car elle est connue pour atténuer l'expression des ARNm de cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'expression des gènes inductible de l'oxyde nitrique synthase à la suite de la stimulation par le LPS (Dong et al., 2018), tandis que les cellules non-traitées constituent le contrôle négatif. Ainsi, dans ce projet, la quantité de cytokines pro-inflammatoires TNF- α et de cytokines anti-inflammatoires IL-10 ont été évaluées à la suite du traitement des macrophages RAW264.7 par les différentes conditions expérimentales, suivit par le traitement au LPS [100 ng/ml]. L'évaluation des taux de cytokines a par la suite été évalué grâce à des ELISA. En effet, la technique d'ELISA est basée sur le concept des réponses immunitaires spécifiques anticorps-anticorps, ce qui permet un moyen de détection très sensible et sélectif de l'analyse quantitative d'anticorps. Pour détecter le taux de ces molécules, un anticorps ou un anticorps est généralement étiqueté en utilisant des enzymes, notamment la phosphatase alcaline (ALP), la peroxydase de raifort (HRP) ou la β -galactosidase. L'anticorps de la phase fluide est immobilisé sur une phase solide, lui permettant ainsi de réagir avec un anticorps spécifique pouvant être détecté à l'aide d'un anticorps secondaire marqué par une enzyme. L'utilisation d'un substrat colorimétrique correspond alors à la quantité d'anticorps présent. Par exemple, l'ALP hydrolyse le p-nitrophényl phosphate pour produire du p-nitrophénol de couleur jaunâtre pouvant être détecté à 405nm, tandis que la HRP catalyse la conversion de substrat chromogénique tel que le sel de diammonium 2,2'-azino-bis (acide 3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) en produit coloré (Sakamoto et al., 2018).

En se référant à la figure 5.4, il est possible d'observer un effet bénéfique sur les cellules en présence de la formulation V8.4 (1 :100) pour les 2 cytokines, soit une diminution significative de la production de TNF- α et une augmentation significative d'IL-10. Cependant, il est possible d'observer que les autres conditions ne mènent pas aux effets attendus. En effet, en ce qui concerne TNF- α , une diminution était attendue pour l'huile de CBD et pour V8.4 aux autres dilutions. En effet, Verrico et al., ont conduit une expérience similaire et ont observé une différence significative dans la production de TNF- α chez les macrophages RAW 264.7 en présence de LPS et de CBD [100ng/ml] en comparaison avec les cellules qui n'ont reçu que le LPS (Verrico et al., 2020).

Muthumalage et Raham ont aussi observé une diminution du phénotype inflammatoire chez les RAW264.7 en présence de CBD. Dans leur étude, les macrophages ont été traités avec 21.2 μ M (6.29 μ g/ml) de CBD et 1 μ g/ml de LPS, ce qui a conduit à une diminution significative dans l'activité de NF- κ B et de la protéine MCP-1 (Muthumalage & Rahman, 2019). Une autre équipe a également observer une diminution du phénotype inflammatoire dans la même lignée en observant une diminution dans la sécrétion de NO dose-dépendante. En effet, les cellules ont été traitées avec 1.25, 2.5 et 5 μ M de CBD (0,393 μ g/ml, 0,786 μ g/ml et 1.57 μ g/ml) et 1 μ g/ml de LPS et l'équipe de recherche a observé une diminution des niveaux des ARNm de iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Kim et al., 2023). Enfin, Dammann et al. ont évalué les niveaux de NO₂⁻ et de TNF- α dans le même modèle que les études précédentes. Ainsi, l'inflammation a été induite par 100ng/ml et 1000ng/ml de LPS et ont observé une diminution des niveaux de TNF- α traités avec 5 μ M de CBD (Dammann et al., 2023). Bien que le design expérimental de cette expérience fût basé celle d'une autre équipe (Verrico et al., 2020), d'autres équipes semblent utiliser des concentrations supérieures en CBD. Ainsi, il est hypothétisé que l'effet bénéfique observé pour V8.4 (1 :100) est dû à l'accumulation de CBD suivant la dégradation des capsules. Or, la quantité estimée est d'environ 23,9ng/ml selon les résultats de relargage précédemment obtenus⁴, ce qui est inférieur à la concentration de CBD seul. Il aurait donc été intéressant de faire l'expérience avec une concentration de nanocapsules diluée 1:100 afin de voir si celles-ci ont un effet à cette concentration, ainsi que de refaire un relargage *in vitro* afin de valider les concentrations en CBD obtenues dans notre laboratoire.

En ce qui concerne la production d'IL-10, une augmentation significative était attendue pour les mêmes conditions, étant donné que le CBD a le potentiel de moduler à la hausse cette cytokine anti-inflammatoire chez les macrophages (Khuja et al., 2019; Verrico et al., 2020). Concernant la sécrétion supérieure d'IL-10 de la part du contrôle négatif, il est hypothétisé par une équipe de recherche ayant obtenu des résultats similaires, soit une augmentation d'IL-10 en présence de LPS et une diminution subséquente suite au traitement, que le CBD, et dans notre cas le contrôle positif, est en mesure de de significativement diminuer les niveaux de cytokines pro-inflammatoires, ce qui conduit d'autant plus à la réduction de la sécrétion d'IL-10 pour maintenir un équilibre. En effet, le LPS induit une réponse inflammatoire chez les cellules et devrait en parallèle également

⁴ Basé sur les résultats préliminaires de Tristan Lépine, candidat au doctorat

induire une réponse anti-inflammatoire pour contrer les hauts niveaux de cytokines pro-inflammatoires, soit un phénomène requis pour assurer la survie des cellules. Pour l'élimination efficace d'un stimuli inflammatoire, la réponse inflammatoire est cruciale. Or, une réponse excessive cause également des dommages tissulaires, ce qui nécessite des mécanismes de régulation négative pour calmer la réponse inflammatoire. Ainsi, dans cette expérience, les niveaux de cytokines pro-inflammatoires sont élevé en réponse au LPS, ce qui mène à une augmentation des niveaux d'IL-10 dans le contrôle négatif, tandis que les cellules traitées ont une augmentation moindre de cytokines pro-inflammatoire, donc un besoin diminué en cytokines anti-inflammatoires (Zaiachuk et al., 2023). Enfin, il serait ainsi intéressant de refaire l'expérience avec différentes doses de CBD afin de voir s'il serait possible d'observer une diminution significative dans la sécrétion de TNF- α en présence de notre huile de CBD. Il serait également intéressant de faire d'autres marqueurs inflammatoires afin de valider l'effet anti-inflammatoire de V8.4.

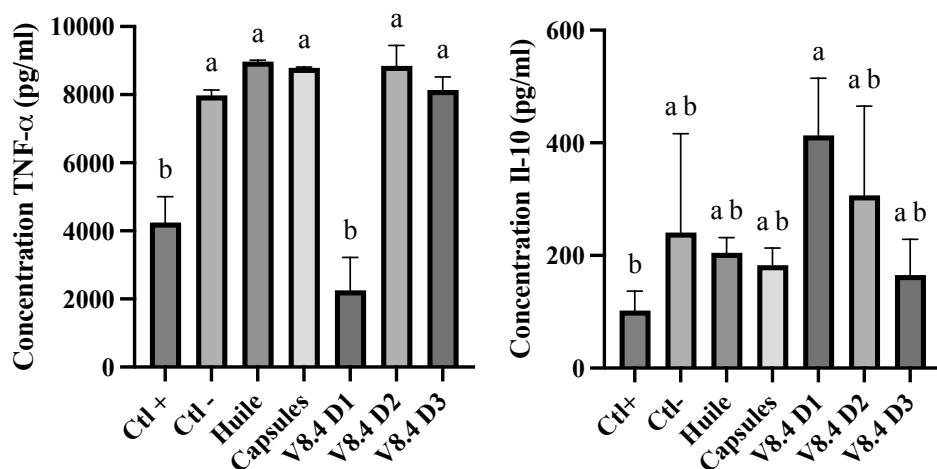


Figure 5.4 Effets du système de relargage (avec et sans CBD) sur la production de TNF- α et d'IL-10 de macrophage RAW264.7, mesuré par ELISA (n=2 et n=3). Les conditions sont les suivantes **1.** Hydrocortisone 50 μ M **2.** Cellules non traitées **3.** Capsules (1 :1000) **4.** Huile (100ng/ml) **5.** V8.4 (1 :100) **6.** V8.4 (1 :1000) **7.** V8.4 (1 :10000). Les lettres signifient les résultats significatifs ($p<0,05$).

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Le besoin de nouveaux traitements pour le soulagement des douleurs chroniques est évident. Les phytocannabinoïdes, plus particulièrement le CBD, pourraient ainsi servir de thérapies ou de compléments aux traitements conventionnels pour la gestion de la douleur et de l'inflammation, tel que rencontré dans les cas d'arthrite.

Ainsi, les expériences réalisées dans le cadre de ce projet indiquent que la formulation de nanocapsules de CBD fabriquées à base du polymère biodégradable PEAU présentement en cours de développement dans les laboratoires de Qeen-Bio Therapeutics pourrait, en théorie, servir de traitement pour les douleurs inflammatoires chroniques. En effet, les résultats préliminaires tendent vers l'absence de caractère mutagène en absence de la fraction S9 et pour 2 des 4 souches en sa présence, ainsi que de caractère cytotoxique, tout en contribuant à minimiser le phénotype pro-inflammatoire de macrophages. D'un autre côté, la formulation initialement utilisée, soit la V2.5, ne semble pas stimuler la migration fibroblastiques dans un but de guérison de plaie. Ainsi, le présent projet pourrait servir de piste thérapeutique pour la traitement de conditions telle que l'arthrite.

Malgré le travail réalisé, il reste beaucoup d'étapes à réaliser avant la mise en marché d'un tel traitement. Notamment, il serait intéressant de retester certaines conditions, tel que l'huile de CBD seule et l'utilisation d'un polymère fraîchement dissout pour l'expérience de fermeture de la plaie, les contrôles positifs en présence de S9 pour les souches TA1535 et TA1537 dans le tests de mutagénicité ou encore des concentrations plus élevées en CBD pour les tests anti-inflammatoires, ce qui contribuerait à valider certains des résultats obtenus. L'optimisation des tests de relargage permettrait d'autant plus de valider les doses réelles à chacun des points contrôles.

De plus, un bon nombre de tests seraient également de mise afin de valider l'efficacité du système. Par exemple, il serait intéressant de tester la perméabilité de la formulation à l'aide de cellule de diffusion de Franz, par exemple, et de voir si l'ajout de rehausseur de perméation chimique serait requis. À plus long terme, il serait également intéressant de tester le système de relargage dans un modèle *in vivo*, tel qu'un modèle inflammatoire adjuvant complet de Freund murin, afin d'évaluer les effets analgésique et anti-inflammatoire de celle-ci.

RÉFÉRENCES

- Amin, M. R., & Ali, D. W. (2019). Pharmacology of Medical Cannabis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1162(1), 151–165. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21737-2_8
- Ashton, J., & Glass, M. (2007). The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Current Neuropharmacology*, 5(2), 73–80. <https://doi.org/10.2174/157015907780866884>
- Atalay, S., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzypkowska, E. (2019). Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/antiox9010021>
- Badley, E., Wilfong, J., Zahid, S., & Perruccio, A. (2019). *THE STATUS OF ARTHRITIS IN CANADA: NATIONAL REPORT*. https://arthritis.ca/getmedia/13aff08f-f206-4c6e-a709-beb80b97bd51/ACREU_Arthritis-Society_National-Report-2019_final.pdf
- Barnes, M. P. (2006). Sativex®: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(5), 607–615. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.5.607>
- Benjamin, O., Goyal, A., & Lappin, S. L. (2022, July 4). *Disease Modifying Anti-Rheumatic Drugs (DMARD)*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863/>
- Benyamin, R., Trescot, A., Trescot, S., Buenaventura, R., Adlaka, R., Sehgal, N., Glaser, S., & Vallejo, R. (2008, March 1). *Opioid Complications and Side Effects*. Pain Physician. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18443635/>
- Bijlsma, J. W. J., van Everdingen, A. A., & Jacobs, J. W. G. (1995). Corticosteroids in Rheumatoid Arthritis. *Clinical Immunotherapeutics*, 3(4), 271–286. <https://doi.org/10.1007/bf03259279>
- Bindu, S., Mazumder, S., & Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180(1), 114147. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114147>
- BioRender (2023). Synovial Joint Anatomy. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-641dc5d8dd8d302fe2843ab5-synovial-joint-anatomy>
- Borges, R., Batista, J., Viana, R., Baetas, A., Orestes, E., Andrade, M., Honório, K., & da Silva, A. (2013). Understanding the Molecular Aspects of Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol as

- Antioxidants. *Molecules*, 18(10), 12663–12674.
<https://doi.org/10.3390/molecules181012663>
- Bovill, J. G. (1997). Mechanisms of actions of opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *European Journal of Anaesthesiology. Supplement*, 15, 9–15.
<https://doi.org/10.1097/00003643-199705001-00003>
- Boyaji, S., Merkow, J., Elman, R. N. M., Kaye, A. D., Yong, R. J., & Urman, R. D. (2020). The Role of Cannabidiol (CBD) in Chronic Pain Management: An Assessment of Current Evidence. *Current Pain and Headache Reports*, 24(2). <https://doi.org/10.1007/s11916-020-0835-4>
- Bunman, S., Muengtaweepongsa, S., Piyayotai, D., Charermroj, R., Kanjana, K., Kaew-amdee, S., Makornwattana, M., & Kim, S. (2023). Analgesic and Anti-Inflammatory Effects of 1% Topical Cannabidiol Gel in Animal Models. *Cannabis and Cannabinoid Research*.
<https://doi.org/10.1089/can.2023.0070>
- Chauhan, K., Jandu, J. S., & Al-Dahir, M. A. (2023, May 25). *Rheumatoid arthritis*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441999/>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory Responses and inflammation-associated Diseases in Organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Dammann, I., Keil, C., Hardewig, I., Skrzyllewska, E., Biernacki, M., & Haase, H. (2023). Effects of combined cannabidiol (CBD) and hops (*Humulus lupulus*) terpene extract treatment on RAW 264.7 macrophage viability and inflammatory markers. *Natural Products and Bioprospecting*, 13(1), 19. <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00382-3>
- De Almeida, D. L., & Devi, L. A. (2020). Diversity of molecular targets and signaling pathways for CBD. *Pharmacology Research & Perspectives*, 8(6). <https://doi.org/10.1002/prp2.682>
- Devinsky, O., Kraft, K., Rusch, L., Fein, M., & Leone-Bay, A. (2021). Improved Bioavailability with Dry Powder Cannabidiol Inhalation: A Phase 1 Clinical Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(12), 3946–3952. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.08.012>
- Dong, J., Li, J., Cui, L., Wang, Y., Lin, J., Qu, Y., & Wang, H. (2018). Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells via the NF-κB and MAPK pathways. *BMC Veterinary Research*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1360-0>

- Etemad, L., Karimi, G., Alavi, M. S., & Roohbakhsh, A. (2022). Pharmacological effects of cannabidiol by transient receptor potential channels. *Life Sciences*, 300, 120582. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120582>
- European Medicines Agency. (n.d.). *EU/3/14/1339 - orphan designation for treatment of Dravet syndrome* | European Medicines Agency. [Www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-14-1339>
- European Medicines Agency . (2022). *Official address Domenico Scarlattilaan 6 • 1083 HS Amsterdam • The Netherlands.* https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p01102022-ema-decision-13-april-2022-acceptance-modification-agreed-paediatric-investigation-plan-cannabidiol-delta-9-tetrahydrocannabinol-sativex-emea-000181-pip01-08-m06_en.pdf
- Gerasymchuk, M., Robinson, G. I., Groves, A., Haselhorst, L., Nandakumar, S., Stahl, C., Kovalchuk, O., & Kovalchuk, I. (2022). Phytocannabinoids Stimulate Rejuvenation and Prevent Cellular Senescence in Human Dermal Fibroblasts. *Cells*, 11(23), 3939–3939. <https://doi.org/10.3390/cells11233939>
- Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of Inflammation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1803, 57–79. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8549-4_5
- Ghlichloo, I., & Gerriets, V. (2023, May 1). *Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs)*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547742/>
- Goodwin, J. L. R., Kraemer, J. J., & Bajwa, Z. H. (2009). The use of opioids in the treatment of osteoarthritis: When, why, and how? *Current Rheumatology Reports*, 11(1), 5–14. <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0002-8>
- Gülck, T., & Møller, B. L. (2020). Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends in Plant Science*, 25(10), 985–1004. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.05.005>
- Hannoodee, S., & Nasuruddin, D. N. (2021). *Acute Inflammatory Response*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556083/#:~:text=Acute%20inflammation%20is%20an%20immediate>
- Health Canada. (2022, July 28). Review of cannabidiol: Report of the Science Advisory Committee on Health Products Containing Cannabis. *Canada*. [https://www.canada.ca/en/health-](https://www.canada.ca/en/health)

- canada/corporate/about-health-canada/public-engagement/external-advisory-bodies/health-products-containing-cannabis/review-cannabidiol-health-products-containing-cannabis.html
- Howlett, A. C., & Abood, M. E. (2017). CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology. *Cannabinoid Pharmacology*, 80, 169–206. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.03.007>
- Jesus, C. H. A., Redivo, D. D. B., Gasparin, A. T., Sotomaior, B. B., de Carvalho, M. C., Genaro, K., Zuardi, A. W., Hallak, J. E. C., Crippa, J. A., Zanoveli, J. M., & da Cunha, J. M. (2019). Cannabidiol attenuates mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats via serotonergic system activation through 5-HT1A receptors. *Brain Research*, 1715, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.014>
- Juneja P, Munjal A, Hubbard JB. Anatomy, Joints. [Updated 2024 Apr 21]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507893/>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for Cell Viability Assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349.
- Katz, J. N., Arant, K. R., & Loeser, R. F. (2021). Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis. *JAMA*, 325(6), 568–578. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.22171>
- Khuja, I., Yekhtin, Z., Or, R., & Almogi-Hazan, O. (2019). Cannabinoids Reduce Inflammation but Inhibit Lymphocyte Recovery in Murine Models of Bone Marrow Transplantation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), E668. <https://doi.org/10.3390/ijms20030668>
- Kim, J.-H., Hong, M., Han, J.-H., Ryu, B. R., Lim, Y. S., Lim, J. D., Kim, C. H., Lee, S.-U., & Kwon, T.-H. (2023). In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Effects of Cannabidiol Isolated from Novel Hemp (*Cannabis sativa L.*) Cultivar Pink Pepper. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(18), 6439. <https://doi.org/10.3390/molecules28186439>
- Kongkadee, K., Wisuitiprot, W., Ingkaninan, K., & Waranuch, N. (2022). Anti-inflammation and gingival wound healing activities of *Cannabis sativa L.* subsp. *sativa* (hemp) extract and cannabidiol: An in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 140, 105464. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2022.105464>

- Kováčik, A., Kopečná, M., & Vávrová, K. (2020). Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 17(2), 145–155. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1713087>
- Lodzki, M., Godin, B., Rakou, L., Mechoulam, R., Gallily, R., & Touitou, E. (2003). Cannabidiol—transdermal delivery and anti-inflammatory effect in a murine model. *Journal of Controlled Release*, 93(3), 377–387. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2003.09.001>
- Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>
- Lunn, C. A., Fine, J. S., Rojas-Triana, A., Jackson, J. V., Fan, X., Kung, T. T., Gonsiorek, W., Schwarz, M. A., Lavey, B., Kozlowski, J. A., Narula, S. K., Lundell, D. J., Hipkin, R. W., & Bober, L. A. (2006). A Novel Cannabinoid Peripheral Cannabinoid Receptor-Selective Inverse Agonist Blocks Leukocyte Recruitment in Vivo. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2), 780–788. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.093500>
- Mahmoudinoodezh, H., Telukutla, S. R., Bhangu, S. K., Bachari, A., Cavalieri, F., & Mantri, N. (2022). The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids. *Pharmaceutics*, 14(2), 438. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020438>
- Maqbool, M., Fekadu, G., Jiang, X., Bekele, F., Tolossa, T., Turi, E., Fetensa, G., & Fanta, K. (2021). An up to date on clinical prospects and management of osteoarthritis. *Annals of Medicine and Surgery*, 72, 103077. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2021.103077>
- Mattek Corporation. (2015, November 20). *EpiDermFT in vitro 3D Tissue*. MatTek Life Sciences. <https://www.mattek.com/mattekproduct/epidermft/>
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435. <https://doi.org/10.1038/nature07201>
- Miller, H., De Leo, N., Badach, J., Lin, A., Williamson, J., Bonawitz, S., & Ostrovsky, O. (2020). Role of marijuana components on the regenerative ability of stem cells. *Cell Biochemistry and Function*, 39(3), 432–441. <https://doi.org/10.1002/cbf.3609>
- Mlost, J., Bryk, M., & Starowicz, K. (2020). Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8870. <https://doi.org/10.3390/ijms21228870>

- Moltox. (2021). *Salmonella Mutagenicity Test Kit Instruction Manual 31-100.2*. 2. <https://moltox.com/docs/manuals/Ames%20Instruction%20Manual%2031-100.pdf>
- Mora, J. C., Przkora, R., & Cruz-Almeida, Y. (2018). Knee osteoarthritis: pathophysiology and current treatment modalities. *Journal of Pain Research, Volume 11*(11), 2189–2196. <https://doi.org/10.2147/jpr.s154002>
- Mortelmans, K., & Zeiger, E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455*(1-2), 29–60. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(00\)00064-6](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(00)00064-6)
- Mrid, R. B., Bouchmaa, N., Ainani, H., El Fatimy, R., Malka, G., & Mazini, L. (2022). Anti-rheumatoid drugs advancements: New insights into the molecular treatment of rheumatoid arthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 151*, 113126. <https://doi.org/10.1016/j.bioph.2022.113126>
- Muller, C., Morales, P., & Reggio, P. H. (2019). Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Frontiers in Molecular Neuroscience, 11*(487). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00487>
- Muthumalage, T., & Rahman, I. (2019). Cannabidiol differentially regulates basal and LPS-induced inflammatory responses in macrophages, lung epithelial cells, and fibroblasts. *Toxicology and Applied Pharmacology, 382*, 114713. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.114713>
- O'Donnell, B., Meissner, H., & Gupta, V. (2021). *Dronabinol*. PubMed; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557531/>
- OECD. (2020). Test Guideline No. 471 Bacterial Reverse Mutation Test Section 4 Health effects. In *OECD iLibrary*. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071247-en.pdf?expires=1717515312&id=id&accname=guest&checksum=4C67EF4B4EA13393F670593B1477A90A>
- Office of the Commissioner. (2018, June 25). *FDA approves first drug comprised of an active ingredient derived from marijuana to treat rare, severe forms of epilepsy*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms>

- Office of the Commissioner. (2019). *FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products: Q&A*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd>
- Owen, J., Punt, J., & Stranford, S. (2013). L'immunité Innée . In C. Fridman (Trans.), *Immunologie: Le cours de Janis Kuby*(7th ed., pp. 141–177). W.H. Freeman and Company.
- Pagano, C., Navarra, G., Coppola, L., Avilia, G., Bifulco, M., & Laezza, C. (2022). Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3344. <https://doi.org/10.3390/ijms23063344>
- Pahwa, R., Jialal, I., & Goyal, A. (2019, June 4). *Chronic Inflammation*. NIH.gov; StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>
- Palsson-McDermott, E. M., & O'Neill, L. A. J. (2004). Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113(2), 153–162. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x>
- Parepally, J. M. R., Men, Y., Bwewrnitz, M. A., Krudys, K. M., Grimstein, M., Zhang, X., & Mehta, M. U. (2017). CENTER FOR DRUG EVALUATION AND RESEARCH APPLICATION NUMBER: 210365Orig1s000 CLINICAL PHARMACOLOGY AND BIOPHARMACEUTICS REVIEW(S). In *U.S Food & Drug Administration*. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210365Orig1s000ClinPharmR.pdf
- Parikh, A. C., Jeffery, C. S., Sandhu, Z., Brownlee, B. P., Queimado, L., & Mims, M. M. (2024). The effect of cannabinoids on wound healing: A review. *Health Science Reports*, 7(2). <https://doi.org/10.1002/hsr2.1908>
- Penk, D. (2020). *Neutrophil Recruitment Pathway*. [Biorender]. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-5fb3e76d0b3b2e00a6438801-neutrophil-recruitment-pathway>
- Pertwee, R. G. (2008). The diverse CB₁and CB₂receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ9-tetrahydrocannabivarin. *British Journal of Pharmacology*, 153(2), 199–215. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442>

- Pons, A. (2022). *Role of 14-3-3ε in the Pathology of Osteoarthritis*. [Biorender]. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-620bedfba41471009e499876-role-of-14-3-3e-in-the-pathology-of-osteoarthritis>
- Popkin, D. J., Davis, V. M., & Prival, M. J. (1989). Isolation and characterization of an isogenic set of *Salmonella typhimurium* strains analogous to the “Ames” tester strains. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 224(4), 453–464. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(89\)90070-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(89)90070-0)
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2013, May 1). *Cell Viability Assays*. Nih.gov; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Robinson, W. H., Lepus, C. M., Wang, Q., Raghu, H., Mao, R., Lindstrom, T. M., & Sokolove, J. (2016). Low-grade inflammation as a key mediator of the pathogenesis of osteoarthritis. *Nature Reviews Rheumatology*, 12(10), 580–592. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.136>
- Roy, S., & Loh, H. H. (1996). Effects of opioids on the immune system. *Neurochemical Research*, 21(11), 1375–1386. <https://doi.org/10.1007/bf02532379>
- Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2017). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 32–42.
- Smith, R. T., & Gruber, S. A. (2023). Contemplating cannabis? The complex relationship between cannabinoids and hepatic metabolism resulting in the potential for drug-drug interactions. *Frontiers in Psychiatry*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.1055481>
- Staton, P. C., Hatcher, J. P., Walker, D. J., Morrison, A. D., Shapland, E. M., Hughes, J. P., Chong, E., Mander, P. K., Green, P. J., Billinton, A., Fulleylove, M., Lancaster, H. C., Smith, J. C., Bailey, L. T., Wise, A., Brown, A. J., Richardson, J. C., & Chessell, I. P. (2008). The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain. *Pain*, 139(1), 225–236. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.006>

- Tamez-Pérez, H. E. (2015). Steroid hyperglycemia: Prevalence, early detection and therapeutic recommendations: A narrative review. *World Journal of Diabetes*, 6(8), 1073. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i8.1073>
- Tassaneesuwan, N., Thammarat, C., & Khongkow, P. (2023). Safety and Potential Effects of Cannabidiol on Skin Cells. *Journal of Health Science and Medical Research*, 41(3), 2023919. <https://doi.org/10.31584/jhsmr.2023919>
- Tawil, N., Arnold, E. C. R., Katsarava, R., & Tugushi, D. (2020). *Microencapsulation of Bacteriophages and Related Products*(United States Patent Patent). <https://patentimages.storage.googleapis.com/73/d0/71/9b189ca6542a83/US10849944.pdf>
- Team, B. (2023). *Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis II (with Callout)*. [Biorender]. <https://app.biorender.com/biorender-templates/figures/all/t-6422fba5ae0e65c4d8014adf-pathogenesis-of-rheumatoid-arthritis-ii-with-callout>
- ThermoFischer Scientific. (2021, September 2). *CyQUANTM MTT Cell Proliferation Assay Kit*. [Www.thermofisher.com. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0019028_CyQUANT_MTT_CellProliferationAssayKit_PI.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0019028_CyQUANT_MTT_CellProliferationAssayKit_PI.pdf)
- ThermoFisher Scientific. (2018, May 15). *Mouse TNF alpha ELISA*. [Www.thermofisher.com. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017837_BMS607-3_Ms_TNF_alpha_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017837_BMS607-3_Ms_TNF_alpha_UG.pdf)
- ThermoFisher Scientific. (2023, December 12). *Document Connect*. [Www.thermofisher.com. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FBID%2Fmanuals%2FMAN0030021-MouseIL1betaELISAKit-UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FBID%2Fmanuals%2FMAN0030021-MouseIL1betaELISAKit-UG.pdf)
- Throckmorton, D. (2021). *FDA Role in Regulation of Cannabis Products*. <https://www.fda.gov/media/152407/download>
- Tijani, A. O., Thakur, D., Mishra, D., Frempong, D., Chukwunyere, U. I., & Puri, A. (2021). Delivering therapeutic cannabinoids via skin: Current state and future perspectives. *Journal of Controlled Release*, 334, 427–451. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.005>

- Turcotte, C., Blanchet, M.-R., Laviolette, M., & Flamand, N. (2016). The CB2 receptor and its role as a regulator of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(23), 4449–4470. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2300-4>
- Turcotte, C., Chouinard, F., Lefebvre, J. S., & Flamand, N. (2015). Regulation of inflammation by cannabinoids, the endocannabinoids 2-arachidonoyl-glycerol and arachidonoyl-ethanolamide, and their metabolites. *Journal of Leukocyte Biology*, 97(6), 1049–1070. <https://doi.org/10.1189/jlb.3ru0115-021r>
- Van der Goes, M. C., Strehl, C., Buttgereit, F., Bijlsma, J. W., & Jacobs, J. W. (2016). Can adverse effects of glucocorticoid therapy be prevented and treated? *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 17(16), 2129–2133. <https://doi.org/10.1080/14656566.2016.1232390>
- Verrico, C. D., Wesson, S., Konduri, V., Hofferek, C. J., Vazquez-Perez, J., Blair, E., Dunner, K., Salimpour, P., Decker, W. K., & Halpert, M. M. (2020). A randomized, double-blind, placebo-controlled study of daily cannabidiol for the treatment of canine osteoarthritis pain. *Pain*, 161(9), 2191–2202. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001896>
- Vijay, U., Gupta, S., Mathur, P., Suravajhala, P., & Bhatnagar, P. (2018). Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test. *BIO-PROTOCOL*, 8(6). <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2763>
- World Health Organization. (2023, July 14). *Osteoarthritis*. [Www.who.int](http://www.who.int); World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis>
- Xu, H., You, M., Shi, H., & Hou, Y. (2014). Ubiquitin-mediated NF κ B degradation pathway. *Cellular & Molecular Immunology/Cellular & Molecular Immunology*, 12(6), 653–655. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.99>
- Xu, J., Xu, G., Chen G., Zheng, Y., He, B., Gu, Z. (2020). Progress in transdermal drug delivery systems for cancer therapy. *NanoResearch*, 13, 1810-1824. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12274-020-2664-5>
- Zaiachuk, M., Suryavanshi, S. V., Pryimak, N., Kovalchuk, I., & Kovalchuk, O. (2023). The Anti-Inflammatory Effects of Cannabis sativa Extracts on LPS-Induced Cytokines Release in Human Macrophages. *Molecules*, 28(13), 4991. <https://doi.org/10.3390/molecules28134991>
- Zheng, Z., Qi, J., Hu, L., Ouyang, D., Wang, H., Sun, Q., Lin, L., You, L., & Tang, B. (2021). A cannabidiol-containing alginate based hydrogel as novel multifunctional wound dressing

for promoting wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 112560.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112560>

Zou, S., & Kumar, U. (2018). Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833. <https://doi.org/10.3390/ijms19030833>

**ANNEXE A ARTICLE 1 : TRANSDERMAL DELIVERY OF
CANNABIDIOL FOR THE MANAGEMENT OF ACUTE
INFLAMMATORY PAIN: A COMPREHENSIVE REVIEW OF
THE LITERATURE**

En parallèle avec ce projet, une revue de littérature intitulée « Transdermal Delivery of Cannabidiol for the Management of Acute Inflammatory Pain: A Comprehensive Review of the Literature » ayant été publiée dans la revue *International Journal of Molecular Sciences* de MDPI en date du 28 mai 2024 a également été rédigée portant sur les véhicules de livraison présentement utilisés pour l'administration transdermique de CBD. La revue s'attarde également sur le rôle que joue le CBD sur ce type de pathologie. Ainsi, cette section est dédiée à la présentation de celle-ci. La rédaction et la recherche bibliographique de l'article publié ont été intégralement fait par moi. Cependant, de précieux conseils au niveau de la révision de l'article ont été apportés grâce à l'aide de mon directeur de recherche L'Hocine Yahia, professeur titulaire du département de génie mécanique de l'école Polytechnique Montréal, et ma co-directrice de recherche Nancy Tawil, responsable scientifique en chef chez Precisio Biotix Therapeutics, présidente à Qeen-Bio Technologies et professeure adjointe à l'école Polytechnique Montréal.

Transdermal Delivery of Cannabidiol for the Management of Acute Inflammatory Pain: A Comprehensive Review of the Literature

Ève Lefebvre 1,*, Nancy Tawil 2 and L'Hocine Yahia 1

1 Department of Mechanical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada; lhocine.yahia@polymtl.ca

2 Qeen BioTechnologies, Gatineau, QC J9J 3K3, Canada; tawil@qeen-bio.com

* Correspondence: eve.lefebvre@polymtl.ca

Abstract: The emerging field of nanotechnology has paved the way for revolutionary advancements in drug delivery systems, with nanosystems emerging as a promising avenue for enhancing the therapeutic potential and the stability of various bioactive compounds. Among these, cannabidiol (CBD), the non-psychotropic compound of the *Cannabis sativa* plant, has gained attention for its therapeutic properties. Consequently, researchers have devoted significant efforts to unlock the full potential of CBD's clinical benefits, where various nanosystems and excipients have emerged to overcome challenges associated with its bioavailability, stability, and controlled release for its transdermal application. Therefore, this comprehensive review aims to explain CBD's role in managing acute inflammatory pain and offers an overview of the state of the art of existing delivery systems and excipients for CBD. To summarize this review, a summary of the cannabinoids and therapeutical targets of CBD will be discussed, followed by its conventional modes of administration. The transdermal route of administration and the current topical and transdermal delivery systems will also be reviewed. This review will conclude with an overview of in vivo techniques that allow the evaluation of the anti-inflammatory and analgesic potentials of these systems.

Keywords: cannabidiol; transdermal; delivery; polymeric; inflammation; arthritis; cannabis

1. Introduction

Chronic inflammatory diseases, such as arthritis, lack a cure and represent not only an economic burden but also pose personal and social consequences for individuals living with them [1].

Moreover, people with arthritis face increased risks of experiencing mobility issues, workplace challenges, mental health issues, and overall health concerns compared to others. Despite being a persuasive health condition, arthritis remains one of the most common, affecting about 528 million people worldwide, with projections indicating an increasing rate induced by a rise in obesity and injury [2]. In addition to non-pharmacological management methods, such as physical therapy, electrical nerve stimulation, and acupuncture, arthritis pain management typically involves medications that can relieve pain and slow joint damage by limiting inflammation [2,3]. However, conventional treatments such as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), opioids, disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), and corticosteroids come with a lot of side effects, including gastrointestinal complications, cardiovascular diseases, hepato-toxicity, physical dependence, and immunosuppression, to only name a few [4–10]. The disadvantages associated with these traditional methods for pain management and the treatment of joint diseases highlight a lack at this level. The design of innovative treatments to overcome this lack is therefore required.

Phytocannabinoids originate from cannabis plants and have a historical use of over 5000 years in traditional Chinese medicine and about 3000 years in Egypt and India. In the 1970s, certain countries, including Canada and the United States, criminalized and classified this substance as illicit due to the psychotropic effects associated with tetrahydrocannabinol (THC). However, recent legalization and decriminalization of cannabis have reignited interest in it as a therapeutic agent [11]. The most abundant and pharmacologically relevant phytocannabinoids in Western countries are $\Delta 9$ -THC and cannabidiol (CBD), mainly derived from the *Cannabis sativa* plant [12]. However, the psychotropic effects associated with THC limit its usage. Consequently, researchers primarily focus on CBD for developing new treatments as it avoids psychotropic and euphoric effects, maintains a safe profile, exhibits low potential for abuse, and offers a wide range of benefits, including antioxidative, anticonvulsive, analgesic, antitumorigenic, anxiolytic, and anti-inflammatory effects [13,14]. Therefore, CBD is a compelling candidate for treating conditions such as cancer, diabetes, neurodegenerative disorders, and inflammatory pathologies [13].

Despite CBD's therapeutic effects, one of the main challenges regarding the use of this compound in pharmaceuticals remains its mode of administration. CBD has a low bioavailability due to its degradation by the first hepatic pass, instability in gastric conditions, high hydrophobicity, and a risk of undesirable side effects due to high concentrations in plasma [15]. Therefore, new strategies need to be developed to compensate for those characteristics. As different CBD receptors are

localized in the skin, the topical and transdermal application of this drug is an interesting option, as it avoids the problems associated with conventional modes of administration and can procure high bioavailability with a steady plasma level and a good safety profile. In addition, CBD's effects are mainly local, which contributes to decreased side effects, and the total dosage required to reach the target site is much lower [16]. Hence, this review of the literature will focus on the transdermal delivery systems and excipients of CBD for the management of acute inflammatory pain. The main endocannabinoids, phytocannabinoids, and CBD's targets for its therapeutical effects in inflammatory diseases will be discussed. The routes with which CBD can be administered will also be addressed, as well as the existing CBD delivery systems and excipients. This review will end with some of the more commonly used *in vivo* models to evaluate their anti-inflammatory and analgesic properties.

2. The Cannabinoids

Cannabinoids constitute a substantial structural class of biological compounds capable of binding to the cannabinoid receptors (CBs). They are categorized into three groups: endocannabinoids, phytocannabinoids, and synthetic cannabinoids. This section will discuss the first two classes of cannabinoids, while synthetic cannabinoids will not be discussed further as they are irrelevant to this review. Additionally, CBD's anti-inflammatory and analgesic effects will be addressed, as they are the most relevant for chronic pain diseases.

2.1. *The Endocannabinoid System*

The endocannabinoid system (ECS) is a crucial neuromodulatory system that plays a role in the development of the central nervous system (CNS), synaptic plasticity, and responses to both endogenous and exogenous noxious stimuli. It can also regulate bodily functions such as metabolism, food behavior, mood, anxiety, pain perception, and modulation [14]. Components of this system include at least two cannabinoid receptors (CBs), the endogenous agonists at those receptors known as endocannabinoids, and the enzymes responsible for the synthesis, transport, and degradation of those endocannabinoids [17].

CBs comprise two G protein-coupled receptors (GPCR) that mediate the effects of endogenous cannabinoid signaling: CB1 and CB2. CB1 is mainly located in the CNS, and its distribution suggests an essential role in controlling motor functions, cognition, and memory. On the other hand, CB2 is primarily located in the peripheral nerve terminals and immune cells. Its upregulation

correlates with immune cell activation, suggesting a vital role in their activation and the inflammation response [18,19]. Both CBs recognize multiple agonistic and antagonistic ligands, inducing different downstream outcomes [19]. Therefore, their effects on cells mainly depend on the type of subunit α coupled to the GPCR [20]. As they typically bind to the Gai/0 subunit, their activation usually inhibits adenylyl cyclase, reducing intracellular cAMP concentrations. It also inhibits voltage-dependent Ca^{2+} channels, lowering Ca^{2+} intracellular concentrations while activating mitogen-activated protein kinase (MAPK) and rectifying K^+ channels. Therefore, their activation leads to physiological changes in the cells [17].

Endocannabinoids are endogenous lipidic neurotransmitters that interact, among other things, with the CBs. They are synthesized in the post-synaptic terminals on demand in response to neuronal activation in a Ca^{2+} -dependent manner and can subsequently bind to presynaptic CBs [18]. The two variants of arachidonic acid (AA), the 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) and the arachidonoyl ethanolamide (AEA), also known as anandamide, are the most known and studied. However, even if their chemical structures are very similar, as shown in Figure 1, different enzymatic pathways carry out their synthesis and degradation to ensure a different physiological and pathophysiological role for these two molecules [17]. For instance, AEA has a high agonist affinity for CB1 and is almost inactive for CB2; meanwhile, 2-AG is a full agonist with moderate to low affinity for both CBs. However, both compounds interact with a large variety of receptors besides CBs, which will be further discussed in Section 2.3 [21].

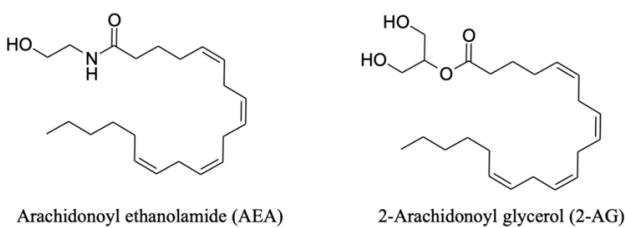


Figure 1. Chemical structures of the two main endocannabinoids.

2.2 The phytocannabinoids

Botanical taxonomists agree that cannabis belongs to the Cannabaceae family. While more than one species exists, there appear to be three main species: *Cannabis sativa*, *Cannabis indica*, and *Cannabis ruderalis*. The first isolated and most popular in Western countries is *C. sativa L.*, which

contains more than 150 phytocannabinoid compounds classified into specific groups: cannabigerols (CBGs), cannabichromenes (CBCs), cannabidiols (CBDs), ($-$)- Δ^9 -*trans*-tetrahydrocannabinols (Δ^9 -THCs), ($-$)- Δ^8 -*trans*-tetrahydrocannabinols (Δ^8 -THCs), cannabicyclols (CBLs), cannabielsoins (CBEs), cannabinols (CBNs), Δ^9 -tetrahydrocannabivarin (THCVs), and cannabitriols (CBTs) [12, 22, 23]. Among these, the most abundant phytocannabinoids are Δ^9 -THC and CBD, sharing a similar chemical structure, as shown in Figure 2 [13,24]. The biosynthesis of these compounds begins with their acidic forms, tetrahydrocannabinolic acid (Δ^9 -THCA) and cannabidiolic acid (CBDA), which spontaneously convert into their final form due to their poor oxidative stability [12].

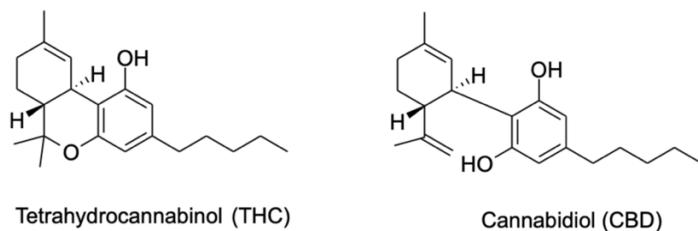


Figure 2. Chemical structures of the two main phytocannabinoids.

2.3 The anti-inflammatory and analgesic effects of CBD

Although the discovery of CBD predates that of THC, this compound has been less extensively studied due to its lack of psychotropic effects. However, the recent regain of interest in CBD as a pharmacological compound has prompted professionals and researchers to look deeper into the molecular pathways underlying its various therapeutic effects. Consequently, the data regarding its mechanisms of action as a therapeutic agent are now overflowing and sometimes incongruous [20]. Therefore, this section provides a comprehensive review of the main pathways underlying the therapeutical potential of CBD as an anti-inflammatory and analgesic agent. Additionally, a schematic representation (Figure 3) summarizing CBD's targets is included at the end of this section to enhance comprehension.

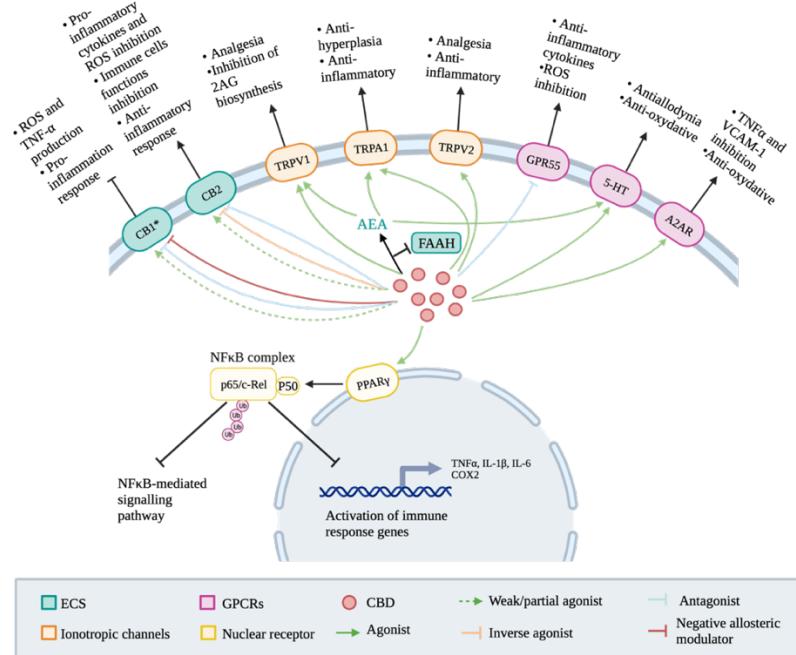


Figure 3. Simplify overview of the main anti-inflammatory and analgesic effects of CBD.

2.3.1 The Endocannabinoid System

Initial reports demonstrated that CBD is a poor competitive of endogenous ligands at the orthosteric site of CBs, suggesting that CBD mainly acts in a CBs-independent manner. Further studies suggest that CBD can act directly and indirectly on the ECS [20].

The activation of CB1 predominantly induces ROS production and downstream synthesis of TNF- α , which contribute to a pro-inflammatory response [25]. Therefore, CBD exhibits a very low agonistic affinity for this receptor, which could also explain the lack of psychotropic activity associated with this compound [20]. Hence, the antagonistic activity and negative allosteric modulation of CB1 by CBD might be partially responsible for inhibiting the inflammatory response. However, this effect is weak and is criticized by research groups. Some groups support that CBD does not bind to CB1 and that the anti-inflammatory response CBs-dependant is most likely associated with CB2 activation [20,25], even if the signalling pathways associated with this receptor activation are far less characterized than those of CB1 [26].

Mouses lacking the CB2 receptor have an amplified inflammatory phenotype, indicating this receptor's importance in anti-inflammatory mechanisms. The stimulation of CB2 inhibits the release of pro-inflammatory cytokines, ROS, and the proliferation, migration, and differentiation of various immune cells [25, 27]. However, the pharmacokinetic studies suggested that CBD may

be a very low agonist of CB2 because it seems to have a detectable effect only in the micromolar range. However, despite its low agonistic affinity for CB2, CBD appears to have a biological effect at reasonable concentrations in the nanomolar range [28]. This was later proven due to its inverse agonist and antagonist activities [25, 28]. Evidence shows that the inverse agonistic mechanism could inhibit immune cell migration and decrease inflammation symptoms [28, 29]. Lunn's team has assessed that the binding of a selective inverse agonist to CB2 could inhibit the migration of leukocytes associated with the binding of 2AG, a very good agonist of this receptor and that the injection of this inverse agonist, could reduce leukocyte trafficking in rodents [29]. CBD's indirect modulation of CB2 could also explain its anti-inflammatory effect (Atalay et al., 2020). CBD has been shown to inhibit the cellular uptake of AEA and the activity of FAAH, which is responsible for the hydrolysis of AEA. Therefore, an increase in the concentrations of this anti-inflammatory effector can be seen in cells in the presence of CBD [18].

Endocannabinoids can promote both pro-inflammatory and anti-inflammatory responses. On the one hand, AEA was found to downregulate ROS production, the release of pro-inflammatory mediators and immune cell functions, such as leucocyte migration, and increase the release of anti-inflammatory cytokine Il-10. Conversely, 2-AG seems to enhance B and T cells, dendritic cells, eosinophils, monocytes and natural killer cells recruitment and functions, production of ROS, pro-inflammatory cytokines, and autacoids [26, 30]. Even though 2-AG could be accountable for the pro-inflammatory effects, the endocannabinoids' metabolites could also play a significant role in immune cells' positive modulation [30]. The metabolism of endocannabinoids by eicosanoid biosynthetic enzymes increases AA levels, promoting the biosynthesis of eicosanoids, such as PGH2-EA, PGE2-GE, and leukotriene. Hence, those bioactive lipids play a significant role in the development of the inflammatory response [30], and inhibition of their biosynthesis could help improve inflammation.

2.3.2 GPCRs

CBD can also exert its anti-inflammatory and analgesic properties independently of the ECS by modulating various GPCRs and signalling pathways. Potential targets for CBD include the serotonin 1a receptor (5HT1a), the adenosine A2A receptor (A2AR) and the G protein-coupled receptor 55 (GPR55). In the serotonergic system, CBD has demonstrated the ability to attenuate mechanical allodynia by regulating neurotransmitter release and neuronal excitability [18].

Additionally, when activated by CBD or AEA, 5HT1a can have antioxidant effects by capturing ROS, potentially contributing to the indirect improvement of inflammation [25].

In counterpart, the activated A2AR exhibits anti-inflammatory properties, reducing levels of TNF α and vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1), which are implicated in immune cell migration [25]. CBD can also inhibit the cellular uptake of adenosine, increasing its endogenous content for A2AR activation [18]. A2AR may also possess antioxidative properties, helping to reduce oxidative stress [25].

The GPR55 receptor, predominantly found in nervous and immune cells, may also play a role in immune functions. CBD has been shown to exert an antagonistic activity on GPR55, but the exact mechanism underlying this pathway remained unclear. CBD may modulate this receptor's activity via the modulation of endocannabinoid levels [25]. However, observations from Staton's team suggest that GPR55 knockout mice exhibit high levels of anti-inflammatory cytokines and reduce hyperalgesia, while high receptor expression inhibits ROS production [31]. Therefore, the final effect of this receptor's activation may depend on the dominating effect of CBD's direct or indirect activation [25].

2.3.3 Ion Channels

TRP channels, such as TRP vanilloid 1/2 (TRPV1/2) and TRP ankyrin 1 (TRPA1), are members of a large family of ionotropic channels involved in transduction in response to diverse physical and chemical stimuli by modulating calcium levels [32]. CBD can activate them directly or indirectly, considering that one of the endogenous ligands of TRPV1 is AEA. CBD's action in reducing oxidative stress can also ensure the presence of the active form of this receptor [25]. However, activating these receptors is generally associated with inflammation and pain, but some agonists, like CBD and AEA, can induce paradoxical analgesia by desensitizing these receptors [32]. Their activation may also inhibit the biosynthesis of 2AG, reducing the levels of pro-inflammatory endocannabinoids [25]. Therefore, CBD's sustained activation of TRPV1/2 and TRPA1, along with increased AEA, contributes to analgesic, anti-inflammatory, and anti-hyperalgesic effects, aiding in managing inflammatory pain [25, 32, 33].

2.3.4 Nuclear Receptor

The PPAR γ receptor is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-inducible transcription factors and plays a vital role in the negative regulation of inflammation. Upon

activation by agonists such as CBD and endocannabinoids, it can modulate the ubiquitination of cytoplasmic and nuclear NF κ B p65 subunit by interacting with a ubiquitin-conjugating enzyme, UbcH3 [25, 34]. The addition of polyubiquitin to this subunit induces subsequent proteasomal degradation, inhibiting the NF κ B-mediated inflammatory signalling pathway, downstream gene expression of COX2, and the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 (25).

As seen in this last section, CBD has the potential to regulate a wide variety of receptors, ionotropic channels, and enzymes, as well as the levels of endocannabinoids. The main direct and indirect targets and CBD's mechanisms of action are summarized in Figure 3.

3. Administration of CBD

While CBD offers therapeutic benefits, its effective use in pharmaceuticals faces significant hurdles, primarily concerning its administration. CBD's low bioavailability stems from its degradation during the initial hepatic pass, instability in gastric environments, high hydrophobicity, and the potential for undesirable side effects due to elevated plasma concentrations [15]. Hence, novel approaches must be developed to address these inherent traits. This section will discuss a review of the products containing cannabinoids authorized by the regulation agencies of Western countries, the modes of administration with which CBD can be consumed in a user-friendly setting and will conclude with transdermal CBD systems in the development phase.

3.1. Cannabinoids-Based Products Approved in Western World

3.1.1. Health Canada in Canada

As of today, the regulatory agency of Canada, namely Health Canada, has approved three cannabinoids-based drugs, with only two still being on the market. Sativex® (GW Pharma Ltd., Cambridge, UK), also known as Nabiximols, comes as an oromucosal spray and contains a mix of THC (Tetranabinex®) and CBD (Nabidiolex®) in a 1:1 ratio. It has been used as a treatment for symptomatic relief of spasticity in adult patients with multiple sclerosis (MS) since 2005 in Canada [14,35,36]. Marinol® (Solvay Pharmaceuticals, Inc., Brussels, Belgium), in which the therapeutic agent is a synthetic THC (dronabinol), was used to treat loss of appetite in acquired immune deficiency syndrome patients (AIDS) and nausea from chemotherapy in the 1990s. However, the manufacturer voluntarily withdrew those oral capsules from the Canadian market in 2012 and they are no longer available in Canada. The last approved treatment is Nabilone (CesametTM; Bausch

Health Compagnies Inc., Laval, QC, Canada), which contains a synthetic analogue of THC. This treatment has been available as oral capsules since 1982 and is used to reduce nausea and vomiting associated with cancer chemotherapy in patients who have failed to respond adequately to conventional antiemetic treatment [35].

3.1.2. Food and Drugs Administration (FDA) in the United States

The development of therapeutic products containing cannabinoids is progressing rapidly, and currently, four are authorized by the FDA for use in the market. Epidiolex® (GW Pharma Ltd., Cambridge, UK), approved in 2018, is a CBD-based drug administrated as an oral solution for the treatment of two rare and severe forms of childhood epilepsy, namely Lennox-Gastaut syndrome and Dravet syndrome in patients one-year-old and older [13,37]. Meanwhile, two drugs containing dronabinol as their active ingredient, Marinol® and Syndros® (Benuvia Therapeutics, Round Rock, TX, USA), obtained approval in 1985 and 2016, respectively, for the same purpose as in Canada [13,38–40]. Nabilone (CesametTM; Bausch Health Compagnies Inc., Laval, QC, Canada) also gained approval in 1985 in the US for chemotherapy patients [13,40].

3.1.3. European Medicines Agency (EMA) in European Countries

There are currently two products containing cannabinoids that are approved by the EMA. Epidyolex® (Jazz Pharmaceuticals Ireland Ltd., Dublin, Ireland) has been used as intended by the US since 2014 for the Davet syndrome and since 2019 for the Lennox–Gastaut syndrome. It is also used for treating tuberculosis complex as an adjunct therapy to other treatments in patients two years old and above [41]. Other authorized products include Sativex®, which holds marketing authorization in more than 18 EU member states for the treatment of MS [42].

Despite these great products, work remains to be done to fully exploit the potential of CBD while minimizing the side effects associated with higher doses. To achieve this objective, it is essential to understand the different administration routes and their advantages and limitations.

3.2. *Delivery Routes and Bioavailability of CBD*

The bioavailability of CBD, which impacts the efficacy of the treatment, varies significantly based on the delivery route. The parameters influencing a drug's capacity to bind to its receptors are its physiology, dissolution, stability, permeation, and metabolism. As mentioned, CBD is highly lipophilic, with a log *p*-value ranging from 6–7, and hydrophobic, exhibiting a miscibility

of 2–5 µg/mL in water. It is also light- and temperature-sensitive with poor oxidative stability [16]. Therefore, it is essential to consider those characteristics when engineering new delivery methods.

3.2.1. Oral Administration

The oral route is one of the most explored modes of administration for CBD but has encountered some drawbacks due to its low bioavailability. The issue is partly attributed to the highly acidic stomach environment and the hepatic first-pass metabolism, which inactivates about 95% of CBD. Other factors include slow and erratic absorption, weak therapeutic efficacy, and challenges associated with administrative dosage. Consequently, only 6–20% of the dose has been reported in blood plasma after oral administration and was only detectable for a short period with a peak at 1–4 h post-administration and a significant decrease after 6 h [16]. Therefore, patients need to take repeated doses quickly, which could limit its acceptance and patient compliance. Furthermore, the repeated dosage could also be problematic for chemotherapy patients due to nausea and vomiting [15].

3.2.2. Sublingual Administration

The sublingual placement could avoid degradation by hepatic enzymes and gut acidity. In addition, it procures fast absorption into the blood and is easy to use. However, this route is associated with a considerable increase in saliva production, prompting the swallowing of the product. Thus, the benefits associated with sublingual applications are lost [15].

3.2.3. Delivery by Inhalation

CBD inhalation, through smoking or vaporization, has a bioavailability of 2–56% and up to 50%, respectively. However, inhalation is associated with adverse pulmonary impacts and inconsistent effects depending on the length, volume, duration, and inhalation rate [16].

3.2.4. Alternatives Routes: Intranasal, Rectal, and Intravenous Routes

Alternative routes of CBD administration, such as intranasal, rectal, and intravenous, allow rapid absorption into the systemic circulation due to the presence of several vasculature structures and the nature of the tissues involved. This approach avoids hepatic metabolism and gastric instability, enhancing bioavailability [16]. However, significant challenges are associated with these routes. Delivering therapeutical doses of CBD via the nasal epithelium is difficult due to the compound's lipophilicity. It can also cause nasal mucosa irritation and mucociliary clearance. Therefore, potent drugs are more suitable for this method of administration in comparison to chronically administered

doses [15]. Despite the drug being directly injected into the bloodstream in the intravenous route, this method is however undesirable due to its invasive nature, the increased risk of infection, and the lack of compliance in patients [16].

3.2.5. Topical and Transdermal Administration

Different CBD receptors are localized in the skin, as represented in Figure 4, indicating that it could directly act in this tissue. Therefore, a topical and transdermal application could be a viable alternative for CBD delivery. These application methods are of high interest because they avoid the problems associated with conventional modes of administration and can procure high bioavailability with a steady plasma level and a good safety profile. In addition, CBD's effects are mainly local, which contributes to decreased side effects, and the total dosage required to reach the target site is much lower [16]. However, transdermal drug delivery still encounters challenges, such as skin permeation. Therefore, to develop effective cutaneous drug delivery technologies for CBD, it is essential first to understand the skin's structure.

The skin is the barrier between the body and its environment. It comprises three layers: the hypodermis, the dermis, and the epidermis. The stratum corneum (SC) is the outer layer of the epidermis. It comprises keratin-filled corneocytes enclosed in a lipidic matrix mostly composed of ceramides, free fatty acids, and cholesterol [15,43]. It essentially protects the other skin layers and contributes highly to skin permeability. Therefore, only a few components can pass through this layer, such as heat, a few fluids, and low-weight molecules, by paracellular (intercellular), transcellular (intracellular), or trans-appendageal pathways (e.g., hair follicles and sweat glands). Therefore, the penetration of therapeutical agents through this layer is one of the limiting steps for topical and transdermal applications. Another challenge associated with this route is the hydrophilic layers of skin situated below the SC. Hence, drugs must be lipophilic enough to pass through the SC and hydrophilic enough to penetrate the other skin layers [15].

Drugs must respect specific characteristics to ensure adequate permeation and diffusion into the skin. Ideally, it must be moderately lipophilic, have a molecular weight lower than 500 g/mol, a melting point lower than 250 °C, a high potency, and a p-log value between 1–3 [15,43]. Therefore, CBD's high lipophilicity makes it an inadequate candidate for this application because it tends to accumulate in the SC instead of diffusing through other skin layers. Consequently, strategies are being developed to enhance the transdermal delivery of such compounds to overcome these unfavorable characteristics. Among them are the addition of chemical penetration enhancers, ions

pairing, eutectic systems, physical permeation enhancers, and the encapsulation in lipidic or polymeric delivery systems (nanoparticles (NPs) and nano gels, for instance), to name a few [15].

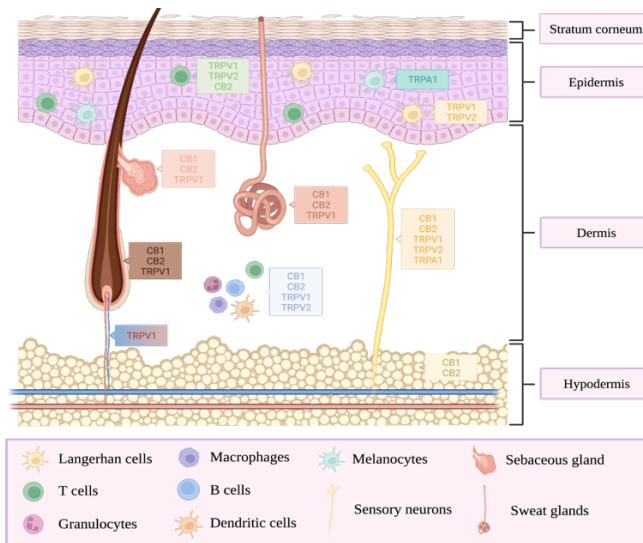


Figure 4. Cannabidiol receptors in the skin. CB1/2 : Cannabinoid Receptor 1/2, TRPV1/2 : Transient receptor potential vanilloid 1/2, TRPA1 : Transient Receptor Potential Ankyrin 1.

Drugs must respect specific characteristics to ensure adequate permeation and diffusion into the skin. Ideally, it must be moderately lipophilic, have a molecular weight lower than 500g/mol, a melting point lower than 250°C, a high potency, and a p-log value between 1-3 [15, 43]. Therefore, CBD's high lipophilicity makes it an inadequate candidate for this application because it tends to accumulate in the SC instead of diffusing through other skin layers. Consequently, strategies are being developed to enhance the transdermal delivery of such compounds to overcome these unfavourable characteristics. Among them are the addition of chemical penetration enhancers, ions pairing, eutectic systems, physical permeation enhancers, and the encapsulation in lipidic or polymeric delivery systems (nanoparticles (NPs) and nano gels, for instance), to name a few [15].

3.3 Techniques Used to Enhance Transdermal Delivery of CBD

As mentioned previously, only two cannabinoid-based drugs have gained Health Canada approval, four have FDA approval, and two have EMA approval, with just one being truly CBD-based. This drug is available as an oral solution, resulting in limited bioavailability. Therefore, various lipidic and polymeric delivery systems, as well as different excipients, have been developed for the transdermal delivery of CBD. These systems show great promise in enhancing the effective dose delivery of lipophilic drugs like CBD, providing protective effects for therapeutic agents exhibiting

poor stability, and offering targeted and controlled delivery [16]. Transdermal delivery also ensures stable blood levels over an extended period, providing prolonged pain relief for patients. Using creme, gel, ointment, or patch could also allow for easy self-administration without requiring medical assistance.

However, as research in this field advances, a comprehensive understanding of the effectiveness and benefits of transdermal CBD delivery systems is crucial. Table 1 summarizes various preclinical and clinical studies, offering valuable insights into the therapeutic properties and potential applications of transdermal CBD. As depicted in this table, CBD presents a broad spectrum of therapeutical benefits, including anti-inflammatory, analgesic, antiemetic, neuroprotection, and antioxidant properties, among others. Even if some of the conditions summarized in this table do not directly treat or manage chronic inflammation diseases, they bring valuable insight into the transdermal delivery of CBD. They could, therefore, be useful or applicable to the elaboration of CBD-based transdermal inflammatory pain disease treatments.

Table 1. Current studies on cutaneous application of CBD.

Delivery Systems and/or excipient	Forms	CBD Concentrations/Quantities	Applications	References
Ethosome in a carbomer gel		3% w/w	Chronic inflammatory disease treatment (rheumatoid arthritis)	[1]
Carbopol® 980		1 and 10%	Arthritis treatment	[44]
Transcutol		2.5g CBD/100g gel	Drug addiction treatment (anxiolytic and impulsivity management)	[45]
Ethanol, propylene glycol, Transcutol with a crosslinked polyacrylate polymer	Gel	1.0, 2.5, 5.0%	Alcohol-induced neurodegeneration treatment	[46]
Freeze-dried 2-hydroxyethyl cellulose/β-cyclodextrin cryogel		0.5mg/gel	Skin cancer treatment (primary skin tumours and cutaneous metastases)	[47]
Undisclosed commercial formulation		250mg/d, 500mg/d, 750mg/d, and 1000mg/d 2.6 mg/kg/d, 5.3 mg/kg/d	Fragile X syndrome and 22q11.2 deletion syndrome in children	[48-50]

(ZYN002, Zynerba Pharmaceuticals)		Focal epilepsy in adults	
Nanoemulsion (Labrasol, Tween 80, Maisine, Transcutol with isopropyl tetradecanoate and olive oil)-filled chitosan hydrogel	1 mg/g and 10mg/f of nanoemulsion	Epilepsy, psychiatric and skin conditions, pain, and inflammation treatment	[51]
Sodium alginate-Zn hydrogel Solutol HS 15, Transcutol P, isopropyl myristate, water, Sepigel 305 Propylene glycol, water hydrogel, and 3D printed Eudragit RL and tributyl citrate patch	0.5, 1.0, 2.0, 4.0% w/v	Wound healing	[52]
Mineral oil with propylene glycol: water or 4 propylene glycol: water: ethanol Chitosan functionalized with ZnO nanoparticles Organosilica nanoparticles with polyvinyl alcohol Capryol 90, surfactant	1% w/w	Skin diseases treatment	[53]
(Procetyl® AWS, Microemulsion ethanol, distilled water Cholesterol, paraffin, and white Vaseline	Hydrogel Patch	1% w/w	-
	Patch	Saturated solution	Chemotherapy side effects management (antiemetic, appetite stimulant, analgesic)
	Thin film	0.5mg/cm ³ of ethanol	Epilepsy management
	Ointment	7.11g of CBD-Silica	-
CBD seed oil		1% w/w CBDA + THCA	[58]
		2g of 20% CBD oil	Myofascial pain management
		-	[59]
			Skin chronic diseases (atopic dermatitis, psoriasis, infections...)
			[60]
			Scars healing

Ethosomes are lipid-based vesicular systems containing a high percentage of ethanol, demonstrating improvement in transdermal drug delivery with respect to other NPs types, such as liposomes. Their content in ethanol allows for improved flexibility and deformability, leading to less drug leakage during transport. It also contributes to lipid fluidization of the cells' membrane in dermal layers for in-depth penetration of the active compound, in our case, of the CBD [61]. The excipient of the NPs is also crucial in the efficacy of a system. Carbomers, such as Carbopol®, PemulenTM, Noveon®, and Polycarbophil, are the most frequently used class of gelling agent in approved topical pharmaceuticals. They stabilize suspensions and modify the rheological properties of topical formulations. Furthermore, the acrylic acid-based polymers crosslinked with polyalkenyl ethers or divinyl glycol render varying viscosity characteristics due to the resulting unique three-dimensional structure enabling hydrodynamic swelling of the gel [62]. In Lodzi's research, the ethosomal formulation contained 3% w/w CBD and 40% w/w EtOH in a carbomer gel. This system has resulted in a significant accumulation of the drug in the skin and the underlying muscle with a steady-state plasma level after 24 h, which lasts at least until the end of the experiment. They also assess the anti-inflammatory potential in a carrageenan-induced aseptic paw inflammation in male ICR mice, where inflammation was successfully prevented in the treated paws. Moreover, the paw thickness of CBD-pretreated mice was statistically different from non-pretreated mice's starting 1 h post-injection [1].

In Hammell's study, CBD at 1 and 10% was added to a Carbopol® 980 polymer (0.9% w/w) to evaluate inflammation and pain-related behaviors in a complete Freud's adjuvant (CFA)-induced arthritis model in male Sprague Dawley rats. The results indicated that the CBD gel is an effective treatment for reducing inflammation and hypersensitivity associated with the arthritic model. The 6.2 mg/day dose optimally reduced swelling in the knee joint, while the 62.3 mg/day did not yield additional improvement. Following the CFA injection, synovial membrane thickening was also observed, where the transdermal application of both doses significantly reduced this pathological change. They also observed an improvement in pain score as an indirect measure of joint inflammation. Both doses led to optimal paw withdrawn latency in response to noxious heat stimuli [44].

Transcutol, or diethylene glycol monoethyl ether, is an excipient and surfactant widely used in cosmetics and pharmaceutics to increase the drug penetration of formulations. Furthermore, this compound has gained a lot of attraction due to its optimal properties: nontoxicity, biocompatibility

with the skin, miscibility with polar and non-polar solvent, and optimal solubilizing properties for many drugs [63]. Transcutol has been investigated as an excipient for the transdermal delivery of CBD by Gonzalez-Cuevas's team for the prevention of relapse to drug use. Hence, CBD levels in the plasma and brain of male Winstar rats were evaluated. A significant dose-dependent CBD level was detectable in the plasma and brain on treatment day 7, as well as 3 days post-treatment, which could be explained by a skin reservoir effect of the formulation [45].

Liput et al. have investigated the role of transdermal CBD in binge alcohol-induced neurodegeneration in a model of male Sprague Dawley rats of alcohol use disorder. The 5% gel formulation has neuroprotective effects, while the 1.0% and 2.5% were ineffective. The mean CBD plasma concentration on day 3 for the 5% group was then evaluated at 100 ng/mL, which suggests that this delivery system could efficiently deliver therapeutical doses of CBD across the skin barrier [46].

Cellulose and cellulose derivates are biocompatible, non-toxic, and biodegradable polymers that can react with different molecules through esterification, etherification, and oxidation, affording derivates with excellent properties. Cyclodextrin (CD), a class of cyclic oligosaccharides, encompasses important features, including excellent biocompatibility and chemical stability, high hydrophilicity, and biodegradability with unique amphiphilic and transport properties [64]. Due to their structure, CDs can also form inclusion (host-guest) supramolecular complexes with a large variety of molecular guests. Furthermore, the spatial arrangement of CDs leads to a relatively hydrophobic cavity with a hydrophilic external surface, enabling the thread of a broad range of hydrophobic compounds such as CBD. The resulting complex is highly stable, which contributes to the improvement of the guest properties like solubility enhancement and antioxidant control. Therefore, excipients derived from cellulose and CDs have been extensively used in pharmaceuticals due to their specific binding properties suitable for controlled and sustained drug delivery [64]. Hence, a novel drug delivery platform for the topical delivery of CBD based on CBD/β-cyclodextrin complexes within biocompatible cryogel was documented by Momekova et al. for the treatment of primary skin tumors or cutaneous metastases. The team synthesized a cryogel through the photochemical crosslinking of 2-hydroxyethyl cellulose and β-cyclodextrin in a frozen aqueous system, which was subsequently loaded with CBD. In this study, the CBD spontaneously forms an inclusion complex with β-CD at a 1:1 ratio, where an increase in β-CD concentration leads to an increased fraction of tightly bound CBD. This could explain the observed

sustained CBD release from β -CD-containing cryogel matrices. Moreover, their team observed a bi-phasic release behavior with an initial burst in the first 3 h, which could be explained by the CBD absorbed in the cryogel walls, followed by a slower CBD release from the guest-host complex [47].

Chitosan-based hydrogels are promising naturally derived polysaccharides for pharmaceutical applications. This multifunctional hydrogel can encapsulate, carry, and release the drug with good biocompatibility, biodegradability, and absence of immunogenicity [65]. Moreover, chitosan hydrogels are easy to handle due to their mucoadhesive properties, providing prolonged contact with the site of action. However, despite their advantages, chitosan hydrogels cannot encapsulate lipophilic substances and could lead to potential toxicity because of the initial burst release. As for the nanoemulsions, they usually present with low viscosity and low spreadability, making them less suitable for transdermal application. The incorporation of nanoemulsions (NEs) within the chitosan hydrogel, therefore, has gained interest as the resulting system possesses different characteristics from the initial colloid systems. They can encapsulate both lipophilic and hydrophilic drugs, have enhanced stability and texture, provide controlled release, improve biocompatibility, and release profile from the incorporated drug [51]. Demisli et al. have developed a system of encapsulated CBD in oil-in-water (O/W) NEs and NEs-filled hydrogel for the treatment of various conditions, including epilepsy, psychiatric and skin conditions, pain, and inflammation. The NEs were composed of water, Transcutol, and a mixture of surfactants (Labrasol, Tween 80, and Maisine) with an immiscible phase of isopropyl tetradecanoate and organic extra virgin olive oil. The resulting O/W NEs are thermodynamically metastable but kinetically stable in the nano-range, composed of oil droplets dispersed in an aqueous medium and stabilized by surfactant molecules. Ex vivo and in vitro studies have also shown that the developed system effectively delivers CBD across the skin while maintaining good biocompatibility [51].

Alginate is a natural and versatile polymer of marine origin with good biocompatibility, ease of handling, nontoxicity, mild gelation properties, and low cost. Alginate is hydrophilic and water-soluble, thickening in neutral conditions, and can form a hydrogel in the presence of polyvalent cations [66]. Therefore, Zheng's team developed a CBD- containing alginate-based hydrogel enriched in Zn²⁺ (CBD/alg@Zn) to promote wound healing. The hydrogel was synthesized by ion crosslinking of the Zn²⁺ and the alginate polymer, and the CBD was embedded in the hydrogel

simultaneously. The team observed that the CBD/alg@Zn system has antioxidant activity and could reduce the inflammatory response while exhibiting good biocompatibility [52].

Sepigel 305 comprises a polyacrylamide gelling agent, a non-ionic emulsifier (polyoxyethylene 7 lauryl ether), and a fatty oil (isoparaffin). This compound led to medium to high viscosity formulation and allows the incorporation of both hydrophilic and lipophilic substances with good stability [67]. Vanti et al. developed a CBD-loaded O/A ME formulated as a microemulgel for treating skin diseases, including eczema, psoriasis, pruritus, and inflammatory conditions. The system consists of Solutol HS 15 (20%, surfactant), Transcutol P (9%, cosolvent), isopropyl myristate (5%, oil phase), water (66%), and 1% w/w CBD, which has been thickened with Sepigel 305. The resulting system shows excellent homogeneity of the ME droplets, high stability in pH viscosity, and CBD content. The release and permeation studies they performed on a skin-PAMPA model and through a rabbit ear skin also showed controlled release and absorption of the CBD, resulting in good retention in the skin layers [53].

Eudragit RL100 is a co-polymer containing methyl methacrylate and ethyl acrylate with quaternary ammonium groups and less methylacrylate acid. This polymer is associated with sustainable drug release with high permeability [67]. Casiraghi et al. tested the impact of different delivery systems on the skin permeation of CBD. The two developed systems that show greater promise were a propylene glycol/water mixture (80/20 v/v), a 3D printed Eudragit RL (59.4% w/w), and tributyl citrate (39.6% w/w) CBD patch. The transformation of the solution into hydrophilic gel did not seem to affect the performance in terms of permeation and led to a reduction of the amount of CBD retained in the SC. They found that the transdermal patch has lower dosing and unfavorable thermodynamic conditions. However, this transdermal system provided a comparable skin retention of the CBD [54].

Stinchcomb's team studied the skin permeation of different cannabinoids, including Δ8-THC, CBD, and CBN, as they are good candidates for combination therapy for chemotherapy side effects management. The excipients they used are mineral oil with 7:3 propylene glycol:water or 4:5:4 propylene glycol:water:ethanol. They found that 30–33% ethanol concentration significantly enhanced the flux of Δ8-THC and CBD [55].

Radwan-Pragłowska et al. developed a novel transdermal delivery system of CBD by functionalizing chitosan with ZnO NPs for treatment-resistant epilepsy. This system has superior

porosity, excellent swelling properties, mechanical durability, drug-loading capacity, and a prolonged release of CBD. Moreover, this system had conductive properties, which makes its application possible by iontophoresis. The CBD-loaded chitosan-ZnO system also shows good biocompatibility [56].

Silica particles have gained popularity in the biomedical field because of their stability, hydrophobicity, biocompatibility, ease of functionalization, large specific surface area, high pore volume with adjustable pore size, controlled particle size, high loading capacity for drugs, controllable drug release and ease of synthesis and processing. The chemical and physical functionalization of the particles also allows the encapsulation of both hydrophilic and hydrophobic drugs [68]. Khabir et al. encapsulated CBD within a nanoporous organosilica matrix. The resulting system can stabilize CBD for a period of up to 18 weeks with only a small product degradation. However, the transdermal penetration studies demonstrate the presence of CBD within the dermis layer of the skin below therapeutically relevant concentrations. They also embedded the CBD–Silica particles within a thin PVA film. The results suggest that this system can release stable CBD with an enhanced dissolution profile compared to the particles alone and pure CBD. A higher concentration of CBD is also measured below the SC when the formulation is incorporated in PVA films than with pure CBD, consistent with the enhanced dissolution profile. However, further optimization of the dose and transdermal penetration are required for this formulation to be successfully implemented [57].

Park et al. tested various microemulsions (ME), including Capryol 90 as oil phase, Tween 80, Solutol HS15, Procetyl AWS, and Cremophor RH40 as surfactants, ethanol as cosurfactant, and distilled water as the aqueous phase for the transdermal delivery of acidic cannabinoids. One of the MEs, composed of 1.0% (w/w) of cannabinoids, 5% (w/w) of Capryol 90, 44% (w/w) Smix (2:1, Procetyl AWS and ethanol), and 50.0% (w/w) of distilled water, showed a significant improvement in transmembrane flux, permeability coefficient, and enhancement ratio [58].

In addition to the main polymeric or excipient used in the formulations above, other compounds can be employed to facilitate the penetration of CBD into the skin. Chemical permeation enhancers (CPEs), such as propylene glycol, ethanol, and labrasol, are often combined with these systems to enhance skin permeation by interacting with the skin barrier components to temporarily reduce its permeability or modify the formulation properties to increase the active component uptake into the

skin [43]. These enhancers should possess a high specificity, non-toxic, non-irritating, and non-allergenic effects, a fast, predictable, and reproducible response, unidirectionality effects, compatibility with the drug and formulation compounds, and acceptance for use in the cosmetic domain [43]. CPEs that affect the skin barrier can act in three different ways. They can alter the lipids by either incorporating lipid lamellae to fluidize the lipid chains or by adding enhancer-rich, more permeable domains in the lipid lamellae. The second mechanism is the alteration of the proteinic components of the SC either by changing the keratin conformation, causing swelling and hydration, or by altering the cohesion between corneocytes. The last method is altering the solvent nature of the tissue, which impacts the partitioning of the drug from the formulation into the SC [43]. It is also important to note that most enhancers can act via multiple mechanisms. However, one of the main challenges associated with using CPE is finding potent but safe enhancers, as when they disrupt the skin barrier, they often

also affect cell viability and cause toxicity. Therefore, different strategies can increase the potency while minimizing unwanted side effects, such as skin irritation and toxicity. The first strategy consists of utilizing a synergistic combination of enhancers that have, for example, different mechanisms of action. Consequently, the concentration of enhancers can be lower than usual, decreasing toxicity while maintaining efficacy. The other strategy consists of biodegradable enhancers. Such enhancers will interact with the SC to increase the permeation of the drug and be transformed by enzymes of the skin into a non-toxic compound when they reach deeper viable strata (e.g., amino acid-based amphiphiles linked by an ester bound to a fatty alcohol are degraded by the esterases of the skin) [43].

4. In Vivo Models for Assessing Anti-inflammatory and Analgesic Properties

While assessing a new drug's biological effects and efficacy, it is crucial to carefully choose a representative in vivo model so that the conclusions drawn in those studies are as accurate as possible and can be extrapolated to humans. Finding a safe and effective drug to control inflammation has been a challenge, and therefore, many animal models have been developed to evaluate the drug's anti-inflammatory properties. Hence, this section will focus on paw edema models of inflammation in mice/rats since they are the most relevant to this review. Table 2 at the end of this section will summarize the advantages and limitations of each technique.

Table 2. In vivo paw inflammation models for screening drugs' anti-inflammatories properties.

Model	Advantages	Limitations
Carrageenan-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - Reproducible - Well-established - Bi-phasic mechanism of action - Suitable as a complementary method 	<ul style="list-style-type: none"> - Minimal and transient response - Solution preparation required extreme precision - Minimal and transient response
Histamine/Serotonin-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - Confirmation of biological target - Suitable as a complementary method 	<ul style="list-style-type: none"> - Inappropriate for assessment of PG inhibitors - Minimal and transient response
Bradykinin-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - Confirmation of biological target 	<ul style="list-style-type: none"> - Inappropriate for assessment of histidine-serotonin inhibitors
Dextran-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - Bi-phasic mechanism of action - Good to reinforce the results of the carrageenan model 	<ul style="list-style-type: none"> - Minimal and transient response
LPS-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - Suitable to assess drugs that modulate cytokine levels 	<ul style="list-style-type: none"> - Minimal and transient response
Formalin-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - Biphasic behavioral response - Suitable to assess acute, chronic, and immune inflammation 	<ul style="list-style-type: none"> - Pain for an extended period
CFA-Induced Edema	<ul style="list-style-type: none"> - More persistent inflammation and symptoms - Suitable to assess anti-arthritis effects 	<ul style="list-style-type: none"> - Increase levels of stress and pain for a more extended period

Murine models of paw inflammation are subdivided into two categories: acute inflammation and chronic inflammation. Both models are used to evaluate drugs that modulate erythema, blood vessel permeability, leukocyte infiltration, chemotaxis, and phagocytosis and assess some of the proprieties of the drugs, such as antipyretic, analgesic, and anti-inflammatory actions. However, the duration and intensity of inflammation vary between the two. Acute inflammation is more of a transient and restrained reaction, while chronic inflammation models persist for extended periods and usually harmonize the disease process [69].

4.1. Carrageenan-Induced Edema

Carrageenan-induced paw edema is a widely used and well-established model of acute inflammation to screen the anti-inflammatory properties of various natural and synthetic drugs. In addition, it demonstrates good reproducibility and acts on several inflammatory pathways, making it a good model for preliminary analyses. Furthermore, this non- antigenic phlogistic agent acts

locally in a bi-phasic manner, enabling the model to predict a probable biological target of the tested drug [69]. In the first hour following carrageenan injection, the injection trauma and the release of inflammatory mediators, such as histamine, serotonin, and bradykinin, account for most of the early acute phase of inflammation. The second phase, which occurs around 3 h post-injection, is mainly mediated by PGs and neutrophil infiltration, which release free radicals and pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α et IL-1 β [70]. This phase also corresponds to the maximal swelling and subsides by 24 h [71]. However, the concentration of carrageenan injected highly affects the edema response, whereas the maximum response is too arduous to inhibit. Hence, the solution must be precisely prepared to avoid deviation from the expected response [69].

4.2. Histamine/Serotonin-Induced Edema

As seen in the carrageenan-induced edema, histamine and 5HT are two essential modulators of the early phase of inflammation. They enhance vasodilatation, vascular permeability, edema formation, leukocyte infiltration, and modulate other inflammatory mediator levels, causing acute inflammation [72]. Their injection causes an influx of lymph and plasma proteins into the extracellular matrix, which is responsible for the local edema. The binding of histamine to the receptor H1 also causes the contraction and separation of endothelial cells, which increases vascular permeability. Histamine also causes the release of neuropeptides and PGs, causing the phenotype of hyperalgesia and inflammation associated with histamine [69]. However, those models are mainly used to evaluate the acute anti-inflammatory effects of drugs that act by inhibiting histamine or serotonin. It can also be used, complementary to the carrageenan model, to confirm the biological target and efficacy of the first phase of inflammation. However, the effects of histamine and 5HT are minimal and temporary [73].

4.3. Bradykinin-Induced Edema

Bradykinin is also a crucial mediator of the early acute inflammation response. Along with histamine and 5HT, it acts as a vasodilator in swelling and inflammation. In this model, the injection of bradykinin stimulates the phospholipase A2 activity, promoting PG biosynthesis [69]. It can also activate TRPA1, triggering the sensation of pain. In addition, the activation of bradykinin receptors also stimulates the production of other inflammatory mediators and cytokines [74]. Therefore, it can be used as a secondary model for carrageenan-induced edema to evaluate

drugs inhibiting PGs. However, it only produces mild short-term edema and cannot be used to assess histamine/5HT inhibitors [69].

4.4. Dextran-Induced Edema

The dextran-induced paw edema model is used to study the acute anti-inflammatory properties of drugs. It increases vascular permeability, the activation of kinins, and the release of histamine and 5HT from mast cells, leading to osmotic edema [75]. The dextran effect is biphasic; the first phase, which happens in the first hour, is characterized by extravasation and edema formation due to histamine liberation, increased vascular permeability, and increased blood flow to the inflammation site. The second phase, which takes place between 1–6 h, is accompanied by the enhancement of free radicals, bradykinins, PGE2, and cytokines levels. In addition, COX2 levels, the enzyme responsible for the biosynthesizing of PGs and leukotrienes, also seem to be increased in paws injected with dextran [76]. In sum, this model is suitable for evaluating drugs that act on histamine, 5HT, and bradykinins and can be used to reinforce the results of carrageenan-induced inflammation [69].

4.5. Liposaccharide-Induced Edema

In response to the binding of LPS to its receptor, the toll-like receptor 4, a cytokines liberation (TNF- α , IL1- β , and IL-6) with NF κ B nuclear translocation and myeloperoxidase activity, is observed along the edema response [77]. Furthermore, this acute inflammation response is localized, and the peak of inflammation is observable at 1–3 h. Therefore, this model adequately assesses drugs' efficacy in modulating cytokine levels. It is also suitable to assess anti-hyperalgesia drugs' properties [69].

4.6. Formalin-Induced Edema

Injection of small doses of formalin in rodent paws produces a biphasic behavioral response and is frequently used as a model of persistent pain. In the initial pain burst arising about 5–10 min post-injection, licking, biting, and elevation of the injected paw is observed, followed by a 5–10 min recess moment where relatively normal behavior is observed. Then, the second pain burst occurs around 30 min later. The initial pain response is thought to be associated with the activation of nociceptive neurons, while the second pain response is likely associated with inflammation within the tissue [78].

4.7. Complete Freud's Adjuvant (CFA)-Induced Edema

CFA-induced edema is a well-studied model of chronic inflammation and arthritic modifications involving various systemic changes. This model is characterized by leukocyte infiltration, increased levels of chemokines, cytokines (TNF- α , IL1- β), ROS, cartilage and bone destruction, swelling, and deformations. Therefore, it involves immune–inflammatory components, where the primary lesions (injected) and the secondary lesions (non-injected) represent human inflammation and arthritis, respectively. It is then possible to assess acute, chronic, and immune inflammation and arthritic conditions with this model [69]. Following the injection of CFA into mice's footpad, edema gradually appears in the early stage of inflammation to reach maximal swelling at 24 h post-injection and becomes more constant within two weeks [69]. Therefore, this model allows measurement of alterations such as paw volume with a plethysmometer and pain threshold with a Von Frey fiber and Modified Hargreaves apparatus. However, because the experiment is longer and more painful than the other models, it involves more animal stress [69].

5. Conclusions and Future Perspectives

In conclusion, this literature review has provided a comprehensive overview of the role of transdermal CBD in managing chronic inflammatory pain, as observed in arthritis, along with cannabinoid-based treatments approved by the Canadian, American, and European pharmaceuticals regulation authorities. Transdermal delivery of CBD shows great promise to address a broad range of pathologies, including acute inflammatory pain diseases. Various CBD nanoformulations and CBD-loaded excipients show great potential in addressing critical issues such as bioavailability, stability, and controlled release, offering a potential novel treatment for chronic inflammatory pain. This review has drawn attention to the most used *in vivo* testing methods that can be utilized to determine the anti-inflammatory and analgesic performances of CBD-loaded formulations. As a lot of work remains to be done, researchers and scientists must remain creative, collaborative, and adaptive to ensure that the CBD formulations for transdermal delivery can be translated into tangible clinical benefits.

Author Contributions: Conceptualization, È.L. and N.T.; writing—original draft preparation, È.L.; writing—review and editing, È.L., N.T. and L.Y.; supervision, N.T and L.Y.; project administration, N.T. and L.Y.; funding acquisition, N.T. and L.Y. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Mitacs through the Mitacs Accelerate program, grant number IT29500.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: Dr. Nancy Tawil is the Chief Scientific Officer of Precisio Biotix Therapeutics, the President of Qeen Biotechnologies, and Adjunct Professor at Polytechnique Montreal. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Références

1. Lodzi, M.; Godin, B.; Rakou, L.; Mechoulam, R.; Gallily, R.; Touitou, E. Cannabidiol—Transdermal Delivery and Anti-Inflammatory Effect in a Murine Model. *J. Control. Release* **2003**, *93*, 377–387. [CrossRef] [PubMed]
2. World Health Organization. Osteoarthritis. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/osteoarthritis> (accessed on 13 May 2024).
3. Maqbool, M.; Fekadu, G.; Jiang, X.; Bekele, F.; Tolossa, T.; Turi, E.; Fetensa, G.; Fanta, K. An up to Date on Clinical Prospects and Management of Osteoarthritis. *Ann. Med. Surg.* **2021**, *72*, 103077. [CrossRef] [PubMed]
4. Benjamin, O.; Goyal, A.; Lappin, S.L. Disease-Modifying Antirheumatic Drugs (DMARD). In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507863> (accessed on 11 October 2023).
5. Benyamin, R.; Trescot, A.; Datta, S.; Buenaventura, R.; Adlaka, R.; Seghal, N.; Glaser, S.E.; Vallejo, R. Opioid Complications and Side Effects. *Pain Physician* **2008**, *11*, S105–S120. [CrossRef] [PubMed]
6. Bijlsma, J.W.J.; Van Everdingen, A.A.; Jacobs, J.W.G. Corticosteroids in Rheumatoid Arthritis. *Clin. Immunother.* **1995**, *3*, 271–286. [CrossRef]

7. Bindu, S.; Mazumder, S.; Bandyopadhyay, U. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Organ Damage: A Current Perspective. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, *180*, 114147. [CrossRef] [PubMed]
8. Goodwin, J.L.R.; Kraemer, J.J.; Bajwa, Z.H. The Use of Opioids in the Treatment of Osteoarthritis: When, Why, and How? *Curr. Rheumatol. Rep.* **2009**, *11*, 5–14. [CrossRef] [PubMed]
9. Katz, J.N.; Arant, K.R.; Loeser, R.F. Diagnosis and Treatment of Hip and Knee Osteoarthritis. *JAMA* **2021**, *325*, 568–578. [CrossRef] [PubMed]
10. Mrid, B.R.; Bouchmaa, N.; Ainani, H.; El Fatimy, R.; Malka, G.; Mazini, L. Anti-Rheumatoid Drugs Advancements: New Insights into the Molecular Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *151*, 113126. [CrossRef] [PubMed]
11. Amin, M.R.; Ali, D.W. Pharmacology of Medical Cannabis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2019**, *1162*, 151–165. [CrossRef] [PubMed]
12. GÜLCK, T.; MØLLER, B.L. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci.* **2020**, *25*, 985–1004. [CrossRef]
13. Pagano, C.; Navarra, G.; Coppola, L.; Avilia, G.; Bifulco, M.; Laezza, C. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 3344. [CrossRef]
14. Boyaji, S.; Merkow, J.; Elman, R.N.M.; Kaye, A.D.; Yong, R.J.; Urman, R.D. The Role of Cannabidiol (CBD) in Chronic Pain Management: An Assessment of Current Evidence. *Curr. Pain Headache Rep.* **2020**, *24*, 4. [CrossRef] [PubMed]
15. Tijani, A.O.; Thakur, D.; Mishra, D.; Fremppong, D.; Chukwunyere, U.I.; Puri, A. Delivering Therapeutic Cannabinoids via Skin: Current State and Future Perspectives. *J. Control. Release* **2021**, *334*, 427–451. [CrossRef]
16. Mahmoudinoodezh, H.; Telukutla, S.R.; Bhangu, S.K.; Bachari, A.; Cavalieri, F.; Mantri, N. The Transdermal Delivery of Therapeutic Cannabinoids. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 438. [CrossRef]
17. Lu, H.-C.; Mackie, K. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biol. Psychiatry* **2016**, *79*, 516–525. [CrossRef] [PubMed]

18. Almeida, D.L.; Devi, L.A. Diversity of Molecular Targets and Signaling Pathways for CBD. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2020**, *8*, e00682. [CrossRef]
19. Howlett, A.C.; Abood, M.E. CB 1 and CB 2 Receptor Pharmacology. *Cannabinoid Pharmacol.* **2017**, *80*, 169–206. [CrossRef]
20. Mlost, J.; Bryk, M.; Starowicz, K. Cannabidiol for Pain Treatment: Focus on Pharmacology and Mechanism of Action. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8870. [CrossRef] [PubMed]
21. Zou, S.; Kumar, U. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 833. [CrossRef]
22. Dos Reis Rosa Franco, G.; Smid, S.; Viegas, C. Phytocannabinoids: General Aspects and Pharmacological Potential in Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neuropharmacol.* **2021**, *19*, 449–464. [CrossRef]
23. Nigro, E.; Formato, M.; Crescente, G.; Daniele, A. Cancer Initiation, Progression and Resistance: Are Phytocannabinoids from *Cannabis sativa* L. Promising Compounds? *Molecules* **2021**, *26*, 2668. [CrossRef] [PubMed]
24. Borges, R.; Batista, J.; Viana, R.; Baetas, A.; Orestes, E.; Andrade, M.; Honório, K.; da Silva, A. Understanding the Molecular Aspects of Tetrahydrocannabinol and Cannabidiol as Antioxidants. *Molecules* **2013**, *18*, 12663–12674. [CrossRef] [PubMed]
25. Atalay, S.; Jarocka-Karpowicz, I.; Skrzydlewska, E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Properties of Cannabidiol. *Antioxidants* **2019**, *9*, 21. [CrossRef] [PubMed]
26. Turcotte, C.; Blanchet, M.-R.; Laviolette, M.; Flamand, N. The CB2 Receptor and Its Role as a Regulator of Inflammation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4449–4470. [CrossRef] [PubMed]
27. Ashton, J.; Glass, M. The Cannabinoid CB2 Receptor as a Target for Inflammation-Dependent Neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **2007**, *5*, 73–80. [CrossRef]
28. Pertwee, R.G. The Diverse CB1 and CB2 receptor Pharmacology of Three Plant Cannabinoids: Δ9-Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Δ9-Tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* **2008**, *153*, 199–215. [CrossRef] [PubMed]
29. Lunn, C.A.; Fine, J.S.; Rojas-Triana, A.; Jackson, J.V.; Fan, X.; Kung, T.T.; Gonsiorek, W.; Schwarz, M.A.; Lavey, B.; Kozlowski, J.A.; et al. A Novel Cannabinoid Peripheral

- Cannabinoid Receptor-Selective Inverse Agonist Blocks Leukocyte Recruitment In Vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *316*, 780–788. [CrossRef]
30. Turcotte, C.; Chouinard, F.; Lefebvre, J.S.; Flamand, N. Regulation of Inflammation by Cannabinoids, the Endocannabinoids 2-Arachidonoyl-Glycerol and Arachidonoyl-Ethanolamide, and Their Metabolites. *J. Leukoc. Biol.* **2015**, *97*, 1049–1070. [CrossRef] [PubMed]
31. Staton, P.C.; Hatcher, J.P.; Walker, D.J.; Morrison, A.D.; Shapland, E.M.; Hughes, J.P.; Chong, E.; Mander, P.K.; Green, P.J.; Billinton, A.; et al. The Putative Cannabinoid Receptor GPR55 Plays a Role in Mechanical Hyperalgesia Associated with Inflammatory and Neuropathic Pain. *Pain* **2008**, *139*, 225–236. [CrossRef]
32. Etemad, L.; Karimi, G.; Alavi, M.S.; Roohbakhsh, A. Pharmacological Effects of Cannabidiol by Transient Receptor Potential Channels. *Life Sci.* **2022**, *300*, 120582. [CrossRef]
33. Muller, C.; Morales, P.; Reggio, P.H. Cannabinoid Ligands Targeting TRP Channels. *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *11*, 487. [CrossRef] [PubMed]
34. Xu, H.; You, M.; Shi, H.; Hou, Y. Ubiquitin-Mediated NFκB Degradation Pathway. *Cell. Mol. Immunol.* **2014**, *12*, 653–655. [CrossRef] [PubMed]
35. Health Canada. Review of Cannabidiol: Report of the Science Advisory Committee on Health Products Containing Cannabis. Canada. 28 July 2022. Available online: <https://www.canada.ca/en/health-canada/corporate/about-health-canada/public-engagement/external-advisory-bodies/health-products-containing-cannabis/review-cannabidiol-health-products-containing-cannabis.html> (accessed on 13 May 2024).
36. Barnes, M.P. Sativex®: Clinical Efficacy and Tolerability in the Treatment of Symptoms of Multiple Sclerosis and Neuropathic Pain. *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 607–615. [CrossRef] [PubMed]
37. Office of the Commissioner. *FDA Approves First Drug Comprised of an Active Ingredient Derived from Marijuana to Treat Rare, Severe Forms of Epilepsy*; U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2018. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-drug-comprised-active-ingredient-derived-marijuana-treat-rare-severe-forms> (accessed on 13 May 2024).

38. Office of the Commissioner. *FDA Regulation of Cannabis and Cannabis-Derived Products: Q&A*; U.S. Food and Drug Administration: Silver Spring, MD, USA, 2024. Available online: <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/fda-regulation-cannabis-and-cannabis-derived-products-including-cannabidiol-cbd> (accessed on 13 May 2024).
39. O'Donnell, B.; Meissner, H.; Gupta, V. Dronabinol. In *StatPearls [Internet]*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2023. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557531/> (accessed on 13 May 2024).
40. Throckmorton, D. FDA Role in Regulation of Cannabis Products. 2021. Available online: <https://www.fda.gov/media/152407/download> (accessed on 13 May 2024).
41. EU/3/14/1339; Orphan Designation for Treatment of Dravet Syndrome. European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2014. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-14-1339> (accessed on 13 May 2024).
42. European Medicines Agency. *European Medicines Agency Decision: P/0110/2022*; European Medicines Agency: Amsterdam, The Netherlands, 2022. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/pip-decision/p01102022-ema-decision-13-april-2022-acceptance-modification-agreed-paediatric-investigation-plan-cannabidiol-delta-9-tetrahydrocannabinol-sativex-emea-000181-pip01-08-m06_en.pdf (accessed on 7 May 2024).
43. Kováčík, A.; Kopecňá, M.; Vávrová, K. Permeation Enhancers in Transdermal Drug Delivery: Benefits and Limitations. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 145–155. [CrossRef] [PubMed]
44. Hammell, D.C.; Zhang, L.P.; Ma, F.; Abshire, S.M.; McIlwrath, S.L.; Stinchcomb, A.L.; Westlund, K.N. Transdermal Cannabidiol Reduces Inflammation and Pain-Related Behaviours in a Rat Model of Arthritis. *Eur. J. Pain* **2015**, *20*, 936–948. [CrossRef] [PubMed]
45. Gonzalez-Cuevas, G.; Martin-Fardon, R.; Kerr, T.M.; Stouffer, D.G.; Parsons, L.H.; Hammell, D.C.; Banks, S.L.; Stinchcomb, A.L.; Weiss, F. Unique Treatment Potential of Cannabidiol for the Prevention of Relapse to Drug Use: Preclinical Proof of Principle. *Neuropsychopharmacology* **2018**, *43*, 2036–2045. [CrossRef] [PubMed]

46. Liput, D.J.; Hammell, D.C.; Stinchcomb, A.L.; Nixon, K. Transdermal Delivery of Cannabidiol Attenuates Binge Alcohol-Induced Neurodegeneration in a Rodent Model of an Alcohol Use Disorder. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2013**, *111*, 120–127. [CrossRef]
47. Momekova, D.; Danov, Y.; Momekov, G.; Ivanov, E.; Petrov, P. Polysaccharide Cryogels Containing β -Cyclodextrin for the Delivery of Cannabidiol. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, 1774. [CrossRef] [PubMed]
48. Scheffer, I.E.; Hulihan, J.; Messenheimer, J.; Ali, S.; Keenan, N.; Griesser, J.; Guterman, D.L.; Sebree, T.; Sadleir, L.G. Safety and Tolerability of Transdermal Cannabidiol Gel in Children with Developmental and Epileptic Encephalopathies: A Nonrandomized Controlled Trial. *JAMA Netw. Open* **2021**, *4*, e2123930. [CrossRef]
49. O’Brien, T.J.; Berkovic, S.F.; French, J.A.; Messenheimer, J.A.; Sebree, T.B.; Bonn-Miller, M.O.; Guterman, D.L.; STAR 1/STAR 2 Study Group. Adjunctive Transdermal Cannabidiol for Adults with Focal Epilepsy: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Netw. Open* **2022**, *5*, e2220189. [CrossRef]
50. Berry-Kravis, E.; Hagerman, R.; Budimirovic, D.; Erickson, C.; Heussler, H.; Tartaglia, N.; Cohen, J.; Tassone, F.; Dobbins, T.; Merikle, E.; et al. A Randomized, Controlled Trial of ZYN002 Cannabidiol Transdermal Gel in Children and Adolescents with Fragile X Syndrome (CONNECT-FX). *J. Neurodev. Disord.* **2022**, *14*, 56. [CrossRef]
51. Demisli, S.; Galani, E.; Goulielmaki, M.; Kyriolis, F.L.; Ilic, T.; Hamdi, F.; Crevar, M.; Kastritis, P.L.; Pletsas, V.; Nallet, F.; et al. Encapsulation of Cannabidiol in Oil-In-Water Nanoemulsions and Nanoemulsion-Filled Hydrogels: A Structure and Biological Assessment Study. *J. Colloid Interface Sci.* **2023**, *634*, 300–313. [CrossRef] [PubMed]
52. Zheng, Z.; Qi, J.; Hu, L.; Ouyang, D.; Wang, H.; Sun, Q.; Lin, L.; You, L.; Tang, B. A Cannabidiol-Containing Alginate Based Hydrogel as Novel Multifunctional Wound Dressing for Promoting Wound Healing. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *134*, 112560. [CrossRef] [PubMed]
53. Vanti, G.; Grifoni, L.; Bergonzi, M.C.; Antiga, E.; Montefusco, F.; Caproni, M.; Bilia, A.R. Development and Optimisation of Biopharmaceutical Properties of a New Microemulgel of Cannabidiol for Locally-Acting Dermatological Delivery. *Int. J. Pharm.* **2021**, *607*, 121036. [CrossRef] [PubMed]

54. Casiraghi, A.; Musazzi, U.M.; Centin, G.; Franzè, S.; Minghetti, P. Topical Administration of Cannabidiol: Influence of Vehicle- Related Aspects on Skin Permeation Process. *Pharmaceutics* **2020**, *13*, 337. [CrossRef] [PubMed]
55. Stinchcomb, A.L.; Valiveti, S.; Hammell, D.C.; Ramsey, D.R. Human Skin Permeation of $\Delta 8$ -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol. *J. Pharm. Pharmacol.* **2004**, *56*, 291–297. [CrossRef] [PubMed]
56. Radwan-Pragłowska, J.; Janus, Ł.; Piątkowski, M.; Sierakowska, A.; Szajna, E.; Matýsek, D.; Bogdał, D. Development of Stimuli- Responsive Chitosan/ZnO NPs Transdermal Systems for Controlled Cannabidiol Delivery. *Polymers* **2021**, *13*, 211. [CrossRef] [PubMed]
57. Khabir, Z.; Partalis, C.; Panchal, J.V.; Deva, A.; Khatri, A.; Garcia-Bennett, A. Enhanced Skin Penetration of Cannabidiol Using Organosilane Particles as Transdermal Delivery Vehicles. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 798. [CrossRef]
58. Park, C.; Zuo, J.; Somayaji, V.; Lee, B.-J.; Löbenberg, R. Development of a Novel Cannabinoid-Loaded Microemulsion towards an Improved Stability and Transdermal Delivery. *Int. J. Pharm.* **2021**, *604*, 120766. [CrossRef]
59. Nitecka-Buchta, A.; Nowak-Wachol, A.; Wachol, K.; Walczyn'ska-Dragon, K.; Olczyk, P.; Batoryna, O.; Kempa, W.; Baron, S. Myorelaxant Effect of Transdermal Cannabidiol Application in Patients with TMD: A Randomized, Double-Blind Trial. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1886. [CrossRef]
60. Palmieri, B.; Laurino, C.; Vadalà, M. A Therapeutic Effect of Cbd-Enriched Ointment in Inflammatory Skin Diseases and Cutaneous Scars Clinical Trial. *Clin. Ter.* **2019**, *170*, 93–99. [CrossRef] [PubMed]
61. Emanet, M.; Ciofani, G. Ethosomes as Promising Transdermal Delivery Systems of Natural-Derived Active Compounds. *Adv. NanoBiomed Res.* **2023**, *3*, 2300020. [CrossRef]
62. Ethier, A.; Bansal, P.; Baxter, J.; Langley, N.; Richardson, N.; Patel, A.M. The Role of Excipients in the Microstructure of Topical Semisolid Drug Products. In *The Role of Microstructure in Topical Drug Product Development*; Langley, N., Michniak-Kohn, B., Osborne, D.W., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2019; Volume 36, pp. 155–193. [CrossRef]

63. Javadzadeh, Y.; Adibkia, K.; Hamishekar, H. Transcutol® (Diethylene Glycol Monoethyl Ether): A Potential Penetration Enhancer. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*; Dragicevic, N., Maibach, H.I., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2015; pp. 195–205. [CrossRef]
64. Cova, T.F.; Murtinho, D.; Pais, A.A.C.C.; Valente, A.J.M. Combining Cellulose and Cyclodextrins: Fascinating Designs for Materials and Pharmaceutics. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 271. [CrossRef] [PubMed]
65. Taokaew, S.; Kaewkong, W.; Kriangkrai, W. Recent Development of Functional Chitosan-Based Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Gels* **2023**, *9*, 277. [CrossRef] [PubMed]
66. Tomic, S.L.; Babic Radic, M.M.; Vukovic, J.S.; Filipovic, V.V.; Nikodinovic-Runic, J.; Vukomanovic, M. Alginate-Based Hydrogels and Scaffolds for Biomedical Applications. *Mar. Drugs* **2023**, *21*, 177. [CrossRef] [PubMed]
67. Berenguer, D.; Sosa, L.; Alcover, M.; Sessa, M.; Halbaut, L.; Guillén, C.; Fisa, R.; Calpena-Campmany, A.C.; Riera, C. Development and Characterization of a Semi-Solid Dosage Form of Meglumine Antimoniate for Topical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 613. [CrossRef] [PubMed]
68. Morais, R.P.; Hochheim, S.; de Oliveira, C.C.; Riegel-Vidotti, I.C.; Marino, C.E.B. Skin Interaction, Permeation, and Toxicity of Silica Nanoparticles: Challenges and Recent Therapeutic and Cosmetic Advances. *Int. J. Pharm.* **2022**, *614*, 121439. [CrossRef] [PubMed]
69. Patil, K.R.; Mahajan, U.B.; Unger, B.S.; Goyal, S.N.; Belemkar, S.; Surana, S.J.; Ojha, S.; Patil, C.R. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-Inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4367. [CrossRef] [PubMed]
70. Ghorbanzadeh, B.; Mansouri, M.; Hemmati, A.; Naghizadeh, B.; Mard, S.; Rezaie, A. A Study of the Mechanisms Underlying the Anti-Inflammatory Effect of Ellagic Acid in Carrageenan-Induced Paw Edema in Rats. *Indian J. Pharmacol.* **2015**, *47*, 292. [CrossRef]
71. Fehrenbacher, J.C.; Vasko, M.R.; Duarte, D.B. Models of Inflammation: Carrageenan- or Complete Freund’s Adjuvant-Induced Edema and Hypersensitivity in the Rat. *Curr. Protoc. Pharmacol.* **2012**, *56*, 5.4.1–5.4.4. [CrossRef]

72. Tamaddonfard, E.; Farshid, A.A.; Hosseini, L. Crocin Alleviates the Local Paw Edema Induced by Histamine in Rats. *Avicenna J. Phytomed.* **2012**, *2*, 97–104.
73. Akpinar, E. Experimental Inflammation Models Created in Laboratory Animals. *Atatürk Univ. J. Vet. Sci.* **2021**, *16*, 336–343. [CrossRef]
74. Rex, D.A.B.; Deepak, K.; Vaid, N.; Dagamajalu, S.; Kandasamy, R.K.; Flo, T.H.; Keshava Prasad, T.S. A Modular Map of Bradykinin-Mediated Inflammatory Signaling Network. *J. Cell Commun. Signal.* **2021**, *16*, 301–310. [CrossRef] [PubMed]
75. Coura, C.O.; Souza, R.B.; Rodrigues, J.A.G.; de Sousa Oliveira Vanderlei, E.; de Araújo, I.W.F.; Ribeiro, N.A.; Frota, A.F.; Ribeiro, K.A.; Chaves, H.V.; Pereira, K.M.A.; et al. Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory Action of a Polysulfated Fraction from *Gracilaria cornea* in Rats. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0119319. [CrossRef] [PubMed]
76. Xu, M.; Chen, Q.; Fan, R.; Wang, J.; Li, Y. Anti-Inflammation Effect of Small Molecule Oligopeptides Prepared from *Panax ginseng* C. A. Meyer in Rats. *Molecules* **2019**, *24*, 858. [CrossRef] [PubMed]
77. Vajja, B.N.L.; Juluri, S.; Kumari, M.; Kole, L.; Chakrabarti, R.; Joshi, V.D. Lipopolysaccharide-Induced Paw Edema Model for Detection of Cytokine Modulating Anti-Inflammatory Agents. *Int. Immunopharmacol.* **2004**, *4*, 901–909. [CrossRef] [PubMed]
78. Damas, J.; Liégeois, J.F. The Inflammatory Reaction Induced by Formalin in the Rat Paw. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1999**, *359*, 220–227. [CrossRef]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.