



Faculté de Pharmacie

École Doctorale en Sciences Pharmaceutiques

DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION DE POUDRES SÈCHES POUR INHALATION À BASE D'ITRACONAZOLE DANS LE CADRE DU TRAITEMENT ET DE LA PRÉVENTION DE L'ASPERGILLOSE PULMONAIRE

Christophe DURET

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques

Promoteur et Co-promoteur :

Prof. Karim AMIGHI (Promoteur, Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Biopharmacie)
Dr. Nathalie WAUTHOZ (Co-promoteur)

Composition du jury :

Prof. Jean NÈVE (Président du jury)
Dr Francis VANDERBIST
Prof. Véronique FONTAINE
Prof. Ingrid LANGER
Prof. Nicolas TSAPIS (UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud)
Prof. Marie-Pierre FLAMENT (INSERM U1008, Université de Lille-2)

Année académique 2012-2013

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Amighi de m'avoir permis de réaliser une thèse de doctorat dans son laboratoire. Ses nombreux conseils et la patience dont il a fait preuve m'ont aidé à progresser tout au long de ce parcours. Je le remercie également pour la confiance qu'il m'a accordée et pour tous les moyens qu'il a mis en œuvre pour que ce travail se déroule dans les meilleures conditions.

Ce projet n'aurait pas pu débuter sans la rencontre du Dr Francis Vanderbist, lors de mon stage d'industrie dans le département de recherche et développement des laboratoires SMB qu'il dirige de main de maître. Son énergie et son enthousiasme m'ont toujours permis de croire en ce que je réalisais durant ce travail. Je remercie également Thami Sebti qui, par son expérience et sa disponibilité, a toujours pu me conseiller judicieusement.

Je tiens également à remercier particulièrement madame Nathalie Wauthoz qui m'a énormément aidé, notamment, à trouver les mots justes lors des multiples rédactions. Je tiens à souligner son implication et son dévouement qui sont des motivations sans pareilles. Sa façon d'appréhender la recherche, en partageant pleinement ses connaissances et son expérience, contribue quotidiennement à l'amélioration de la qualité du travail réalisé au sein de cette équipe.

J'adresse également mes remerciements à mes collègues. En particulier, à Jonathan Goole pour les nombreuses virées nocturnes faites à l'animalerie, à Nancy Van Aelst grâce à qui nous ne manquons jamais de rien dans le laboratoire et à Rémi Rosière pour m'avoir aidé lors des longues journées d'infection. Une pensée va aussi à Philippe Deleuze, maintenant pensionné, qui m'a fait découvrir le « côté technique » de la chose.

Je remercie fortement Tiriana Segato du département de Chimie Industrielle de l'Université Libre de Bruxelles qui a réalisé les analyses de diffraction aux rayons X.

Je remercie mes amis de Belgique et d'ailleurs, qui se reconnaîtront, grâce à qui les intermèdes de travail se passent toujours bien. Un tout grand merci également à la relectrice de ce manuscrit.

Un remerciement plus personnel va bien évidemment à Amandine qui a participé pleinement à la réussite de ce long parcours en intervenant dans ma vie de tous les jours. Son écoute et son aide m'ont aidé à gérer la pression que ce genre de travail peut engendrer.

Je remercie également mon frère, Thibault, pour sa zen attitude et sa gentillesse intouchable qui font de lui un bon rehausseur de moral. Je remercie également mes grands-mères, Lucienne et Irène, ainsi que mes grands-pères, Arthur et Michel, malheureusement trop vite disparus, pour tous ce qu'ils m'ont déjà apporté. Je remercie toute ma famille bien trop nombreuse que pour être énumérée, mais dont je tiens à souligner l'unité qui fait chaud au cœur.

Je voudrai terminer en remerciant mes parents, Catherine et Alain, sans qui je ne serai pas arrivé jusque-là. Ils ont toujours cru en moi et m'ont laissé librement me diriger dans la voie que je choisissais en ayant certainement la crainte de me voir un jour troquer l'éprouvette contre la baguette. Leur amour et leurs conseils, m'ont permis d'éviter les embûches, de me relever et d'avancer dans la vie.

TABLE DES **MATIÈRES**

ABRÉVIATIONS	1
RÉSUMÉ	3
SUMMARY	9

CHAPITRE I : INTRODUCTION

1. L'ASPERGILLOSE	13
1.1. L'Aspergillus.....	13
1.2. L'aspergillose pulmonaire : différentes manifestations	14
1.2.1. L'aspergillose pulmonaire invasive.....	15
1.2.2. L'aspergillose pulmonaire chronique	17
1.2.3. L'aspergillome	19
1.2.4. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique.....	19
1.3. Traitement de l'aspergillose pulmonaire	20
1.3.1. Les antifongiques utilisés dans l'aspergillose pulmonaire : classification, mode d'action et voies d'administrations	20
1.3.2. Stratégies thérapeutiques recommandées	23
1.4. Problèmes généraux de la thérapie antifongique conventionnelle	26
1.4.1. Problèmes spécifiques à l'amphotéricine B	27
1.4.2. Problèmes rencontrés avec les triazolés	28
1.4.3. Phénomènes de résistances	32
1.5. L'administration pulmonaire, une alternative thérapeutique ?	33
2. L'INHALATION :	36
2.1. Le système respiratoire.....	36
2.1.1. Structure générale du système respiratoire	36
2.1.2. Zone de conduction et zone respiratoire	37
2.1.3. Structures cellulaires constituant l'épithélium pulmonaire	39
2.1.4. Les fluides du tractus respiratoire	41
2.2. Paramètres influençant la déposition des particules inhalées.....	42
2.3. Devenir des particules inhalées	46
2.3.1. La clairance mucociliaire et l'expectoration (« mucociliary clearance and cough clearance »).....	46
2.3.2. Les macrophages alvéolaires.....	47
2.3.3. La métabolisation pulmonaire	47
2.3.4. L'absorption.....	48
2.3.5. Influence de la dissolution et de la solubilité des particules inhalées	49
2.3.6. Inhalation de spores, devenir et interaction avec le milieu environnant	52

3. STRATÉGIES ET OBJECTIFS DE FORMULATIONS ENVISAGÉS POUR LE TRAITEMENT DE L'ASPERGILLOSE PULMONAIRE PAR INHALATION	54
3.1. Choix du principe actif à formuler	54
3.2. Type de forme galénique et mode d'administration envisagés.....	55
3.3. Principes de formulation	57
3.3.1. Dispersions solides d'itraconazole amorphe.....	57
3.3.2. Formulations à base de nanoparticules cristallines d'itraconazole	58
4. BUTS DU TRAVAIL	59

CHAPITRE II : DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION DE DISPERSIONS SOLIDES POUR INHALATION À BASE D'ITRACONAZOLE AMORPHE

1. INTRODUCTION	63
2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS	64
3. ARTICLE 1	67

CHAPITRE III : OPTIMISATION DES DISPERSIONS SOLIDES POUR INHALATION À BASE D'ITRACONAZOLE AMORPHE

1. INTRODUCTION	68
2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS	69
3. ARTICLE 2	71

CHAPITRE IV : DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION DE FORMULATIONS D'ITRACONAZOLE POUR INHALATION À BASE DE NANOPARTICULES

1. INTRODUCTION	72
2. ARTICLE 3	73

CHAPITRE V : ÉVALUATION IN VITRO ET IN VIVO D'UN DISPOSITIF D'INSUFFLATION ENDOTRACHÉALE DE POUDRES SÈCHES

1. INTRODUCTION	74
2. ARTICLE 4	75

CHAPITRE VI : ÉVALUATION PHARMACOCINÉTIQUE DES DISPERSIONS SOLIDES À BASE D'ITRACONAZOLE AMORPHE

1. INTRODUCTION.....76
1. ARTICLE 5..... 78

CHAPITRE VII : ÉTUDE D'ACTIVITÉ DES DISPERSIONS SOLIDES À BASE D'ITRACONAZOLE

1. INTRODUCTION 79
2. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES NON PUBLIÉS 80
3. ARTICLE 6.....81

CHAPITRE VIII : DISCUSSION, CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....82

BIBLIOGRAPHIE93

ABRÉVIATIONS

ABPA : aspergillose broncho-pulmonaire allergique

ACC : aspergillose chronique cavitaire

ACN : aspergillose chronique nécrosante

AmpB : amphotéricine B

APC : aspergillose pulmonaire chronique

API : aspergillose pulmonaire invasive

AUC : Aire sous la courbe (*area under the curve*)

BPCO : broncho-pneumonie chronique obstructive

C_{max} : concentration maximale

CMI : concentration minimal inhibitrice

CSP : caspofungine

d_{ae} : diamètre aérodynamique

DS : dispersion solide (*solid dispersion*)

DSC : calorimétrie différentielle à balayage (*differential scanning calorimetry*)

FPD : dose de particules fines (*Fine particle dose*)

FPF : fraction de particules fines

HPH : homogénéisation à haute pression (*high pressure homogenization*)

ITZ : itraconazole

IV : intraveineuse

MCF : micafungine

MMAD : diamètre aérodynamique médian massique (*mass median aerodynamic diameter*)

MsLI : impacteur liquide multi-étages (*Multi-Stage Liquid Impinger*)

NGI : impacteur de nouvelle génération (*Next Generation Impinger*)

NP : nanoparticules

PK : pharmacocinétique (*pharmacokinetic*)

PL : phospholipides

PRR : *pattern recognition receptor*

PSZ : posaconazole

PXRD : diffraction de rayons X sur poudre (*powder X-ray diffraction*)

t_{\max} : temps pour atteindre la concentration maximale

TPGS : tocopherol polyéthylène glycol 1000 succinate

VCZ : voriconazole

RÉSUMÉ

Compte tenu de ses aspects multiples, de sa dangerosité potentielle et du taux de survie considérablement bas qui lui est associé dans ses formes les plus graves, l'aspergillose pulmonaire est encore à l'heure actuelle dévastatrice sur le plan clinique. L'approche médicamenteuse conventionnelle consiste en l'administration par voie orale ou intraveineuse (IV) d'agents antifongiques. Ces voies classiques requièrent l'administration de doses très élevées qui sont nécessaires à l'obtention de concentrations systémiques suffisantes pour obtenir un effet thérapeutique au niveau pulmonaire. Cependant, ces concentrations systémiques sont également la cause d'effets secondaires indésirables et d'interactions médicamenteuses importantes. Une alternative thérapeutique à ces voies classiques serait de localiser ces antifongiques dans le poumon, en utilisant la voie inhalée. Cela permettrait d'augmenter le taux de succès thérapeutique en déposant et en concentrant directement la dose au niveau du site d'infection tout en minimisant les concentrations systémiques.

Pour ce faire, nous avons choisi de développer des poudres sèches pour inhalation à base d'itraconazole (ITZ), un antifongique actif à l'égard des souches d'*aspergillus*. Celles-ci sont administrable via un inhalateur à poudre sèche pour les avantages que présente ce mode d'administration comparativement aux nébuliseurs et aux inhalateurs pressurisés. Le développement des formulations implique entre autres l'obtention de caractéristiques aérodynamiques appropriées, c'est-à-dire, ayant, après décharge à partir d'un dispositif d'inhalation, un profil de déposition pulmonaire permettant d'atteindre des doses pulmonaires pharmacologiquement efficaces. Toutefois, l'ITZ présente une solubilité aqueuse extrêmement faible (solubilité aqueuse à pH 7 ~ 4 ng/ml à 25°C). Or, une fois déposée dans le poumon, la dose inhalée doit se solubiliser pour exercer son action pharmacologique. Nous avons donc inclus dans les concepts de formulation, une stratégie permettant l'amélioration du profil de dissolution et l'augmentation de la solubilité de l'ITZ. Cela permettrait en effet d'en potentialiser au maximum l'action pharmacologique au sein des lésions fongiques avant qu'il ne soit éliminé sous sa forme non dissoute par les mécanismes de clairance non absorptifs du poumon. De plus, le poumon étant un organe ne tolérant qu'un nombre limité de substances administrables par inhalation, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation d'excipients présentant un faible potentiel toxique ou bien tolérés après inhalation. Enfin, nous avons gardé à l'esprit lors du développement des

procédés de fabrication qu'ils pouvaient être sujets à la mise à l'échelle industrielle. Nous avons donc privilégié des procédés de fabrication simples incluant des technologies transposables telles que l'atomisation par la chaleur et l'homogénéisation à haute pression. Une attention particulière lors de la caractérisation des poudres a été portée sur les propriétés d'écoulement des formulations, toujours dans l'optique de faciliter une potentielle future manutention à plus grande échelle.

Pour répondre à ces critères, durant la première partie de ce travail, nous avons imaginé deux concepts de formulation qui ont pour but de former des microparticules de mannitol dans lesquelles est dispersé l'ITZ sous forme « modifiée ».

Le premier concept de formulation qui a été développé consistait à former une dispersion solide (DS) entre l'ITZ, si possible amorphe pour en augmenter la solubilité, et un agent matriciel en utilisant le procédé d'atomisation par la chaleur d'une solution contenant tous les ingrédients sous forme dissoute. Lors de tests préliminaires, nous avons évalué trois types d'agents matriciels, deux agents hydrophiles (le mannitol et le lactose) et un agent hydrophobe (le cholestérol). Sur base de la faisabilité, des résultats préliminaires de solubilité, de dissolution et de déposition pulmonaire *in vitro*, le mannitol a été retenu. Après une optimisation des conditions d'atomisation, les formulations ont été produites en vue d'être caractérisées. Il a été observé, par diffraction de rayons X sur poudre (PXRD) et par calorimétrie différentielle à balayage (DSC), qu'après atomisation, l'ITZ était obtenu sous forme amorphe et le mannitol sous forme cristalline. Les tests d'évaluation des propriétés aérodynamiques ont été réalisés à l'aide d'un impacteur liquide multi-étages (MsLI) en suivant les recommandations pratiques de la Pharmacopée européenne. Ce type de compositions, atomisées dans les conditions optimales, permettait d'obtenir des poudres sèches présentant les caractéristiques de taille (diamètre médian < 5 μm , mesuré par diffraction laser) et les propriétés aérodynamiques appropriées à l'administration pulmonaire (fraction de particules fines (FPF) déterminées lors des tests d'impaction comprises entre 40 % et 70 %). La formation d'une DS avec le mannitol était nécessaire afin d'augmenter la solubilité et d'accélérer la cinétique de dissolution de l'ITZ comparativement à son homologue micronisé sous forme cristalline ou encore à sa forme amorphe atomisée sans mannitol. Par exemple, dans sa configuration amorphe atomisée sans excipient ou sous sa forme cristalline initiale, l'ITZ présentait une solubilité à saturation (mesurée dans un

tampon phosphate contenant 0,02% de dipalmytoyl phosphatidyl choline) inférieure à 10 ng/ml. Après formation d'une DS avec le mannitol suivant notre procédé de formulation, nous sommes parvenus à des valeurs de solubilité atteignant 450 ng/ml. Il s'est avéré que l'ajout à la composition d'un surfactant, le tocopherol polyéthylène glycol 1000 succinate (TPGS), permettait d'accélérer la cinétique de dissolution du principe actif. Toutefois, l'utilisation du TPGS induisait une diminution des performances aérodynamiques des formulations. Étant donné que cette augmentation de la cinétique de dissolution pouvait être un avantage après administration pulmonaire, nous avons considéré un autre type de surfactant, les phospholipides (PL). L'utilisation de la lécithine de soja hydrogénée s'est révélée être très efficace. Les performances aérodynamiques des formulations ont été préservées et même améliorées. Leur incorporation à la DS permettait également d'obtenir une accélération du profil de dissolution de l'ITZ. De plus, l'augmentation de la quantité de PL dans nos formulations, dans la gamme des concentrations utilisées, était corrélée avec une amélioration d'autant plus marquée du profil de dissolution de l'ITZ. En outre, les solubilités de l'ITZ en présence de PL furent considérablement améliorées avec, par exemple, des concentrations mesurées de 870 ng/ml et 1342 ng/ml pour les formulations contenant respectivement 10 % (m/m_{poudre}) et 35 % (m/m_{poudre}) d'ITZ, ainsi que 10 % de PL exprimés par rapport à la quantité d'ITZ.

Le deuxième concept de formulation développé consistait à produire des microparticules de mannitol dans lesquelles étaient dispersées des nanoparticules (NP) cristallines d'ITZ. Le procédé de fabrication était le suivant. Une suspension de nanocristaux d'ITZ produite par homogénéisation à haute pression (HPH) était re-suspendue dans une solution de mannitol qui était par la suite atomisée pour obtenir les microparticules de poudres sèches. Après optimisation des conditions d'homogénéisation, nous sommes parvenus à produire des nanosuspensions d'ITZ dont les particules présentaient un diamètre médian inférieur à 250 nm. Nous avons alors évalué l'influence qu'avait l'ajout du mannitol et du taurocholate sodique sur l'état d'agrégation des NP avant l'étape d'atomisation et sur les performances des formulations sous forme sèche. Il a été observé que l'ajout de mannitol était nécessaire à la production de solutions sursaturées en ITZ avec une solubilité maximale d'ITZ mesurées à 96 ng/ml dans le tampon phosphate précédemment cité. L'ajout de mannitol s'est avéré nécessaire afin de minimiser le phénomène d'agrégation des NP

durant l'étape d'atomisation. De plus, l'ajout de taurocholate de sodium permettait également d'inhiber leur agrégation. La cristallinité des NP d'ITZ a été confirmée par PXRD et DSC. Ce type de formulation présentait des tailles et des performances aérodynamiques compatibles à l'administration pulmonaire (tailles des particules < 5 µm et FPF entre 35 % et 46 %). Néanmoins, comparativement aux DS précédemment décrites, ces formulations à base de NP s'avèrent sensiblement moins performantes. En effet, au niveau des caractéristiques aérodynamiques, les formulations à base de NP présentent des FPF nettement inférieures à celles obtenues pour les DS (FPF de ~40 % pour les formulations nanoparticulaires contre ~70 % pour les DS d'ITZ amorphe). De plus, à partir des formulations à bases de NP, les taux de sursaturation en ITZ atteints étaient nettement inférieurs à ceux obtenus avec les DS (~100 ng/ml Vs > 1000 ng/ml pour les meilleurs DS). En outre, la production des nanosuspensions nécessitait l'étape supplémentaire d'un minimum de 300 cycles d'homogénéisation, ce qui représente un désavantage considérable en termes de rendement économique en cas de transposition à échelle industrielle comparativement à l'étape unique nécessaire pour la fabrication des DS. Pour ces raisons, seules les DS ont été évaluées *in vivo*.

Après la mise au point des formulations, la seconde partie de ce projet consistait à évaluer les DS développés dans un système biologique complet, la souris. Nous avons en premier lieu réalisé une pharmacocinétique (PK) après administration pulmonaire pour déterminer l'effet de l'augmentation de la solubilité observée *in vitro* et de l'ajout de PL dans la formulation. Ensuite, nous avons entrepris une étude d'activité sur un modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive (API) permettant de comparer l'efficacité thérapeutique ou prophylactique de nos formulations comparativement à une thérapie standard par voie orale. Pour effectuer ces deux études, nous avons préalablement validé une méthode d'administration des poudres sèches chez la souris à l'aide d'un insufflateur (DP-4M®, Penn Century, Wyndmoor, USA) en utilisant la voie endotrachéale. Le premier point de cette investigation avait pour objet de déterminer si l'intervalle de taille particulaire généré lors de la décharge de nos formulations au sortir de l'insufflateur permettait une répartition homogène dans les poumons ainsi qu'une pénétration profonde des particules jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Le deuxième point sur lequel nous nous sommes également attardés

était la reproductibilité des doses pulmonaires générées après insufflation, facteur déterminant lors de la réalisation d'une étude PK.

Sur base des observations constatées durant la validation du dispositif d'administration, nous avons entrepris une étude PK après administration pulmonaire d'une dose de 0,5 mg/kg d'ITZ, représentant une quantité inhalable par l'homme et pouvant garantir des taux pulmonaires en antifongiques théoriquement adéquats. Cette étude a permis de comparer les concentrations pulmonaires et plasmatiques en ITZ après l'administration de poudres sèches à base d'une DS de mannitol et d'ITZ qui était soit cristallin soit amorphe, avec ou sans PL. Après administration de la DS à base d'ITZ sous sa forme amorphe, une augmentation de la quantité d'ITZ absorbée vers le compartiment systémique a été observée. En effet, il a été observé une augmentation d'un facteur 2,7 de l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques en ITZ de 0 à 24 heures (AUC_{0-24h}) comparativement à celle obtenue après administration de la DS à base d'ITZ sous sa forme cristalline. Le temps pour atteindre la concentration plasmatique maximale (t_{max}) était également plus court pour la formulation à base ITZ sous sa forme amorphe (t_{max} de 10 min vs 30 min pour la formulation cristalline). De plus, dans cette configuration amorphe, les temps de rétention pulmonaire en ITZ étaient considérablement plus élevés ($t_{1/2}$ d'élimination de 6,5 h pour l'ITZ cristallin vs 14,7 h pour l'ITZ amorphe) permettant de maintenir une concentration pulmonaire en ITZ supérieure à la CMI de la souche d'aspergillus la plus fréquente (*A. fumigatus*; 2 $\mu\text{g/g}_{\text{poumon}}$) pendant plus de 24h. L'ajout de PL dans un rapport ITZ:PL:mannitol (1:3:97) dans la DS influençait le profil PK de l'ITZ amorphe en accentuant et accélérant d'avantage la phase d'absorption initiale de l'ITZ observée (C_{max} et t_{max} plasmatique supérieur et inférieur à ceux obtenus pour l'ITZ amorphe, respectivement). Toutefois, cette formulation a été éliminée plus rapidement des poumons ($t_{1/2}$ d'élimination pulmonaire de l'ITZ de 4,1h pour les formulations avec PL vs 14,7h sans PL). Pour cette raison, nous avons décidé d'évaluer l'efficacité des formulations à base d'ITZ sous forme amorphe sans phospholipides dans un modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive (API) que nous avons développé.

Nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence un effet thérapeutique de l'administration des poudres sèches administrées dans ce modèle murin neutropénique d'API. Nous justifions ce manque d'activité par une agressivité du modèle trop prononcée et

par l'impossibilité de pouvoir administrer de manière plus fréquente le traitement par inhalation en raison de l'anesthésie nécessaire pour la procédure d'administration endotrachéale. Toutefois, des essais complémentaires vont être envisagés (modification de la charge fongique, administration des poudres par une tour d'inhalation, optimisation du dosage et de la fréquence d'administration). En revanche, il a été mis en évidence que l'administration prophylactique (début des administrations 2 jours avant l'infection) d'une dose de 5 mg/kg/48h d'une DS d'ITZ amorphe augmentait significativement le taux de survie de 12 jours après l'infection par *A. fumigatus* comparativement aux animaux non traités (taux de survivants : 50 % vs 0 %). A titre de comparaison, le pourcentage de survie obtenu après prophylaxie quotidienne d'une dose de 12,5 mg/kg/12h de solution orale de VCZ (la thérapie recommandée pour l'API) n'était que de 25 %.

En conclusion, les DS d'ITZ destinées à être administrées par inhalation constituent une approche thérapeutique prometteuse dans le cadre de la prévention et du traitement de l'aspergillose pulmonaire.

SUMMARY

Pulmonary aspergillosis is still a critical disease in clinical practice. Conventional therapies consist of the oral or intravenous administration of antifungal compound. However, antifungal therapy has to be administered at a high dosage to maintain an efficient antifungal pulmonary concentration. The high systemic concentrations that are reached following high dose administration are often problematic because of the frequent appearance of side effects as well as drug-drug interactions that are common when using different classes of antifungals. An interesting therapeutic administration alternative could be the pulmonary route. It should allow antifungals to be localized directly at the site of infection, while at the same time minimizing plasmatic concentration.

To explore this route further, we aimed to develop an itraconazole (ITZ) based dry powder inhaler (DPI). The formulation strategy for a DPI including an active ingredient such as ITZ involves several specific considerations. The formulation should be characterized by a suitable aerodynamic particle size distribution for achieving effective lung deposition after dose actuation from an inhaler device. More precisely, the DPI deposition profile has to be considered in relation to the aerodynamic diameter (d_{ae}) of the potentially inhaled conidia. Indeed, the d_{ae} of the conidia will determine their deposition site in the lung and therefore the fungal germination and infiltration sites. ITZ is a poorly water-soluble active ingredient classified in class II of the Biopharmaceutical Classification System, and its dissolution rate is a limiting factor for its efficacy (e.g. excessive uptake of undissolved drug by macrophages) and safety (local irritation and inflammation) when administered through the pulmonary route. For these reasons, the formulation design should include a pharmaceutical strategy to improve drug dissolution and solubility. However, enhancing drug solubilization ability through formulation generally requires the use of inactive ingredients that are not well-tolerated by the lung. For this reason we preferred to modify the physical state of the ITZ to improve its solubilization instead of using a more classical approach.

The first formulation approach developed was to form a solid dispersion (SD) between the ITZ in an amorphous state and a matrix-forming agent by spray-drying a solution containing both agents in dissolved state. SDs of mannitol and ITZ were then produced and fully characterized. We observed by powder X-ray diffraction (PXRD) and differential scanning calorimetry (DSC) that ITZ and mannitol were obtained in amorphous and crystalline state, respectively, after the spray-drying step. The DPI aerodynamic

behavior of the SDs was evaluated using multi-stage liquid impinger (MsLI), as recommended by the European Pharmacopoeia. Such compositions, when spray-dried under optimal conditions, allowed us to obtain dry powders with the size characteristics (median diameter < 5 microns, measured by laser diffraction) and aerodynamic properties suitable for pulmonary administration through a DPI (the fine particle fractions – FPF - determined during impaction tests were between 40% and 70%). It was necessary to include mannitol in the formulation of the SDs to increase and accelerate the solubility and dissolution profile of the ITZ. For instance, micronized crystalline ITZ or amorphous ITZ spray-dried alone exhibited a maximum saturation solubility below 10 ng/ml (measured in phosphate buffer containing 0.02% dipalmitoyl phosphatidyl choline at 25°C), while the formation of an SD with mannitol allowed the measured solubility to be increased to 450 ng/ml. We showed that the use of a polymeric surfactant (in this case, tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate, TPGS) accelerated the ITZ dissolution profile. However, the use of this surfactant reduced the formulations' aerodynamic performance. Since ITZ dissolution profile acceleration could be advantageous after pulmonary administration, we considered another type of surfactant, a hydrogenated soybean lecithin. The use of this surfactant allowed the formulations' aerodynamic performance to be improved while accelerating the ITZ dissolution profile. An increase in the formulations' phospholipid (PL) concentration was correlated with ITZ dissolution profile acceleration. In addition, ITZ solubility was significantly improved in the presence of PL with, for example, an ITZ concentration of 1 342 ng/ml (vs < 10 ng/ml for the unformulated ITZ) from the formulation containing 35% (w/w_{powder}) ITZ and 10% PL expressed relative to ITZ content.

The second formulation concept aimed to form dried mannitol microparticles in which ITZ crystalline nanoparticles (NP) were dispersed. An ITZ nanosuspension (median diameter < 250 nm) was produced by high pressure homogenization (HPH). A determined quantity of this suspension was then resuspended in a solution of mannitol and spray-dried to retrieve dried particles. We then evaluated the influence that the addition of mannitol and sodium taurocholate had on NP size and aggregation state after the spray-drying step. It was observed that the addition of mannitol appeared to be necessary to minimize NP aggregation after the spray-drying step and was therefore required to produce supersaturated solutions of ITZ (ITZ maximum solubility measured at 96 ng/ml in the

phosphate buffer mentioned above). The crystallinity of ITZ NP was confirmed by PXRD and DSC. This type of formulation showed sizes and aerodynamic performance consistent with pulmonary delivery (particle size < 5 microns and FPF between 35% and 46%, respectively). However, compared to the amorphous ITZ SD described above, the NP-based formulations were less efficient. Indeed, NP-based dried formulations exhibited lower FPF than those obtained with the SD (FPF ~ 30% for NP-based formulations vs ~ 70% for amorphous ITZ SD); their ability to form supersaturated solutions in the phosphate buffer simulating pulmonary fluid was also considerably lower (~ 100 ng/ml vs > 1 000 ng/ml for the best SD). Furthermore, to produce the nanosuspension, a minimum of 300 cycles of homogenization was required. This long homogenization procedure is a significant disadvantage in terms of economic performance if there is industrial scaling up compared to the single spray-drying step necessary to manufacture the SD. For these reasons, only the amorphous ITZ SDs were evaluated *in vivo*.

The second part of this project consisted of the evaluation of the amorphous ITZ SD in a biological system, the mouse. We first conducted a pharmacokinetic (PK) study after pulmonary administration to evaluate the effect of: (i) increasing ITZ solubility as observed during the *in vitro* characterization and (ii) the addition of PL to the SD. Based on the results, we undertook an activity study aiming to examine the effectiveness of our formulation in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis (IPA) and to compare its activity with a standard orally administered voriconazole (VCZ) therapy. To perform these studies, we first had to validate the selected administration device, a dry powder endotracheal insufflator for mouse (DP-4M[®], Penn Century, Wyndmoor, USA). The first objective of the validation was to determine whether the particle size range generated during powder insufflation of our formulations allowed the particles to be homogeneously distributed in the lungs and to penetrate as far as the alveoli. The second objective was to highlight the parameters that could influence reproducibility in the lung doses generated after insufflation, which is a determinant factor during the kind of preclinical studies we planned to carry out.

Based on the observations made during the validation procedure, we undertook a PK study. Three ITZ DPI were prepared by spray-drying a mannitol solution in which the ITZ was in suspension (F1) or was in solution without (F2) or with phospholipids (PL) (F3). These DPI were endotracheally insufflated *in vivo* at a single dose of 0.5 mg/kg for PK profile (lung and

plasma concentrations) determination in ICR CD-1 mice. ITZ was crystalline in F1 and amorphous in formulations F2 and F3. The amorphous nature of ITZ in the F2 and F3 formulations allowed the *in vitro* formation of an ITZ supersaturated solution with a maximum solubility of 450 ± 124 ng/ml (F2) and 498 ± 44 ng/ml (F3), in contrast to formulation F1 (< 10 ng/ml). As a result of these higher solubilities, absorption into the systemic compartment after endotracheal administration was faster for formulations F2 and F3 (shorter t_{\max}) and in larger quantities compared to the F1 formulation (t_{\max} of 60 min, 30 min and 5 min, and plasmatic AUC_{0-24h} of 182 ng.h/ml, 491.5 ng.h/ml and 376.8 ng.h/ml for F1, F2 and F3, respectively). PL increased the systemic bioavailability of ITZ (determined by the AUC_{plasma} to AUC_{lung} ratio) as a consequence of their wetting and absorption enhancement effect. ITZ lung concentrations after pulmonary administration remained higher than the targeted dose, based on the minimal inhibitory concentrations for *Aspergillus Fumigatus* ($2 \mu\text{g/g}_{\text{wet lung}}$) 24 h post-administration for both F1 and F2 formulations. However, this was not the case for formulation F3, which exhibited a faster elimination rate from the lung, with an elimination half-life of 4.1 h vs 6.5 h and 14.7 h for F1 and F2, respectively. For this reason, we decided to evaluate the efficacy the ITZ amorphous SD without PL in a murine model of IPA.

We were not able to demonstrate a therapeutic activity (pulmonary administration after infection) of the amorphous ITZ SD pulmonary administration in a neutropenic murine model of IPA. We justify this lack of activity by the fact the model's virulence was too pronounced and by the inability to administer inhalation treatment more frequently because of the necessity to anesthetize the animals before the procedure. However, additional tests will be considered using inhalation tower for powder administration (optimization of dosage and frequency of administration). Nevertheless, we demonstrated that prophylactic administration (treatments beginning 2 days before infection) of an amorphous ITZ (5 mg/kg/48 h) significantly increased the survival rate at 12 days after infection with *A. fumigatus* compared to untreated animals (survival rate: 50% vs 0%). In contrast, the percentage survival obtained after a prophylactic daily dose of 12.5 mg/kg/12 h oral solution of VCZ (recommended therapy for IPA) was only 25%.

In conclusion, amorphous ITZ SDs for inhalation are a promising new therapeutic approach in the prevention and treatment of pulmonary aspergillosis.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

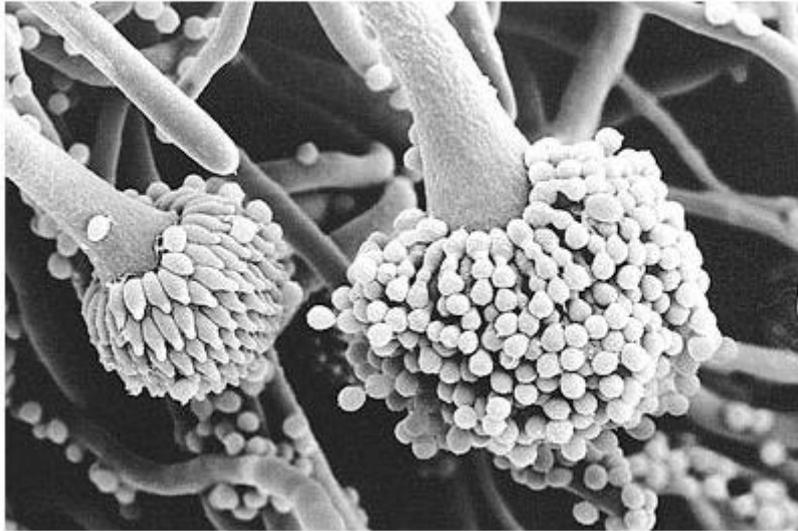


Figure 1: Photographie de microscopie électronique à balayage d'une culture d'*Aspergillus fumigatus*. Les filaments visibles correspondent au mycélium tandis que l'amas de petites perles correspond aux conidies [1].

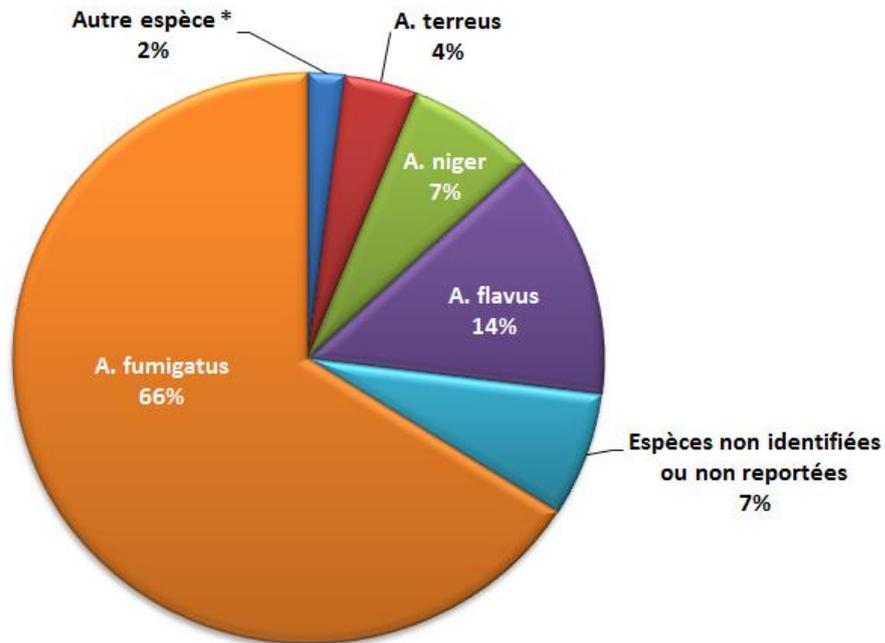
1. L'ASPERGILLOSE

Les champignons microscopiques présents dans la nature peuvent être responsables de pathologies aux gravités variées. Parmi, les plus courantes et les moins graves, nous retrouvons les dermatophytoses telles que les teignes, les onychomycoses, les épidermophyties circinées et les candidoses superficielles. Les pathologies les plus graves (infections invasives et systémiques) sont causées majoritairement par les espèces du genre *Candida* (les candidoses), *Cryptococcus* (les cryptococcoses) et *Aspergillus* (les aspergilloses). Dans le cadre de ce travail, nous aborderons une méthode de traitement alternative de l'aspergillose pulmonaire.

1.1. L'Aspergillus

L'Aspergillose fait référence au spectre de pathologies causées par l'*Aspergillus*, une moisissure appartenant à la classe des ascomycètes qui, avec les *Penicillium*, forment la classe des *Aspergillacea*. L'*Aspergillus* a été décrit la première fois en 1729 par un prêtre et biologiste, Pier Antonio Micheli, et tire son nom de sa ressemblance avec un aspersoir (= aspergillum ; **Figure 1**). Les *Aspergillus* sont des moisissures ubiquitaires présentes dans l'atmosphère avec des recrudescences automno-hivernales. Elles prolifèrent facilement dans les lieux humides tels que les climatiseurs et les humidificateurs ou encore sur les débris végétaux (engrais, légumes, fruits, confitures,...).

L'*Aspergillus* se reproduit par la production de spores, via des cycles sexués et asexués [2], qui se propagent dans l'air pour ensuite germer dans les conditions de température et d'humidité optimales pour donner naissance à un hyphes (structures filamenteuses ramifiées multicellulaires ou mycélium). De l'hyphes sont alors formés les canaux conidiophores qui produisent les spores qui permettront d'entamer un nouveau cycle de reproduction. Ces spores de petite taille (1.9 à 6 µm selon l'espèce d'*Aspergillus* et selon les méthodes d'échantillonnage et d'étude les évaluant [3-5]) sont capables de rester en suspension dans l'air pendant un certain temps et sont responsables des contaminations humaines. Les portes d'entrée pour ces spores incluent le système respiratoire, les lésions cutanées comme, par exemple, les plaies opératoires et les brûlures, la cornée et les oreilles. Cependant, une grande majorité (> 50 %) des pathologies engendrées chez les patients par



* A. nidulans (n=1), A. versicolor (n=2), A. oryzae (n=1), A. glaucus (n=1)

Figure 2: Fréquence des espèces majoritaires observées en cas d'aspergillose invasive chez 595 patients atteints de pathologies diverses. 56 % des aspergilloses invasives déclarées étaient pulmonaires [6].

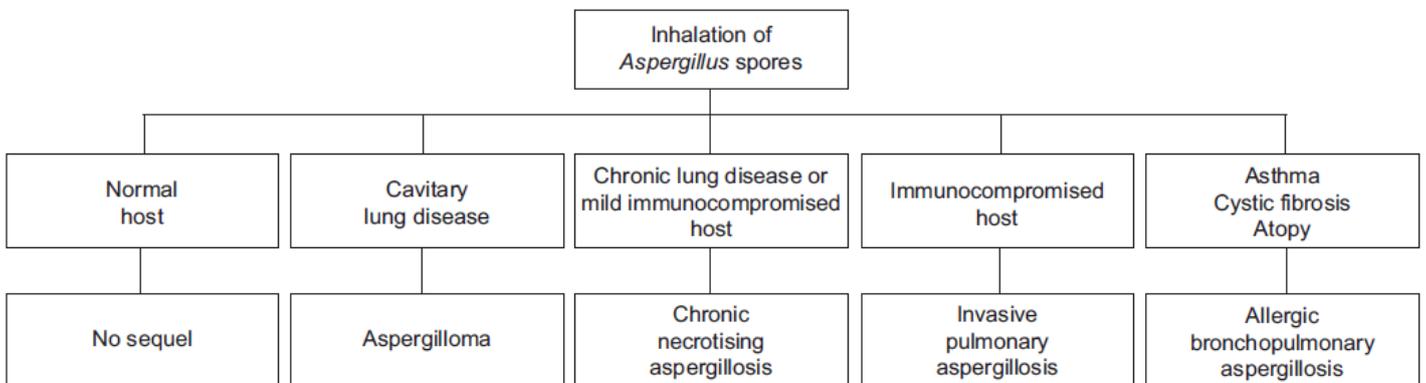


Figure 3: Illustration des différentes manifestations pathologiques pulmonaires possibles consécutives à l'inhalation de spores d'*Aspergillus* ainsi que les facteurs prédisposants majeurs associés à ces pathologies [7].

l'*Aspergillus* sont d'ordre respiratoire et touchent l'arbre trachéo-bronchique [8, 9], il s'agit dès lors d'aspergillose pulmonaire. Au vu de leur taille, les spores sont capables de pénétrer profondément dans le poumon, jusqu'aux bronchioles et à l'espace alvéolaire (section 2.2). Il est estimé qu'en moyenne un homme inhale jusqu'à 200 spores par jour [10]. Malgré approximativement 250 espèces classifiées comme faisant partie de la famille des *Aspergillus* [2], seule une minorité d'espèces engendre des pathologies chez l'homme et l'animal. A titre d'exemple (**Figure 2**), l'*A. fumigatus*, l'*A. flavus* et l'*A. niger* sont représentatives de plus de 80 % des infections d'aspergillose invasive [6, 11, 12].

1.2. L'aspergillose pulmonaire : différentes manifestations

La manifestation clinique de l'aspergillose pulmonaire se fera sous différentes formes suivant les prédispositions d'ordre physiologique, anatomique et immunologique d'un patient donné. Chez un patient sain dont l'immunité est normale, les spores inhalées puis déposées dans le poumon qui ne seront pas éliminées par l'escalator mucociliaire seront prises en charge par:

- les macrophages alvéolaires capables de les reconnaître et de les phagocyter,
- les substances antimicrobiennes présentes et secrétées au niveau de l'épithélium pulmonaire chargées d'activer le complément, d'agglutiner les spores et d'augmenter le phénomène de phagocytose,
- et enfin, l'immunité cellulaire (comme les neutrophiles) issue de la réaction pro-inflammatoire engendrée.

Tous ces mécanismes seront dès lors capables d'induire l'élimination des spores ayant pénétré dans le poumon, ce qui n'engendrera en principe aucune pathologie [10]. Les hyphes issues des spores ayant échappé aux défenses immunitaires de première ligne seront, quant à elles, la cible des neutrophiles qui seront capables de restreindre leur développement et à terme de les éliminer [13, 14]. Cependant, en cas d'anomalie immunitaire ou de terrain bronchique particulier, le scénario peut dramatiquement changer en prenant un aspect pathologique. Le spectre de pathologies pulmonaires engendrées par l'*aspergillus* comprend, l'aspergillome, l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), l'aspergillose pulmonaire chronique (APC) ou aspergillose subaiguë et l'aspergillose pulmonaire invasive (API). La **Figure 3** reprend ces différentes maladies ainsi que les facteurs

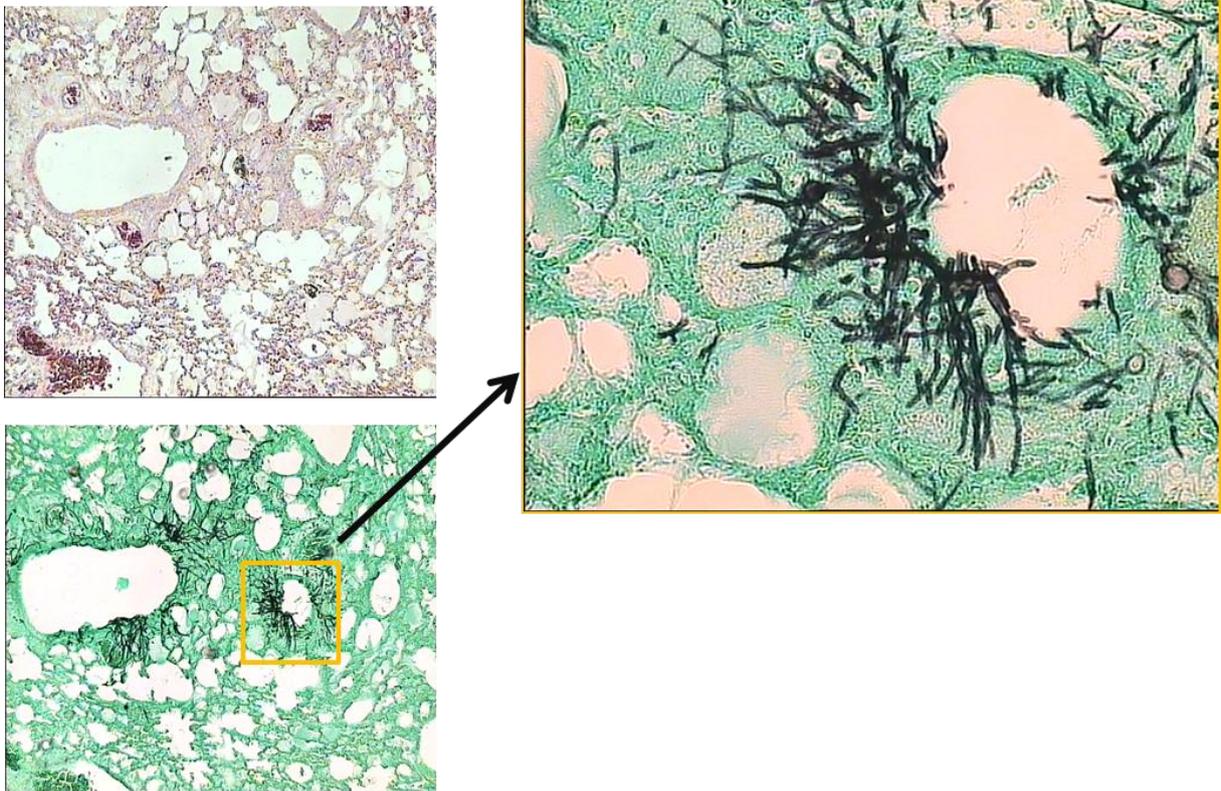


Figure 4 : Photographies prises par microscopie optique (grandissement 50x et 200x) sur des coupes histologiques de poumons de souris infectés par *A. fumigatus* lors de l'élaboration d'un modèle d'API (chapitre 7). Deux types de colorations histologiques ont été appliqués aux sections. La première (en haut à gauche ; Haematoxilline-Eosine) permettant de visualiser les structures cellulaires, l'autre (Grocott-Méthamine Silver Stain) permettant de colorer les tissus en vert et les lésions d'*Aspergillus* spécifiquement en noir. L'agrandissement montre clairement l'hyphe d'aspergillus progressant massivement par ramification dichotomique.

qui y sont associés. Parmi les facteurs prédisposant à une pathologie pulmonaire aspergillaire, nous retrouvons : l'immunodéficiency, les pathologies pulmonaires chroniques (ex : broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), mucoviscidose, asthme sévère,...), les pathologies pulmonaires cavitaires (ex : cavité tuberculeuse) et l'hyper réactivité immunologique [7].

1.2.1. L'aspergillose pulmonaire invasive

L'API est une forme extrêmement grave de l'aspergillose pulmonaire qui se déclare chez les personnes présentant une déficiency importante du système immunitaire. Le poumon rassemble les conditions d'humidité et de température adaptées à la germination des spores inhalées. De ce fait, en l'absence de mécanismes de défense efficaces permettant de les éliminer, les spores donneront naissance à l'hyphe. Suivant le type et l'importance de l'immuno-suppression que l'hôte présente, l'hyphe va se développer, infiltrer les tissus pulmonaires et gagner du terrain (**Figure 4**). La neutropénie sévère (< 500 cellules/ μ L de sang) est une raison majeure liée à la prolifération massive du champignon dans les poumons et donc au développement d'une API [15]. Le développement des hyphes ne sera dans ce cas plus du tout freiné. Le tissu pulmonaire va être rapidement et massivement envahi par le champignon, provoquant d'importantes thromboses et foyers hémorragiques. Le champignon aura tendance à se disséminer vers d'autres organes comme le foie, les reins, le cerveau et le cœur dû à un tropisme vasculaire très prononcé. La dissémination peut aussi se faire par contact de tissu à tissu, comme par exemple du poumon vers le cœur quand le foyer d'infiltration se situe dans le péricarde. Une fois le stade disséminé atteint, malgré les thérapies antifongiques pouvant être envisagées, le taux de survie est inférieur à 10 % [6]. A l'inverse, en cas de neutropénie légère à modérée (1500 à 500 cellules/ μ L de sang) ou d'immunosuppressions non neutropéniques telles que celles induites par administration de corticostéroïdes à hautes doses, les neutrophiles pourront encore être recrutés et, dans une certaine mesure, limiter l'invasion, mais cela engendrera de nombreux symptômes inflammatoires, foyers nécrosés et lésions pulmonaires. Dans ce cas de figure, la réponse inflammatoire exacerbée et la perte de la fonction respiratoire sont généralement considérées comme étant les causes de la mort, contrairement à la croissance fongique incontrôlée et aux séquelles de la dissémination observées en cas de neutropénies sévères.

Prolonged neutropenia (<500 cells·mm⁻³ for >10 days)
 Transplantation (highest risk is with lung transplantation and HSCT)
 Prolonged (>3 weeks) and high-dose corticosteroid therapy
 Haematological malignancy (risk is higher with leukaemia)
 Chemotherapy
 Advanced AIDS
 Chronic granulomatous disease

HSCT: haematopoietic stem-cell transplantation.

Figure 5 : Table reprenant les facteurs de risque classiques prédisposant à l'API [7].

Table 1. Overview of prospective clinical trials on IA that were performed in compliance with the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group standards as effective in the respective publication year

Drug	Publ. year	Total daily MD	Eligible subjects n	Salvage therapy %	Allo-TX %	Data analysis	Diagnosis proven %	Remission complete/partial %	Mortality crude/IA-attributed, %	Discontin., %
D-AmB [27]	2002	1–1.5 mg/kg	133	0	27	MITT	31	17/15 (10 days) ¹	42/NA	NA
ABCD [20]	2002	6 mg/kg	88	0	49	ITT	31	6/7 (13 days)	52/40	22
L-AmB [25]	1998	4 mg/kg	46	0	11	ITT	26	2/52 ² (19 days)	67/20 ³	2
L-AmB [25]	1998	1 mg/kg	41	0	17	ITT	20	17/41 ² (18 days)	59/22 ³	4
L-AmB [26]	2007	3 mg/kg	107 ⁴	0	16	MITT	7	50 ⁵ (14 days)	29/NA	13
VRC [27]	2002	8 mg/kg i.v.	144	0	32	MITT	47	21/32 (77 days) ¹	29/NA	'seldom'
VRC [28]	2002	6 mg/kg i.v.	116	48	25	ITT	41	14/34 (approx. 90 days)	38/NA ⁶	4
ITC [29]	2001	200 mg i.v.	31	45	10	ITT	13	10/29 (98 days)	19/NA	16
PSC [30]	2007	800 mg p.o.	107	100	56	MITT	100	7/36 (56 days)	NA	'rare'
CPF [31] ⁷	2009	50 mg	61	0	0	MITT	2	2/31 (15 days)	47/30	0
CPF [32] ⁷	2010	50 mg	24	0	100	MITT	0	0/42 (24 days)	50/21	0

The trials included 74–100% pulmonary and/or paranasal sinus infections and were comparable in study endpoints. ABCD = AmB colloidal dispersion; VRC = voriconazole; CPF = caspofungin; publ. year = publication year; MD = maintenance dose; Allo-TX = proportion of subjects with allogeneic haemopoietic stem cell or solid-organ transplantation; discontin. = discontinuation; (M)ITT = (modified) intention-to-treat analysis; NA = not available; remission = values for evaluable patients at the end of therapy (the median duration of study therapy is given in parentheses); Mortality: assessed at 12 weeks, 'IA-attributed' refers to IA as sole

cause of death; discontinuation of therapy for adverse events probably or possibly related to the study drug; i.v. = intravenous administration for at least 7 days, completion of therapy with oral standard doses.

¹ Assessment at 12 weeks. ² Radiographic response only. ³ Mortality at 6 months. ⁴ Including ≤4 cases with infections due to *Zygomycetes* and *Phaeoacremonium* spp. ⁵ Complete or partial response. ⁶ Value for the proportion of patients (52%) treated with VRC as first-line therapy. ⁷ Single study with two strata separately published.

Figure 6: Résumé des essais cliniques évaluant ou comparant l'efficacité de traitements à l'égard de l'aspergillose invasive qui ont été effectués en conformité avec la "European Organization for Research" et le "Cancer/Mycoses Study Group" présentant des critères d'évaluation comparables [16].

Les principales pathologies, associées à une immunodéficience, augmentant les chances de développer une API sont reprises et classées par ordre d'importance dans la **Figure 5** [7, 15]. La neutropénie sévère est placée en première position. Le risque de développer une API augmente avec l'intensité, mais également avec la durée de la neutropénie. Chez ces patients, le risque d'API augmente d'1 % par jour durant les trois premières semaines et ensuite de 4 % les jours suivants [17]. Un autre groupe fortement à risque est celui des patients subissant une transplantation d'organe solide (particulièrement après une transplantation de poumon ou de cœur) et de cellules souches hématopoïétiques, principalement dû à la neutropénie induite avant la greffe et aux immunosuppresseurs administrés pour éviter les rejets. La corticothérapie à haute dose est également un facteur prédisposant par ses effets immunosuppresseurs et modulateurs sur les acteurs des fonctions immunes [18]. Toutes les formes de leucémie et de pathologie hématologique sont aussi des facteurs de risque étant donné les modulations de l'état immunologique des patients liés aux traitements ou aux maladies. Les patients atteints du VIH présentant un nombre amoindri de lymphocytes circulants ainsi que les patients sous chimiothérapie cytotoxique sont également des cibles potentielles de *Aspergillus* et donc susceptibles de développer la forme pulmonaire invasive.

L'API est encore, à l'heure actuelle, une cause fréquente de maladie infectieuse liée à la morbidité et mortalité des patients immunodéprimés et ce, malgré les moyens thérapeutiques disponibles (antifongique par administration IV et orale, section 1.3., **Figure 6**). Durant les trois dernières décennies, la tendance de la mortalité associée à l'API a augmenté de 357 % [19]. Comme l'aspergillose est un germe opportuniste, cette spectaculaire augmentation peut s'expliquer par le nombre croissant de patients immunodéficients qui sont aujourd'hui rencontrés dans la pratique clinique [20]. Le taux de mortalité consécutif à l'API, bien que très variable d'une population de malades à l'autre, est insatisfaisant et s'étend de 20 à 90 % suivant la catégorie de patients incriminée et le régime thérapeutique appliqué [8, 21, 22]. De par sa dangerosité et sa prévalence élevée [20], des mesures prophylactiques à l'égard de l'aspergillose (et des autres mycoses invasives) peuvent être considérées, si au moins un des facteurs de risque majeurs est rencontré (section 1.3.). Toutefois, le risque de sélectionner des souches résistantes repousse certaines institutions à implémenter un régime prophylactique systématique.

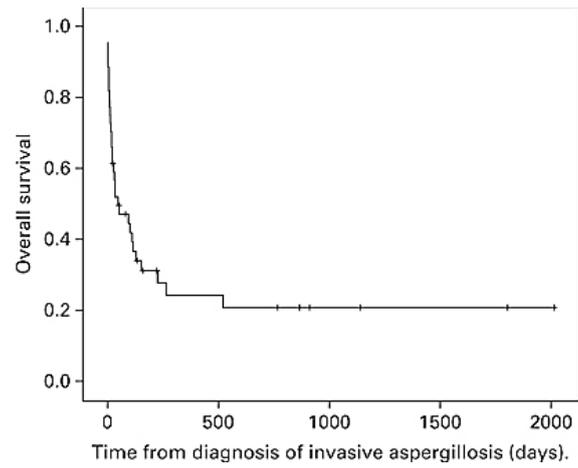


Figure 7: Probabilité de survie après le diagnostic d'aspergillose invasive chez 45 patients ayant reçu une transplantation de cellules souches hématopoïétiques (greffon allogénique ; 43/45 des aspergilloses invasives étaient pulmonaires [23]).

Malgré l'arsenal prophylactique utilisé, l'incidence des aspergilloses invasives, touchant dans plus de 2/3 des cas les poumons, reste considérablement élevée [8], avec par exemple une incidence de 2,3 à 15 % chez les patients recevant une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques [7], alors que le taux de survie associé consécutivement au diagnostic de l'aspergillose invasive dans ce type de population est en-deçà des 30 % (**Figure 7**).

Les manifestations cliniques de l'API ne lui sont pas spécifiques et se confondent généralement avec celles de la bronchopneumonie. Parmi ces symptômes, on retrouve la fièvre persistante (> 96 h) ne répondant pas à l'antibiothérapie classique, la toux, les expectorations abondantes et la dyspnée [24]. Les patients peuvent aussi présenter des douleurs thoraciques durant la respiration (en raison de l'invasion vasculaire conduisant à des thromboses qui causent de petits infarctus pulmonaires) et de l'hémoptysie généralement légère mais qui peut être également sévère. La non-spécificité des symptômes retarde généralement l'établissement d'un diagnostic précis. Outre ce manque de spécificité symptomatique, les outils diagnostiques de biologie clinique spécifiques ne sont pas encore unanimement bien définis ou seulement en voie de développement ou en cours d'intégration dans les algorithmes diagnostiques établis [22, 25]. De ce fait, les API diagnostiquées le sont souvent à un stade invasif prononcé ce qui décroît considérablement la probabilité de survie des patients atteints, car la progression de ce champignon chez un immunodéprimé peut être terriblement rapide, par exemple, de 7 à 15 jours depuis le début de l'infection jusqu'à la mort [26].

1.2.2. L'aspergillose pulmonaire chronique (APC)

La définition de l'APC a été proposée et décrite sous différentes déclinaisons, étant donné le large éventail de données cliniques, radiologiques et d'entités anatomopathologiques observées. Durant la dernière décennie, un consensus est apparu, décrivant l'APC comme se manifestant sous deux formes particulières, l'aspergillose chronique nécrosante (ACN) et l'aspergillose chronique cavitaires (ACC). De manière générale, l'APC est un processus lent et destructeur du poumon dû à l'invasion d'un aspergillus et de l'intensité de la réaction inflammatoire qui en résulte. L'ACN cause une destruction progressive du tissu pulmonaire alors que l'ACC cause de multiples cavités dans

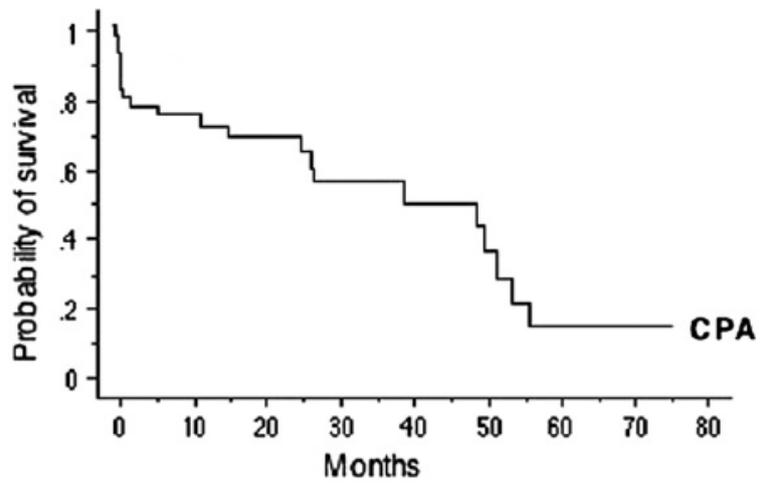


Figure 8 : Courbe de survie (n=42) à partir du diagnostic de l'APC [27].

le parenchyme pulmonaire (avec ou sans formation d'une truffe aspergillaire, section 1.2.3). L'APC se développe chez des patients d'âge moyen à avancé présentant une pathologie pulmonaire chronique sous-jacente pouvant modifier la clairance mucociliaire, l'architecture pulmonaire et pouvant nécessiter une administration de glucocorticoïdes comme dans le cas d'une BPCO, une tuberculose inactive, une mucoviscidose ou plus rarement une sarcoïdose [28]. L'APC touche également les populations dont l'immunité est faiblement atténuée consécutivement, par exemple, au diabète sucré, à l'alcoolisme, à une maladie chronique du foie, à de faibles doses de corticoïdes, au sida, à la malnutrition, à des maladies des tissus conjonctifs comme la polyarthrite rhumatoïde et la spondylarthrite ankylosante ou également après une radiothérapie [29]. L'APC se manifeste par de la fièvre, de la fatigue, des malaises, une perte de poids accompagnée de toux productive s'étalant sur la durée (plusieurs mois) [30]. L'hémoptysie modérée à sévère peut également apparaître. Une diminution progressive de la capacité respiratoire est généralement observée consécutivement à la destruction de la structure pulmonaire. La mortalité rapportée de l'APC est évaluée à un taux de 10 % à 39 % endéans les 2 ans [7] et de 50 % sur une période de 5 ans [31] avec une probabilité de survie décroissante en deçà de 0,2 ; comme cela a été récemment évalué dans une étude clinique (**Figure 8**) [27].

A l'inverse de l'API et sauf rare exception, l'APC n'envahit pas les vaisseaux sanguins et ne se dissémine pas vers d'autres organes, mais reste localisée dans le poumon. Toutefois, de plus en plus de rapports cliniques mentionnent l'apparition d'API chez des patients immunocompétents ne présentant pas les facteurs de risque classiques. Ces cas sont majoritairement rapportés comme se déclarant spécifiquement dans deux grandes populations : les patients dans un état critique généralement intégré aux soins intensifs et les patients atteints de bronchite chronique obstructive sévère. Dans ces catégories de patients, l'APC peut, sous certaines conditions, prendre un aspect invasif [32], par exemple consécutivement à un affaiblissement immunitaire ponctuel dû à la maladie ou à un mauvais état général. Dans ces conditions, elle présente une pathogénicité également dévastatrice avec des taux de mortalité pouvant excéder les 90 % [33].

1.2.3. L'aspergillome

Un aspergillome consiste en la colonisation par *l'Aspergillus* d'une cavité pulmonaire préexistante. Les cavités pulmonaires sont propices à la germination des spores, étant donné leur faible taux de drainage et les conditions de température et d'humidité optimales au développement de ce champignon. Dans cette cavité, se forme une masse (= truffe aspergillaire) composée de mycéliums fongiques, de cellules inflammatoires, de fibrine et de mucus. Cette masse peut atteindre 3 à 5 cm de diamètre [34]. Les cavités colonisées le sont, dans la majorité des cas, consécutivement à la tuberculose [35] et, à moindre incidence, préformées suite à une sarcoïdose ou une bronchectasie [34]. Dans ce type de colonisation, l'aspergillose reste localisée et n'envahit pas le parenchyme pulmonaire. Ce type d'infection peut être asymptomatique ou se manifester par des hémoptysies d'intensité variable causées par l'activation du système immunitaire inné générant des réactions inflammatoires ainsi que par l'invasion locale des vaisseaux sanguins qui tapissent la cavité et le frottement mécanique entre les vaisseaux sanguins et l'aspergillome [10, 36]. Un aspergillome reste au cours du temps généralement stable. Dans environ 10 % des cas, il peut diminuer ou disparaître spontanément sans traitement et à l'inverse, dans de rares cas, augmenter de taille [37]. Les autres symptômes comprennent la toux chronique et la dyspnée pouvant être liées à la maladie pulmonaire sous-jacente. La fièvre est rare, sauf s'il y a une infection bactérienne secondaire [36]. L'incidence générale de l'aspergillome pulmonaire n'est pas connue, mais elle a été estimée entre 0,01 % à 0,02 % [34]. Le taux de mortalité à partir de l'hémoptysie varie de 2 à 16 % [15]. Toutefois, ce faible pronostic dépendrait plus de la pathologie sous-jacente que de l'aspergillome en lui-même.

1.2.4. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA)

L'ABPA est une réaction d'hypersensibilité (complexe) à des antigènes d'*Aspergillus* circulant dans le système pulmonaire suite, par exemple, à l'installation locale d'un petit foyer fongique consécutif à une surproduction de mucus, après l'apparition d'un aspergillome ou d'une APC. L'ABPA est surtout observée chez les patients souffrant d'asthme chronique ou de mucoviscidose. Il est estimé que 7 à 14 % des patients atteints d'asthme cortico-dépendants et environ 10 % des patients atteints de mucoviscidose répondent aux critères diagnostiques de l'ABPA [38-41]. Une méta-analyse de 21 études a

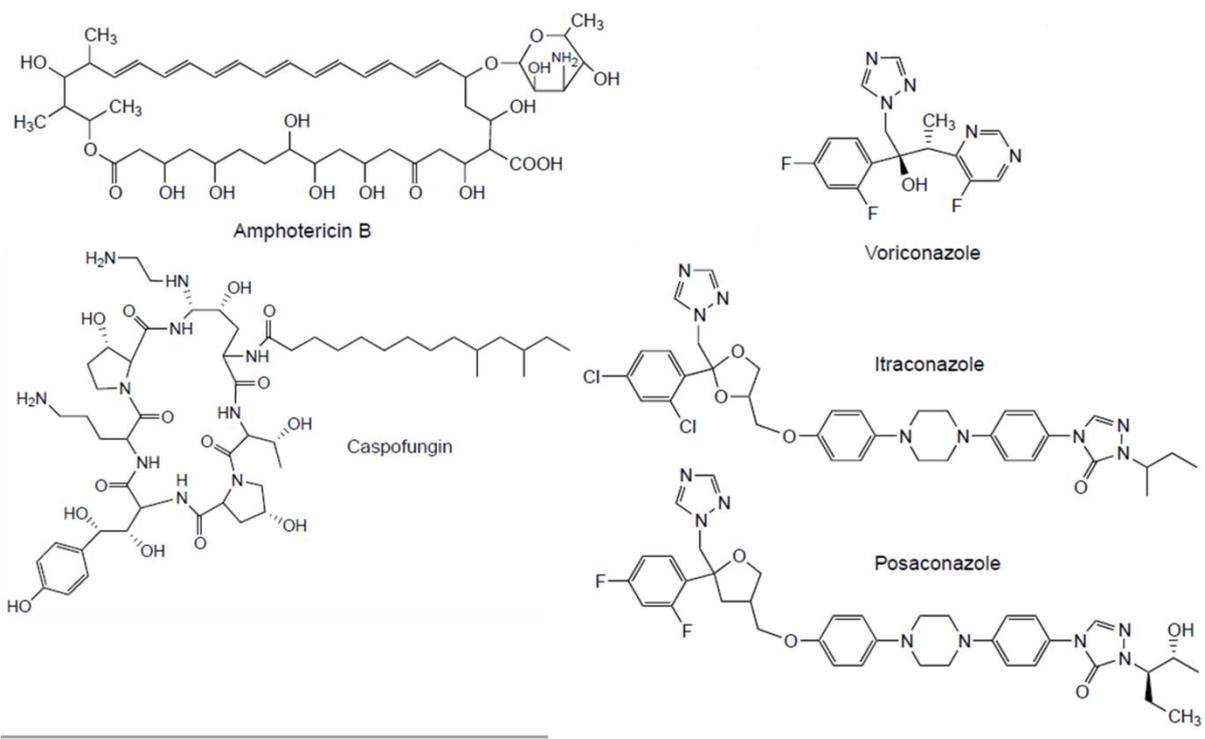


Figure 9 : Principes actifs enregistrés pour le traitement ou la prophylaxie de l'aspergillose pulmonaire.

montré que la prévalence de la sensibilisation aux antigènes d'*Aspergillus* chez des patients sélectionnés souffrant d'asthme a été de 28 % [42]. La sensibilisation aux antigènes d'*Aspergillus* semble gravement augmenter la sévérité de l'asthme. Dans une étude, sur 105 patients souffrant d'asthme, 28,5 % des patients ont été sensibilisés à des antigènes d'*Aspergillus* [43]. Environ un tiers de ce groupe répondait au critère de l'ABPA. La pathogénèse de l'ABPA n'est à ce jour pas tout à fait élucidée, bien que les terrains atopiques sont nettement plus favorables au développement d'une hypersensibilité aux antigènes de l'*aspergillus* [44]. Plusieurs mécanismes immunitaires semblent être impliqués dans l'hypersensibilisation aux antigènes d'*aspergillus* menant à l'ABPA. Une réaction d'hypersensibilité de type I et III médiée par les IgE et IgG ainsi que des anomalies dans la réponse des lymphocytes T semble être à l'origine de cette réponse immunitaire exacerbée menant au syndrome d'APBA. La toux, un état fébrile, des expectorations abondantes grasses et denses, des pneumonies récidivantes et une diminution progressive de la capacité respiratoire sont des manifestations possibles de l'ABPA.

1.3. Traitement de l'aspergillose pulmonaire

L'approche thérapeutique de l'aspergillose pulmonaire varie suivant le type de manifestation clinique et le scénario rencontré (pathologie sous-jacente, co-médication, facteurs individuels). La chirurgie peut, dans certains cas, être envisagée pour, par exemple, retirer un foyer fongique très localisé ou qui risque de se disséminer, ou bien pour simplement limiter les saignements engendrés par les lésions aspergillaires. Sinon, l'administration d'antifongique par voie orale ou systémique est l'action thérapeutique recommandée.

1.3.1. Les antifongiques utilisés dans l'aspergillose pulmonaire : classification, mode d'action et voies d'administrations

Les antifongiques utilisés en clinique pour traiter ou prévenir les aspergilloses pulmonaires font partie de 3 grandes familles d'actifs: les polyènes (amphotéricine B - AmpB-), les triazolés (voriconazole -VCZ-, posaconazole -PSZ-, itraconazole -ITZ-) et les échinocandines (caspofungine -CSP-, micafungine -MCF-, anidulafungine) [21, 22]. Leurs

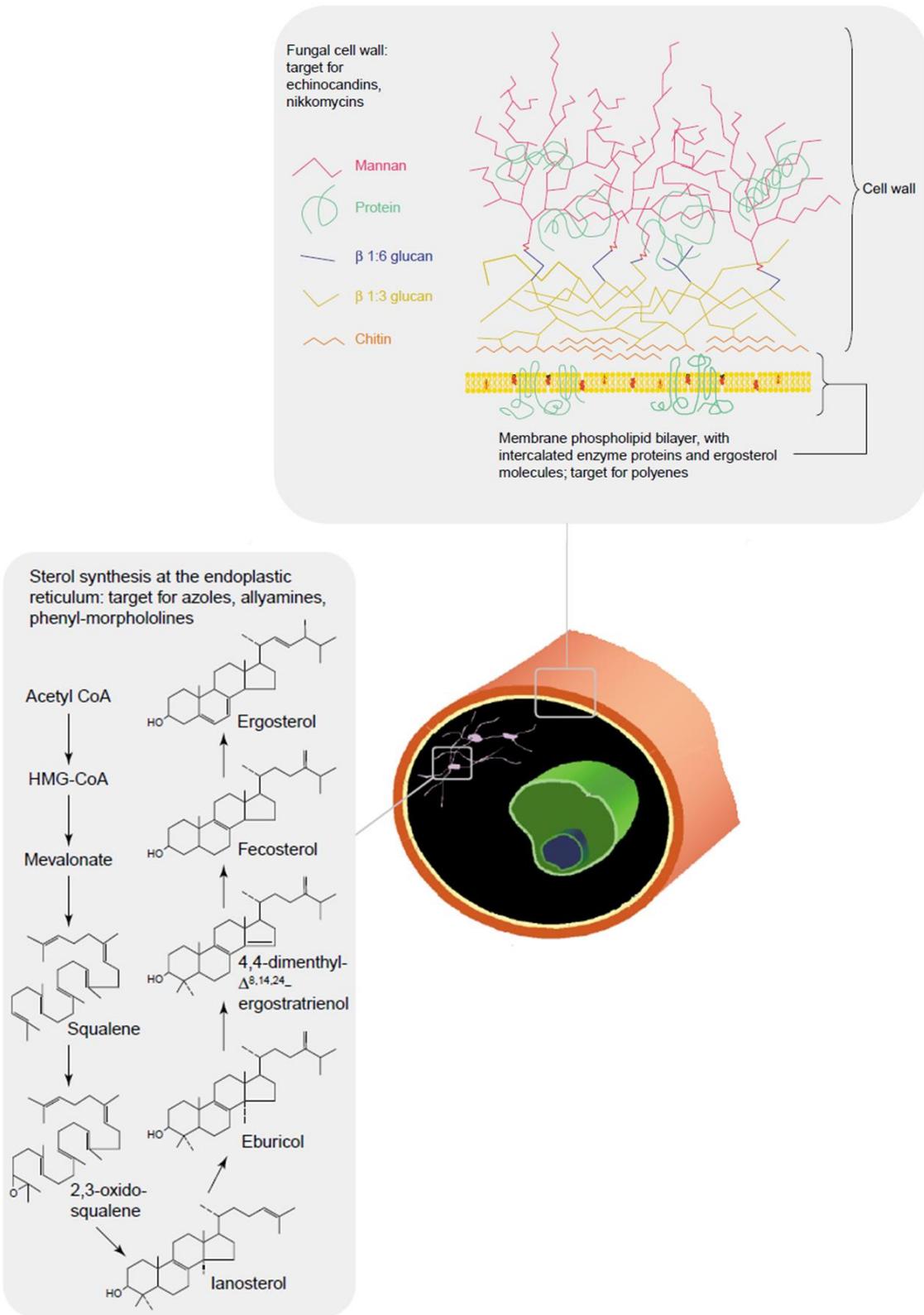


Figure 10: Cibles pharmacologiques des différentes classes d'antifongiques utilisés dans le traitement ou la prévention de l'aspergillose pulmonaire [45].

structures chimiques ainsi que leurs cibles pharmacologiques sont reprises dans les **Figures 9** et **10**.

L'activité antifongique spécifique des polyènes est basée sur une interaction avec les membranes fongiques qui est favorisée comparativement avec celles des membranes cellulaires des mammifères. En effet, les polyènes présentent une plus grande affinité pour l'ergostérol (stérols des membranes des champignons) que pour le cholestérol (stérols des membranes des mammifères), et d'autre part, les proportions ergostérols / PL des membranes fongiques sont plus élevées [46]. De par cette ressemblance, l'ergostérol rassemble les polyènes au niveau des membranes fongiques où plusieurs molécules forment alors des pores transmembranaires, les faces hydrophobes des molécules (la chaîne de doubles liaisons) étant tournées vers la membrane et les faces plus hydrophiles (la chaîne où sont greffés des groupements hydroxyles) vers le centre des pores. Ceci provoque des déséquilibres ioniques et des pertes de matériel cytoplasmique aboutissant à la lyse cellulaire [45]. Un seul polyène est utilisé dans le cadre de l'aspergillose pulmonaire, il s'agit de l'AmpB (**Figure 9**, [21]). L'AmpB n'est administrée que par voie IV, car elle n'est pas résorbée après administration orale. Cette molécule était initialement administrée par injection sous forme d'une dispersion micellaire contenant du déoxycholate de sodium comme agent solubilisateur. Dans le but de réduire la toxicité qu'il occasionne (section 1.4.1), des formulations lipidiques d'AmpB administrables par voie IV ont été développées. Il s'agit de formulations d'AmpB sous forme de liposome ou de complexe lipidique. Ces formulations permettent de réduire nettement les effets secondaires observés après administration de la formulation d'AmpB déoxycholate, mais ne les éliminent pas totalement [47].

Comme leur nom l'indique, les *triazolés* possèdent au moins un cycle triazole qui est responsable de leur activité antifongique. En effet, les azolés agissent par inhibition de la synthèse de l'ergostérol en empêchant l'activité de l' α -14 déméthylase fongique qui catalyse la déméthylation oxydative du lanostérol dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol (**Figure 10**, [45]). Cette inhibition est directement induite via l'interaction des azotes des cycles triazoles des principes actifs et de l'atome de fer situé au centre du noyau porphyrine localisé au niveau du site actif de l'enzyme. La « queue » de la molécule du principe actif interagit alors de manière spécifique suivant sa structure avec des sites

spécifiques de la protéine. Ces interactions inhibent l'activité enzymatique et donc la déméthylation du lanostérol. Cela conduit à une déplétion d'ergostérol dans les membranes fongiques et à son remplacement par des stérols méthylés en position 14. Ces modifications rendent les membranes fongiques plus fragiles et altèrent l'activité des enzymes membranaires, ce qui conduit à la mort et à l'inhibition de la réplication des cellules fongiques [45]. Il existe trois composés de cette classe enregistrés pour le traitement de l'aspergillose pulmonaire : l'ITZ, le VCZ et le PSZ (**Figure 9**). Le VCZ est très bien résorbé par voie orale (biodisponibilité absolue > 90 %) et est administré sous forme de comprimé pelliculé ou de suspension buvable. Il est également administré par voie IV sous forme de complexe formé avec du sulfobutyle éther bêta-cyclodextrine de sodium le rendant totalement soluble. L'ITZ n'est plus commercialisé en Belgique que par voie orale sous forme de gélule et sous forme de solution buvable. Les gélules contiennent des pellets de saccharose recouvert d'un mélange d'ITZ et d'hydroxypropylméthylcellulose recouvert de polyéthylène glycol. La solution buvable est formulée par complexation avec de l'hydroxypropyl- β -cyclodextrine. Une formulation IV existe également, mais n'est pas commercialisée en Belgique. Le PSZ, quant à lui, est administré sous forme de suspension buvable.

La classe des *échinocandines* est la plus récemment développée. Il s'agit de lipopeptides amphiphiles constitués d'un noyau hexa-peptidique cyclique lié à une chaîne latérale N-acyl à ramification variable (**Figure 9**). Le mode d'action de ces molécules réside sur l'inhibition non-compétitive de la synthèse des 1,3 β -glucanes qui sont des polysaccharides présents au niveau de la paroi cellulaire fongique (**Figure 10**). Avec les dérivés de chitines, les glucanes assurent la rigidité et l'intégrité de la membrane fongique. Mais elles assurent également différents rôles notamment du point de vue osmotique ainsi que lors de la division et de la croissance cellulaires. L'inhibition de leur synthèse constitue alors une cible importante à visée antifongique qui engendre une déstructuration et une perte de fonction de la paroi fongique résultant en la mort cellulaire. Parmi les différentes molécules développées et actives à l'égard des souches d'*Aspergillus*, seule la caspofungine est pour l'instant recommandée par voie IV dans le traitement de rattrapage de l'aspergillose pulmonaire [22, 48]. Elle est formulée sous forme d'un sel d'acétate constituant une poudre lyophilisée pour solution injectable.

Disease Manifestation	Treatment Recommendations	Comments
Invasive aspergillosis	<p>Primary therapy: intravenous voriconazole (6 mg/kg every 12 h for 1 d, followed by 4 mg/kg every 12 h) until improvement, followed by oral voriconazole (200 mg every 12 h) or oral itraconazole (400–600 mg/d) until resolution or stabilization of all clinical and radiographic manifestations</p> <p>OR</p> <p>intravenous liposomal amphotericin B (3–5 mg/kg/d) until improvement, followed by oral voriconazole (200 mg every 12 h) or oral itraconazole (400–600 mg/d) until resolution or stabilization of all clinical and radiographic manifestation</p> <p>Salvage therapy: intravenous caspofungin (70 mg Day 1 and 50 mg/d intravenously thereafter) or intravenous micafungin (100–150 mg/d) until improvement, followed by oral voriconazole (200 mg every 12 h) or oral itraconazole (400–600 mg/d) until resolution of disease</p> <p>OR</p> <p>posaconazole (200 mg four times per day initially, then 400 mg twice daily orally after stabilization of disease)</p>	<p>Follow up serum galactomannan level</p> <p>Reversal of immune suppression (neutropenia)</p>
Chronic necrotizing (“semi-invasive”) pulmonary aspergillosis	<p>For mild to moderate disease, voriconazole (200 mg every 12 h) or itraconazole (400–600 mg/d) until resolution or stabilization of all clinical and radiographic manifestations.</p> <p>If clinically severe consider beginning with either liposomal amphotericin B or intravenous voriconazole as described above for invasive disease.</p> <p>Consider surgical resection</p>	<p>Reversal of immunosuppression (corticosteroids)</p> <p>Rule out dissemination.</p>
Allergic bronchopulmonary aspergillosis	<p>Corticosteroids (doses and durations vary widely, with doses adjusted on level of airflow obstruction, eosinophilia, and levels of IgE)</p>	<p>Itraconazole (200 mg twice daily for 16 wk initially) has been used as a steroid-sparing agent</p>
Aspergilloma	<p>No indication for antifungal agents</p> <p>Bronchial angiography and embolization</p> <p>Surgical resection</p>	<p>Can become chronic progressive pulmonary disease or invasive if immunosuppression given (i.e., sarcoid, chronic obstructive pulmonary disease)</p>

Figure 11: Tableau récapitulatif des recommandations thérapeutiques de l’ « American Thoracic Society » [48].

1.3.2. Stratégies thérapeutiques recommandées

Un document récent publié par « l'American Thoracic Society » [48] ainsi qu'une guideline rédigée par l'« Infectious Disease Society of America » [22] regroupent et recommandent les actions thérapeutiques (et prophylactiques) de choix à entreprendre en cas d'aspergillose pulmonaire sur base des différents documents préalablement rédigés et des preuves cliniques disponibles. Les points suivants résument leurs positionnements en cas d'aspergillose pulmonaire. Les dosages et posologies idéaux sont repris dans la **Figure 11**.

1.3.2.1. L'aspergillose pulmonaire invasive

L'initiation d'un traitement antifongique chez des patients suspectés d'être atteints d'une API doit être entreprise au plus vite. Auparavant, l'AmpB était administrée en première intention. Cependant, la plus grosse étude clinique prospective randomisée dans le cadre de l'API (ayant pour but de comparer l'AmpB et le VCZ) a démontré le VCZ comme étant supérieur à son comparateur dans la thérapie primaire de l'aspergillose invasive [49]. Depuis, compte tenu de sa toxicité moindre et de cette supériorité démontrée, le VCZ est considéré comme le « gold standard » recommandé en thérapie primaire de l'API. Une dose de charge est généralement donnée pour pouvoir atteindre des taux plasmatiques suffisamment élevés (section 1.4.2.2). Le fait que le VCZ soit disponible sous deux formes (IV et orale) le rend encore plus attractif, étant donné la possibilité d'initier des doses plasmatiques importantes directement dès le début du traitement par administration IV et de poursuivre un traitement au long court par voie orale. Chez les patients étant à un stade avancé, l'administration IV est recommandée pour atteindre une concentration plasmatique suffisamment élevée sans devoir attendre les 5-7 jours nécessaires pour atteindre la concentration plasmatique à l'équilibre (« steady state ») [50]. Pour la thérapie de maintien, l'utilisation de l'ITZ peut également être envisagée. En cas d'intolérance par le patient ou d'inefficacité thérapeutique, les alternatives à considérer sont l'AmpB, la CSP, la MCF, le PSZ ou l'ITZ (**Figure 11**). Toutefois il est généralement recommandé de changer de classe thérapeutique en cas d'inefficacité. Aucune preuve clinique suffisamment solide n'a à ce jour été proposée concernant l'apport synergique que pourraient fournir les associations de classes d'antifongique [51], malgré que des cas de succès soient régulièrement rapportés [51, 52] et que l'association notamment d'un azolé et d'une échinocandine ait démontré une

synergie *in vitro* et *in vivo* sur des modèles précliniques d'aspergillose invasive [53-55]. La durée de la thérapie antifongique est difficile à déterminer précisément. Elle doit cependant durer jusqu'à l'éradication du champignon et la récupération de la fonction immunitaire, ce qui, chez les immunodéprimés, permet d'augmenter significativement les taux de succès thérapeutique [22]. Si le contexte le permet, la restimulation du système immunitaire par administration de « colony-stimulating factor » ou par réduction de la dose d'agents immunosuppresseurs parallèlement à l'entreprise d'une thérapie antifongique favorise le taux de guérison [22].

En termes de prophylaxie, on ne parlera pas de prophylaxie de l'API proprement dite, mais de prophylaxie globale à l'égard d'autres infections fongiques invasives comme, par exemple, les infections à *candida* et *cryptococcus*. Il est conseillé d'initier la prophylaxie dans les populations très fortement à risque (neutropénie prolongée, transplantation du poumon, greffe de cellules souches hématopoïétiques). Le PZC par administration orale semble être le traitement prophylactique de choix [56]. L'ITZ est également considéré comme efficace, mais sa toxicité, sa biodisponibilité orale erratique et ses nombreuses interactions médicamenteuses limitent son utilisation (section 4.2.1). Le VCZ peut également être envisagé [56]. Une prophylaxie dite « secondaire » peut être entreprise si un patient ayant, dans son passé, présenté une infection invasive à *aspergillus* subit à nouveau un épisode d'immunosuppression. L'administration peut, dans ce cas, prévenir une récurrence de l'infection [57].

Bien évidemment, étant donné qu'il s'agit d'un champignon ubiquitaire, une prophylaxie environnementale est également conseillée. Particulièrement en milieu hospitalier lors de séjours prolongés de patients fortement à risque (greffes de cellules souches hématopoïétiques, neutropénies sévères,...), la filtration de l'air via l'utilisation d'unités de filtration HEPA limitant la concentration des spores en suspension s'avère réduire le nombre de cas d'infections par *Aspergillus* [58, 59].

1.3.2.2. L'aspergillose pulmonaire chronique

Dans les cas les plus avancés ou bien dans une forme invasive de l'APC, le schéma thérapeutique est similaire à celui de l'API. Dans une forme moins avancée, l'administration

d'ITZ ou de VCZ par voie orale a prouvé son efficacité en dépit des toxicités que ces deux traitements manifestent [27, 60, 61].

1.3.2.3. L'aspergillome

Chez les patients asymptomatiques, aucun traitement de l'aspergillome n'est justifié. L'approche chirurgicale doit être envisagée en cas d'hémoptysie massive. La résection chirurgicale doit donc être évaluée du point de vue risque/bénéfice. Cette précaution est nécessaire, car il s'agit d'une intervention risquée et difficile, associée à un taux de mortalité et de morbidité post opératoire relativement élevé qui se situe entre 1,5 % et 23 % [15]. L'AmpB par administration IV ou l'ITZ par voie orale ont montré des taux de réponse très variables en cas d'aspergillome [62-64]. Plus récemment, l'administration de MCF par voie IV en combinaison avec l'ITZ par voie orale a montré un potentiel thérapeutique non négligeable [65]. Il existe un manque de preuves cliniques basées sur des essais cliniques comparatifs randomisés démontrant que l'aspergillome répond à des agents antifongiques particuliers. L'administration d'ITZ par voie orale est, quant à lui, aussi considéré. L'embolisation artérielle bronchique est une option à moindre risque en cas d'hémoptysie massive, mais les résultats ne sont généralement que transitoires en raison de la vascularisation très abondante au niveau pulmonaire.

1.3.2.4. L'aspergillose broncho-pulmonaire allergique

L'administration de corticoïdes par voie orale est le traitement de base pour l'ABPA. Cependant, parce que l'administration chronique de corticoïdes peut entraîner une grave déficience immunitaire et des anomalies métaboliques multiples, des approches alternatives ont été envisagées. Un exemple d'une approche alternative est d'éradiquer les espèces d'*Aspergillus* des voies respiratoires à l'aide d'ITZ en tant qu'agent « corticostéroïde sparing » [66]. Le mécanisme de cet effet est de diminuer la stimulation antigénique de l'inflammation bronchique résultant en une diminution de la dose de corticoïde nécessaire, une réduction des marqueurs inflammatoires et une amélioration de la fonction respiratoire. Des avantages similaires ont été observés lors de l'utilisation d'ITZ chez les patients atteints de mucoviscidose et d'ABPA [41, 66].

1.4. Problèmes généraux de la thérapie antifongique conventionnelle

D'un point de vue pharmacodynamique (PD), l'activité *in vitro* d'un antifongique à l'égard d'une souche particulière d'*Aspergillus* est caractérisée par sa concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI permet une détermination quantitative de l'activité antifongique *in vitro*. Il s'agit de la concentration minimale d'antifongique qui empêche la croissance d'un champignon donné après 24h d'incubation dans un milieu de culture spécifique. *In vivo*, la quantité d'antifongique exposée au champignon est également en relation avec son efficacité [67, 68]. Bien que les concentrations dans les divers tissus et fluides corporels pourraient être d'un plus grand intérêt (et dans notre cas particulier, les concentrations pulmonaires), pour des raisons pratiques évidentes, ces données sont disponibles en nombre très limité et les concentrations sériques/plasmiques d'un antifongique servent généralement de témoins substitutifs raisonnables afin d'en évaluer l'activité optimale dans un système biologique [67, 68]. Cependant, à l'inverse d'un système *in vitro*, après administration orale ou IV, les concentrations plasmatiques d'antifongiques fluctuent en raison du profil pharmacocinétique (PK) du médicament administré. De ce fait, des paramètres PK reflétant l'exposition du médicament (AUC_{0-24h} , C_{max}) ont été mis en relation avec les CMI, ce qui permet l'estimation de la relation activité pharmacologique – efficacité thérapeutique via une relation PK-PD. Ce principe est basé sur le fait que le maintien d'un indice PK-PD optimal déterminé sur base des réponses observées doit être requis afin de maximiser les chances de succès thérapeutique [67, 68]. Toutefois, les ratios optimaux sont généralement déterminés *in vitro* ou dans des modèles précliniques et sont majoritairement bien établis d'un point de vue clinique que pour les infections à *Candida*. Certaines corrélations ont été faites dans le cadre des infections à *Aspergillus*, mais elles ne le sont pas pour tous les principes actifs. De plus, bien que, pour les azolés, le ratio $AUC_{0-24} : CMI$ semblerait être un facteur déterminant de l'efficacité thérapeutique, de nombreux ratios minimaux différents (de 10 à 200) rapportés sans consistance particulière empêche l'acceptation d'une magnitude déterminée devant être maintenue. Dans la pratique actuelle au niveau du monitoring thérapeutique, le maintien d'une concentration plasmatique minimale déterminée sur base de résultats cliniques est généralement considéré comme le facteur clé garantissant une efficacité thérapeutique. Cependant, après l'administration d'un antifongique, beaucoup d'obstacles à l'obtention et au maintien d'un profil PK stable et

d'une concentration plasmatique donnée sont rencontrés. En effet, certaines de ces molécules présentent une forte variabilité inter- et intra-individuelle en termes de biodisponibilité orale qui influence fortement les quantités absorbées de l'intestin vers le sang. D'autres molécules ne sont d'ailleurs pas du tout résorbées par voie orale. Par ailleurs, certains antifongiques sont métabolisés par les cytochromes P450 hépatiques, ce qui, à la suite d'éventuelles interactions médicamenteuses et/ou de variations du polymorphisme génétique auxquels sont sujet ces cytochromes, peut également modifier le profil PK de ces médicaments. En outre, les antifongiques présentent un nombre important d'effets secondaires qui obligent fréquemment une interruption de traitement. Deux situations de danger peuvent donc être rencontrées après administration. La première est l'atteinte de concentrations plasmatiques sous-optimales ne garantissant pas une concentration plasmatique (et indirectement une valeur d'indice PK-PD) suffisamment élevée, ce qui peut dès lors mettre en danger la santé du patient. La seconde situation est l'atteinte de concentrations plasmatiques trop élevées engendrant des effets secondaires. Cette dernière situation est réellement problématique, car l'index thérapeutique de ces antifongiques est relativement étroit.

Tous ces facteurs peuvent donc favoriser un échec thérapeutique. Les points suivants reprennent les classes thérapeutiques et les principes actifs impliqués dans les traitements de première intention ou dans la prophylaxie de l'aspergillose pulmonaire et reprennent les problèmes majeurs qui y sont associés. L'émergence de phénomènes de résistance induisant une augmentation des CMI d'*Aspergillus* est également abordée.

1.4.1. Problèmes spécifiques à l'amphotéricine B

L'AmpB n'est pas résorbée par voie orale et est donc administrée par voie IV. Le principal problème rencontré avec cette molécule, outre l'aspect invasif de l'administration IV, est sa toxicité. Bien que son affinité pour l'ergostérol soit supérieure à celle du cholestérol, l'AmpB lie toutefois le cholestérol après administration, ce qui engendre de nombreux effets secondaires. Directement après perfusion IV, des maux de têtes, des nausées, des vomissements, de l'arthralgie et des frissonnements peuvent être observés. Des cas d'anémies peuvent également se déclarer lors d'administration prolongée. L'effet indésirable le plus grave reste toutefois la néphrotoxicité dose dépendante très fréquente de

Table 1 Interaction profiles of azole antifungals

Drug	CYP3A4	CYP3A4	CYP2C8/9	CYP2C8/9	CYP2C19	CYP2C19
	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Substrate	Inhibitor	Substrate
Fluconazole	++		++		+	+
Itraconazole	+++	+++	+			
Voriconazole	+	+	++	+	++	+++
Posaconazole	++					

Figure 12 : Profil d'interaction métabolique des azolés liés aux cytochromes P450 hépatiques [69].

TABLE 2. Interacting drugs that may alter antifungal blood concentrations

Drug	Interacting drug(s) that may decrease antifungal concn	Interacting drug(s) that may increase antifungal concn
Itraconazole	<u>Antacids</u> ^a including aluminum carbonate (basic), aluminum hydroxide, aluminum phosphate, calcium, dihydroxyaluminum aminoacetate, dihydroxyaluminum sodium carbonate, magaldrate, magnesium carbonate, magnesium hydroxide, magnesium trisilicate, sodium bicarbonate; <u>antibiotics</u> including isoniazid, rifabutin, rifampin, rifapentine; <u>antiepileptics</u> including carbamazepine, fosphenytoin, phenytoin; <u>antiretrovirals</u> including darunavir, didanosine, efavirenz, etravirine, nevirapine; <u>H₂ blockers</u> ^a including cimetidine, famotidine, nizatidine, ranitidine, roxatidine; <u>barbituates</u> including phenobarbital; <u>proton pump inhibitors</u> ^a including esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, rabeprazole	Antibiotics including clarithromycin; antiretrovirals including amprenavir, darunavir, fosamprenavir, lopinavir, ritonavir
Voriconazole	<u>Antibiotics</u> including rifabutin, rifampin, rifapentine; <u>antiepileptics</u> including carbamazepine, fosphenytoin, phenytoin; <u>antiretrovirals</u> including amprenavir, darunavir, delavirdine, efavirenz, nevirapine, ritonavir, tipranavir; <u>barbituates</u> including alifuzosin, aprobarbital, butabarbital, eterobarb, heptabarbital, hexobarbital, mephobarbital, pentobarbital, phenobarbital, secobarbital	Antiretrovirals including delavirdine, etravirine, fosamprenavir, nelfinavir, nevirapine, saquinavir, tipranavir, efavirenz; oral contraceptives including ethinyl estradiol, norethindrone; proton pump inhibitors including omeprazole
Posaconazole	<u>Antiepileptics</u> including phenytoin; <u>H₂ blockers</u> including cimetidine, famotidine, nizatidine, ranitidine, roxatidine; <u>proton pump inhibitors</u> including esomeprazole, lansoprazole, omeprazole, pantoprazole, rabeprazole; <u>gastric motility agent</u> including metoclopramide	Antiarrhythmics including quinidine; antibiotics including rifabutin; antiepileptics including phenytoin; antimalarials including halofantrine; antipsychotics including pimozide; antiretrovirals including etravirine; antihistamines including astemizole(off market), terfenadine (off market); benzodiazepines including midazolam; calcium channel blockers including amlodipine, diltiazem, felodipine, lercanidipine, nifedipine, nisoldipine, nitrendipine, verapamil; ergot alkaloids including dihydroergotamine, ergoloid mesylates, ergonovine, ergotamine, methylergonovine, methysergide; immunosuppressants including cyclosporine, sirolimus, tacrolimus; serotonic receptor antagonists including cisapride (off market); statins including atorvastatin, lovastatin, simvastatin; vinca alkaloids including vinblastine, vincristine, vincristine liposome, vinorelbine

^a Impact the capsule formulation of itraconazole.

Figure 13 : Table reprenant une liste des principes actifs pouvant affecter les concentrations plasmatiques en antifongiques azolés [70].

l'AmpB [71, 72] qui peut conduire à une insuffisance rénale nécessitant la dialyse. Bien qu'étant une molécule très active, la toxicité de l'AmpB limite son utilisation.

1.4.2. Problèmes rencontrés avec les triazolés

Etant donné leur activité inhibitrice des cytochromes P450 fongiques, les azolés sont potentiellement tous des inhibiteurs des cytochromes P450 humains [69]. La **Figure 12** reprend les trois antifongiques dont il est ici question, ainsi que leurs interactions particulières avec les isoformes cytochromiques hépatiques rencontrées chez l'humain. Comme on peut le constater, certains peuvent être à la fois substrat et inhibiteur du même cytochrome. La métabolisation hépatique pose un gros problème, étant donné que les patients atteints d'aspergillose invasive ont généralement une co-médication consécutive à leur état pathologique sous-jacent. Beaucoup d'interactions peuvent s'installer modifiant les concentrations plasmatiques des antifongiques ou des substances co-administrées suivant qu'ils soient inhibiteurs, substrats ou inducteurs des cytochromes par lesquels ils sont métabolisés (**Figure 13**). De plus, certains azolés voient leur métabolisme affecté par le polymorphisme génétique, ce qui peut modifier de manière non prédictive leurs profils PK. Beaucoup de problèmes de variation de la biodisponibilité orale particulière à chaque formulation et principe actif sont également rencontrés avec cette classe thérapeutique. En outre, ces composés ne sont pas dénués de toxicité, ce qui rend les fluctuations de concentrations systémiques dangereuses, sans tenir compte du fait qu'elles peuvent aussi conduire à une concentration sous-optimale. Cette classe thérapeutique est caractérisée par un index thérapeutique très étroit. Une toxicité particulièrement contraignante, beaucoup plus fréquente pour l'ITZ et le VCZ, est la toxicité neurologique qui peut apparaître sur le long terme et qui est dose dépendante [73]. Des tremblements, des troubles moteurs, des pertes de sensibilité ou des douleurs neuropathiques périphériques peuvent se déclarer en cas de surdosages. Des cas très fréquents de perturbation de la concentration et de fatigue générale sont rapportés lors de la prise de VCZ, ce qui de manière régulière rebute les patients à suivre leur traitement. De l'hépatotoxicité ainsi que des rashes cutanés et de la photosensibilisation sont également très fréquemment rapportés (**Figure 14**). Ces principes actifs sont donc de bons candidats au monitoring thérapeutique.

Table V. Adverse events associated with the various triazoles^[1-4,24-26,31,32]

Clinical signs and symptoms	Adverse events (%)		
	itraconazole	voriconazole	posaconazole
Nausea, vomiting, diarrhoea	24 (oral solution)	NA	8–18
Hepatotoxicity	8.5	10–23	2–3
Skin rash	5–19	5	NA
Visual disturbance	NA	1–30	NA
Headache	<3	NA	5–17
Psychiatric symptoms	NA	<1	NA

NA = not applicable.

Figure 14 : Fréquence d'apparition des principaux effets secondaires rencontrés lors de l'administration des antifongiques azolés. La neurotoxicité, commune à cette classe d'antifongique, n'y est pas rapportée [74].

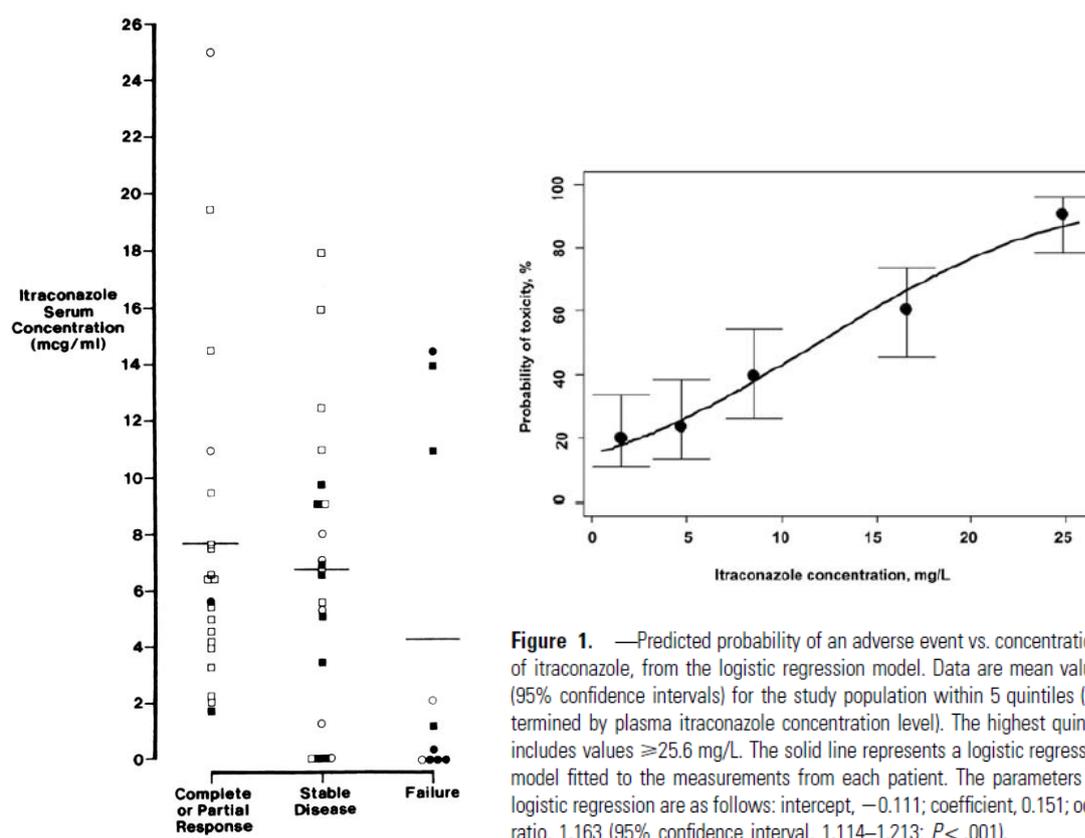


Figure 1. —Predicted probability of an adverse event vs. concentrations of itraconazole, from the logistic regression model. Data are mean values (95% confidence intervals) for the study population within 5 quintiles (determined by plasma itraconazole concentration level). The highest quintile includes values ≥ 25.6 mg/L. The solid line represents a logistic regression model fitted to the measurements from each patient. The parameters for logistic regression are as follows: intercept, -0.111 ; coefficient, 0.151 ; odds ratio, 1.163 (95% confidence interval, 1.114 – 1.213 ; $P < .001$).

Figure 15 : Illustration de la variabilité en taux sérique d'itraconazole après administration répétée de gélules par voie orale (gauche) ainsi que le probabilité d'apparition d'effets secondaires relatives à cette concentration (droite). Les taux exprimés ont été mesurés par bioassay qui ne discrimine pas l'itraconazole de son métabolite actif, l'hydroxy-itraconazole. Les concentrations exprimées correspondent donc à la somme des deux composés. Cependant, il est rapporté que les concentrations obtenues par cette méthode correspondent à 2-10 fois la concentration qui serait mesurée par HPLC. La dose minimale efficace (correspondant à $1 \mu\text{g/ml}$ d'itraconazole dosé par HPLC) est estimée à $5 \mu\text{g/ml}$ [68, 75].

1.4.2.1. Problèmes spécifiques à l'itraconazole

L'ITZ pose énormément de problèmes de biodisponibilité orale. De par sa très faible solubilité, son taux d'absorption est imprévisible et influencé par de nombreux facteurs extérieurs. La biodisponibilité orale de l'ITZ peut considérablement varier entre deux prises et entre deux individus. Quand il est administré sous forme de gélule, la biodisponibilité absolue de l'ITZ peut varier du simple au triple (de 15 à 55 %) [76, 77]. Sa complexation avec une cyclodextrine, quand il est administré sous forme de solution orale, permet d'augmenter sa biodisponibilité de 20 à 30 %. Toutefois, dans les deux cas, des facteurs extérieurs influencent énormément sa résorption [68]. La solubilité de l'ITZ augmente à pH acide et, de ce fait, la co-administration d'une boisson gazeuse acide ou la prise après le repas permet une augmentation de sa biodisponibilité. A l'inverse, la co-administration d'antiacides la diminue. L'influence du pH gastrique lors de l'administration de la solution orale semble ne pas être aussi problématique. A l'inverse, formulé sous cette forme galénique, l'absorption de l'ITZ est augmentée à jeun. Toutefois, l'intolérance gastro-intestinale très fréquemment provoquée après ingestion de cette solution limite son utilisation. En outre, une activité des pompes à efflux à l'égard de l'ITZ au niveau de la paroi intestinale a également été rapportée [69].

L'ITZ est principalement métabolisé par le cytochrome P450 3A4. Son métabolite principal, l'hydroxy-ITZ présente une activité antifongique similaire à l'ITZ et peut donc être considéré comme étant acteur à part entière de son activité antifongique. La concentration systémique en hydroxy-ITZ peut être égale à celle de son composé parent. Lors d'administrations répétées d'ITZ, une accumulation dans le plasma peut se passer consécutivement à la saturation de son métabolisme provoquant une augmentation de sa concentration circulante à l'équilibre.

Les concentrations minimales plasmatiques en ITZ devant être maintenues sont de 0,25-0,5 µg/ml dans le cadre d'une action prophylactique et de 1 µg/ml dans le cadre d'une action thérapeutique [68, 74]. Des concentrations inférieures à celles précédemment citées sont généralement associées à un pronostic thérapeutique défavorable [68, 74].

Toutefois, compte tenu de toutes les sources de variabilité précédemment citées, il est difficile après administration orale de garantir un profil de concentration plasmatique en

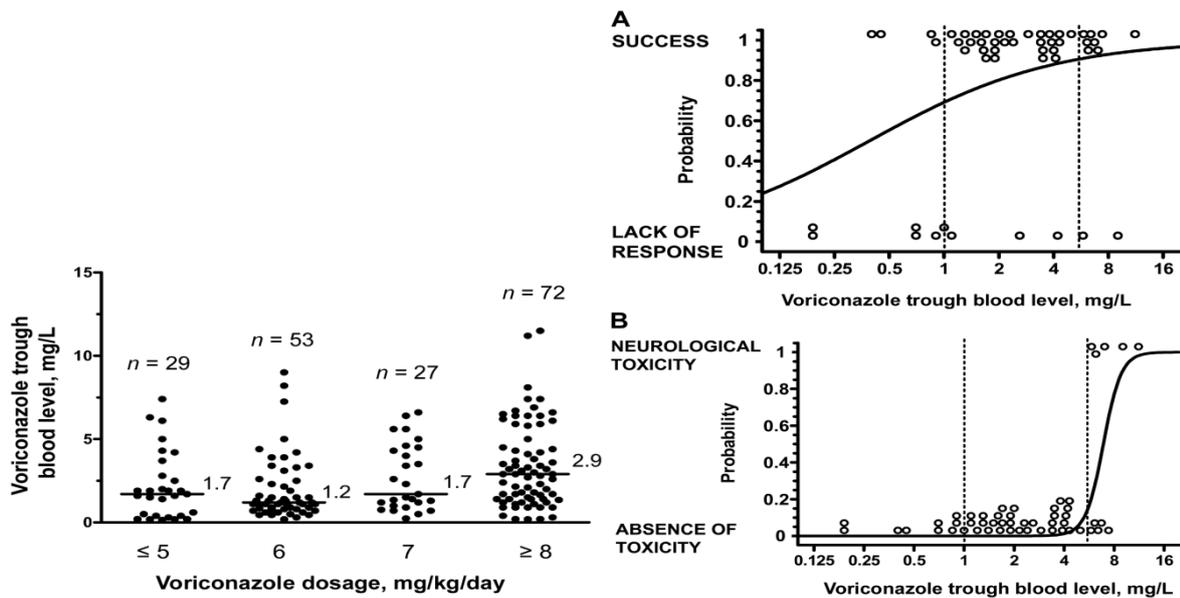


Figure 16 : Taux sanguins en voriconazole mesurés après administration orale de différentes doses illustrant sa pharmacocinétique non linéaire (gauche). Représentation graphique de l'intervalle de concentrations (lignes pointillées verticales) sanguines en voriconazole associé à une bonne réponse thérapeutique(A) et à une minimisation de la probabilité d'apparition d'effets secondaires (B) [78].

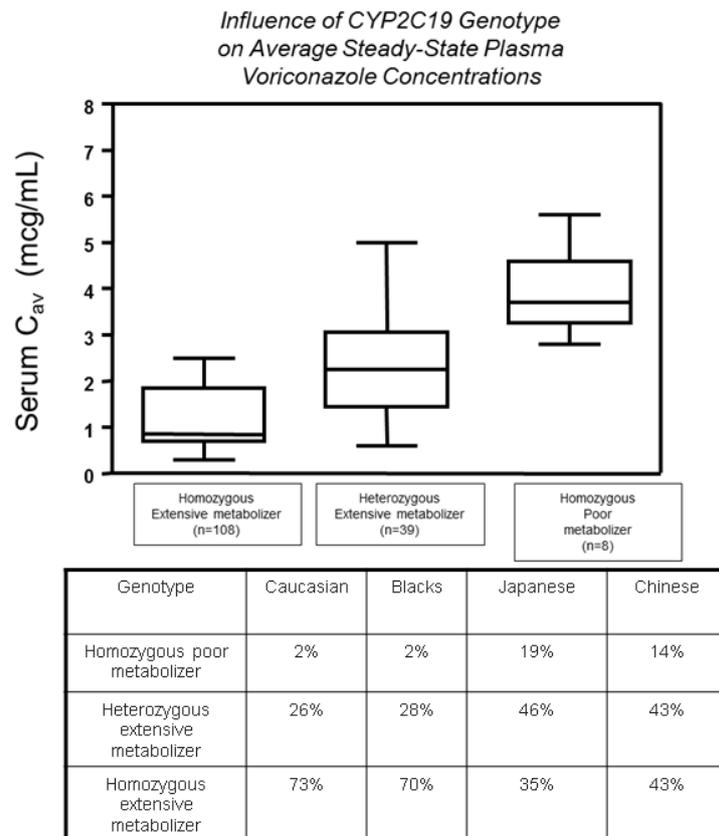


Figure 17: Répartition du polymorphisme génétique au travers différentes populations ainsi que l'influence qu'elle a sur les concentrations plasmatiques à l'équilibre du voriconazole [79].

ITZ stable et reproductible. Il a, par exemple, été rapporté que les concentrations sériques en ITZ à l'équilibre peuvent varier d'un facteur 15 après administration sous forme de gélule chez des patients consécutivement aux problèmes d'absorption et de métabolisme [80]. Cela peut poser de réels problèmes de sécurité, car la probabilité d'apparition d'effets secondaires augmentant rapidement avec l'augmentation de la concentration plasmatique en ITZ au-delà de la concentration thérapeutique ciblée (**Figure 15**). Les effets secondaires principaux apparaissant lors d'études cliniques suite à l'administration d'ITZ sont repris dans la **Figure 14**.

1.4.2.2. Problèmes spécifiques au voriconazole

Le VCZ est bien résorbé par voie orale (biodisponibilité absolue > 90 %). Toutefois, sa biodisponibilité est réduite de plus de 20 % en cas de prise concomitante de nourriture [68]. Cet azolé est lui aussi excessivement métabolisé par les cytochromes P450 hépatiques (**Figure 12**). C'est principalement dû à ce mode de métabolisation que les problèmes majeurs liés à la difficulté de l'obtention et du maintien d'une concentration plasmatique donnée sont rencontrés. En effet, de nombreuses interactions médicamenteuses sont évidemment possibles (**Figure 13**). De plus, le VCZ présente une PK non linéaire qui peut engendrer une augmentation non proportionnelle des concentrations plasmatiques et de l'AUC en fonction de l'augmentation de la dose administrée (**Figure 16**) [70, 78]. Le polymorphisme génétique évoqué concerne principalement le cytochrome P450 2C19 qui est associé à des variabilités interindividuelles importantes des taux plasmatiques en VCZ obtenus après administration d'une même dose chez différents groupes génotypiques de patients (**Figure 17**) [68]. Par exemple, 14 à 19 % des asiatiques sont mentionnés comme étant des métaboliseurs lents contre 2 % seulement des caucasiens. Chez les métaboliseurs rapides, les concentrations plasmatiques peuvent être jusqu'à 4 fois inférieures à celles rencontrées chez les métaboliseurs lents [68].

Le schéma de dose et de posologie adopté pour le VCZ devrait donc être adapté, étant donné qu'il va être difficile de prédire, même après administration IV, les concentrations plasmatiques résultantes en VCZ. Cependant, dans la pratique, le monitoring thérapeutique n'est pas systématiquement appliqué, ce qui peut générer d'importantes variabilités des taux sanguins comme illustré dans la **Figure 16**. Or, comme on peut le voir

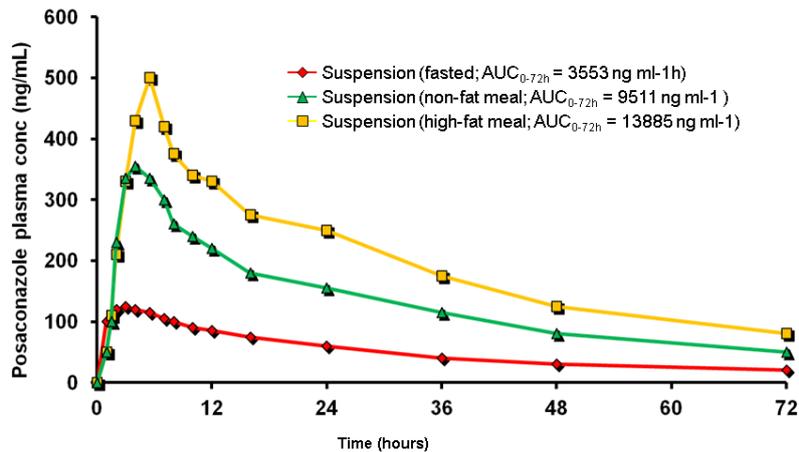


Figure 18 : Concentrations plasmatiques 72 h après l’administration de 200 mg/5ml de posaconazole sous forme de suspension buvable. L’absorption du posaconazole est augmentée d’un facteur 3.9 s’il est administré avec un repas riche en graisses comparativement à l’absorption observée après administration à jeun. La prise de nourriture non grasse augmente également l’absorption du posaconazole[81].

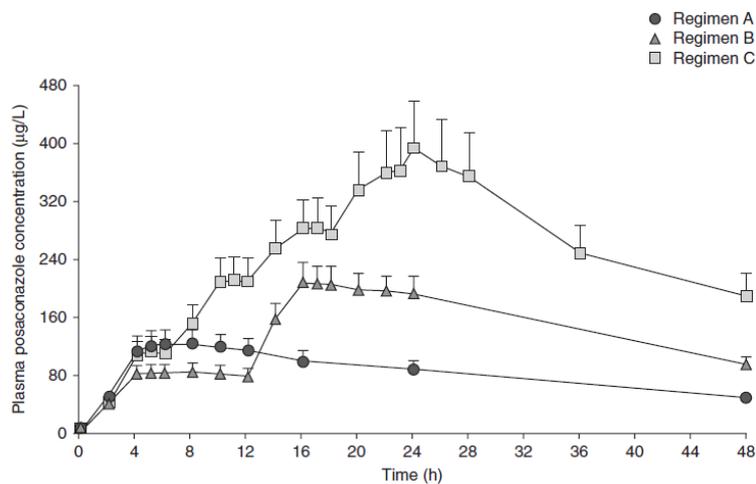


Figure 19: Concentrations plasmatiques moyennes en posaconazole après administration de la suspension buvable selon différents schémas posologiques chez des patients à jeun : doses de 800 mg en 1 prise (regimen A), 400 mg en 2 prises (1/12h ; regimen B) et 200 mg en 4 prises (1/6h ; regimen C). Les groupes regimen B et regimen C présentent une biodisponibilité relative de 98 % et 220 % comparativement au groupe regimen A [82].

sur cette même figure, la fenêtre thérapeutique du VCZ est très étroite. L'intervalle des concentrations plasmatiques proposé doit être maintenu entre 1 µg/ml et 5,5 µg/ml, sous peine d'inefficacité (< 1 µg/ml) ou d'apparition plus probable d'effets secondaires graves neurologiques et hépatiques (> 5,5 µg/ml).

1.4.2.3. Problèmes spécifiques liés au posaconazole

Le PSZ, à l'inverse des deux autres azolés ici discutés, n'est pas métabolisé par les cytochromes hépatiques, mais à faible taux (~40%) par des enzymes métaboliques de phase 2, les UDP-glucuronosyltransférases [83]. Il est donc moins susceptible de voir sa concentration plasmatique être modifiée consécutivement à la prise de médicaments. L'influence que pourrait avoir le polymorphisme génétique des enzymes par lequel il est métabolisé reste encore à explorer. Toutefois, le PSZ est un puissant inhibiteur du cytochrome P450 3A4, ce qui, comme les autres azolés, peut engendrer de nombreuses interactions médicamenteuses. Il est excrété sous forme inchangée ou sous forme de glucuronoconjugué dans les urines et dans les fèces [50]. Les obstacles majeurs à la maîtrise des concentrations plasmatiques obtenues avec le PSZ proviennent principalement du fait qu'il présente non seulement une PK non linéaire provoquant une augmentation des concentrations plasmatiques à l'équilibre en fonction du temps. De plus, l'absorption gastro-intestinale du PSZ est également fortement influencée par la prise de nourriture (et de sa teneur en graisse) et la dose administrée. En effet, comme on peut le constater dans la **Figure 18**, une augmentation considérable de la quantité de PSZ retrouvée dans le plasma est observée après son administration sous forme de suspension buvable lors de la prise de nourriture. Cette augmentation est également accentuée si la nourriture ingérée est riche en graisse et ce en raison de l'augmentation du pH consécutif à la digestion et à la solubilisation facilitée par l'apport en graisse [81]. Comme mentionné, la dose administrée est limitée par une absorption saturable, marquée par une réduction de la dose absorbée en fonction de l'augmentation de la dose administrée (**Figure 19**). Or, le PSZ est administré en tant que traitement à long terme par voie orale. Le manque de compliance du patient peut aisément tendre vers une situation de dosage plasmatique inapproprié qui est renforcé par les nombreux effets secondaires inconfortables que le PSZ engendre en prises répétées (**Figure 14**).

Le maintien d'une concentration plasmatique supérieure respectivement à 0,7 µg/ml et 1,25 µg/ml pour la prophylaxie et le traitement de rattrapage est associé à un taux global de réponse thérapeutique favorable [84]. Par contre, une relation claire n'a pas encore été démontrée entre l'apparition des effets toxiques et une concentration plasmatique seuil en PSZ [84].

1.4.3. Phénomènes de résistances

La résistance microbiologique des champignons du genre *Aspergillus* est un phénomène qui prend de l'ampleur. De nombreuses résistances aux antifongiques ont émergées au cours des dernières décennies. Toutefois, on note que la prévalence de résistance varie énormément d'un pays à l'autre (ex : 6 % aux Pays-Bas vs 2 % en Espagne et 0 % en Australie) [85]. Les phénomènes de résistances qui sont progressivement apparus et qui ont été les plus étudiés depuis la fin des années 1990 sont ceux de l'*A. fumigatus* aux azolés [86]. L'antifongique dont la résistance est la plus récurrente est l'ITZ bien que, dans la majorité des cas (~ 80 %), il y ait une résistance croisée au VCZ et, à moindre incidence (~17%), au PSZ [87]. Le mécanisme principal de résistance aux azolés est une modification de la protéine cible avec laquelle ils doivent agir pour exercer leur action antifongique (l' α -14 déméthylase fongique). Cette modification de la protéine réduit ainsi l'affinité qu'a l'antifongique avec sa cible ou bien l'empêche d'interagir avec celle-ci, ce qui peut considérablement augmenter la CMI de la souche incriminée ou, dans certains cas, la rendre insensible aux azolés [87, 88]. La surexpression de cette protéine ainsi que celle des pompes à efflux fongiques sont également des sources probables d'apparition de résistance [89]. L'apparition de ces mutations est rapportée comme étant un mécanisme adaptatif subséquent à une exposition prolongée aux azolés, mais pouvant également être acquis avant inoculation supposant que ces génotypes résistants sont maintenant répandus dans l'environnement [90]. L'exposition à de faibles doses d'antifongiques comparativement à l'exposition à des doses élevées est associée à une augmentation significativement plus importante de la CMI du champignon [90]. Il peut dès lors être supposé que l'obtention de taux sous-optimaux d'antifongique au niveau des poumons lors d'un traitement d'aspergillose pulmonaire pourrait entraîner l'apparition de souches résistantes. La résistance aux azolés dans l'aspergillose pulmonaire est une grande problématique clinique, car elle est généralement associée à un échec thérapeutique. En cas de résistance, le

changement de classe d'antifongique est donc recommandé (AmpB ou échinocandine). De nouvelles pistes suggèrent que l'association d'un azolé avec une échinocandine pourrait avoir un effet synergique surpassant le phénomène de résistance [53-55].

1.5. L'administration pulmonaire, une alternative thérapeutique ?

Un mode d'administration alternatif des antifongiques qui pourrait augmenter les taux de succès du traitement ou de la prévention de l'aspergillose pulmonaire serait l'inhalation. Ce mode d'administration présente un nombre considérable d'avantages par rapport aux voies orale et IV. En effet, comme vu précédemment avec la CMI du champignon, le maintien d'une concentration plasmatique, et donc pulmonaire, minimale est requis pour garantir un effet antifongique optimal au sein du poumon. Or, une fois dans la circulation systémique, les antifongiques sont fortement liés aux protéines plasmatiques, ce qui limite la portion de la dose circulante pouvant pénétrer les tissus pulmonaires. De plus, exception faite du VCZ, les concentrations pulmonaires en antifongiques sont généralement plus basses que les concentrations systémiques relevées [91]. De ce fait, les concentrations systémiques garantissant une concentration pulmonaire efficace sont généralement élevées et proches de leur concentration toxique (section 1.4.). Donc, l'administration directement au sein du poumon permettrait de ne plus avoir recours aux hautes concentrations systémiques nécessaires, et par conséquent, de limiter les effets secondaires et les interactions médicamenteuses pouvant se manifester. De plus, l'administration pulmonaire permettrait de maintenir la dose d'antifongique au sein du poumon et dès lors, elle ne devrait plus être influencée par les nombreux facteurs incontrôlables (biodisponibilité orale, polymorphisme génétique, et interactions médicamenteuses) tendant à faire varier les concentrations plasmatiques en antifongiques et donc leur exposition pulmonaire [92]. En outre, l'obtention et le maintien d'une dose massive d'antifongique au niveau du poumon permettraient d'avoir une activité sur les souches résistantes d'*aspergillus* dont la CMI est augmentée et dont la sélection devrait également diminuer lors d'administrations répétées. De plus, une hypothèse récente avance que la co-administration d'ITZ par voie inhalée et d'une autre classe antifongique (ex : la flucytosine) par voie systémique résulterait en un effet additif permettant une action antifongique sur des souches préalablement résistantes. Cette caractéristique pourrait s'avérer tout à fait intéressante dans la pratique pour la prévention ou le traitement

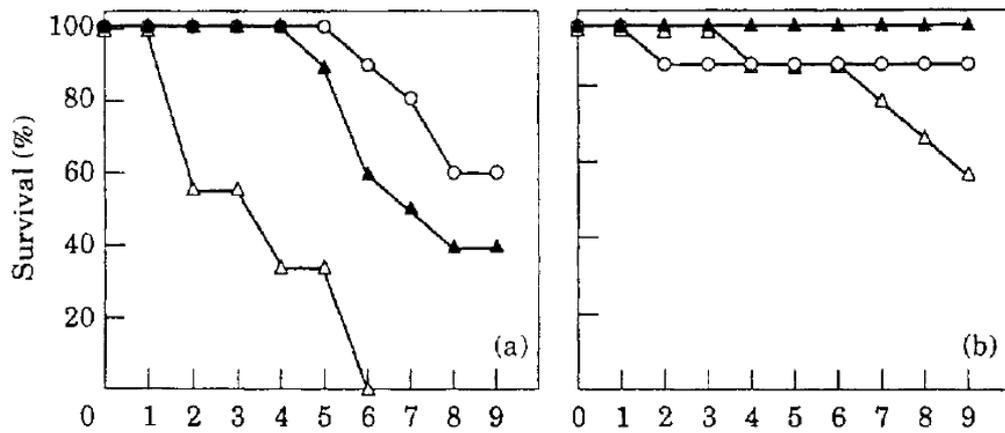


Figure 20 : Courbes de survies obtenues lors de l'évaluation de l'effet prophylactique d'une formulation intraveineuse d'amphotéricine B administrée quotidiennement par inhalation (nébulisation) et débutée 3 jours avant infection par *A. fumigatus* dans un modèle murin d'aspergillose pulmonaire invasive. (a) animaux non traités (b) nébulisation d'amphotéricine B liposomiale (AmBisome® 6.05 mg/kg). Les différentes courbes correspondent à un nombre différent (Δ : 10^8 , \blacktriangle : 10^7 , \circ : 10^6) de spores inoculées par voie intranasale [93].

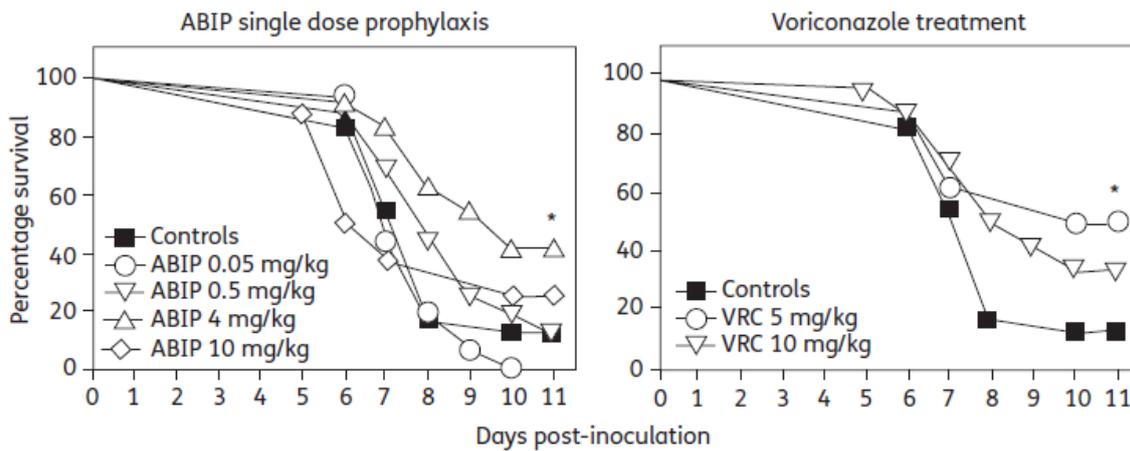


Figure 21 : Courbes de survies obtenues lors de l'évaluation de l'effet prophylactique d'une formulation de poudre sèche pour inhalation d'amphotéricine B administrée une seule fois 24h avant infection (ABIP ; gauche) comparativement à l'administration de VCZ par voie orale débutée 1 jour (continuée pendant 8 jours) après l'infection (VRC ; droite) par *A. fumigatus* dans un modèle sur cobaye d'API. Contrôle (controls) : pas de traitement ni de prophylaxie ; * différence significative ($p < 0.05$; log-rank test) vs groupe contrôle [94].

d'infections par une souche résistante [95]. Dans ce sens, de nombreux essais précliniques ont été réalisés et couronnés de succès. Ces études ont confirmé que le maintien d'une concentration pulmonaire en antifongique, exprimée en microgramme d'actif par gramme de poumon ($\mu\text{g}_{\text{pa}}/\text{g}_{\text{poumon}}$), supérieure à la CMI du principe actif évaluée à l'égard de la souche incriminée permettait une action prophylactique ou thérapeutique donnée.

L'administration pulmonaire par nébulisation de formulations d'AmpB destinées à la voie IV a été la plus étudiée. L'efficacité prophylactique de l'administration de telles formulations par inhalation a été largement démontrée [96]. Un avantage considérable de l'AmpB liposomiale après administration pulmonaire par nébulisation est son temps de demi-vie pulmonaire élevé. En effet, il a été rapporté chez la souris qu'après administration pulmonaire unique d'AmpB, il est possible de maintenir des concentrations pulmonaires supérieures à la CMI (0,25 $\mu\text{g}/\text{g}$) du champignon pendant au moins 14 jours. Cette particularité permet donc de minimiser au maximum la fréquence d'administration [97]. Ce qui est profitable, car l'AmpB n'est pas dénuée de toxicité locale même à raison d'une administration par semaine. De plus, elle n'est pratiquement pas résorbée au niveau pulmonaire, ce qui permet de réduire considérablement ses effets toxiques systémiques particulièrement délétères [98]. Par exemple, il a été montré dans un modèle murin d'API qu'une administration quotidienne d'AmpB liposomiale par nébulisation, ayant débutée 3 jours avant inoculation des spores, augmentait de manière significative la survie des animaux comparativement aux groupes non traités et ce, sans induire de néphrotoxicité (**Figure 20**, [93]). Plus récemment, une poudre sèche pour inhalation d'AmpB a été développée et son activité prophylactique a été évaluée sur un modèle d'API sur cobaye. L'administration unique de cette formulation 24h avant infection par *Aspergillus* a permis de prolonger significativement la survie des animaux et de réduire la charge fongique pulmonaire comparativement aux animaux non traités (**Figure 21**, [94]). Néanmoins, l'augmentation de la dose d'AmpB par inhalation de 4 mg/kg à 10 mg/kg a réduit considérablement le pourcentage de survivant durant l'étude ce qui suggère une certaine toxicité. De plus, le bénéfice observé en terme de pourcentage de survivant est identique, voir inférieur, à celui obtenu avec le contrôle positif (le VCZ par voie orale). Des preuves de potentialité thérapeutique sur des modèles précliniques par l'administration par nébulisation d'AmpB (administration quotidienne d'AmpB après infection par l'*aspergillus*)

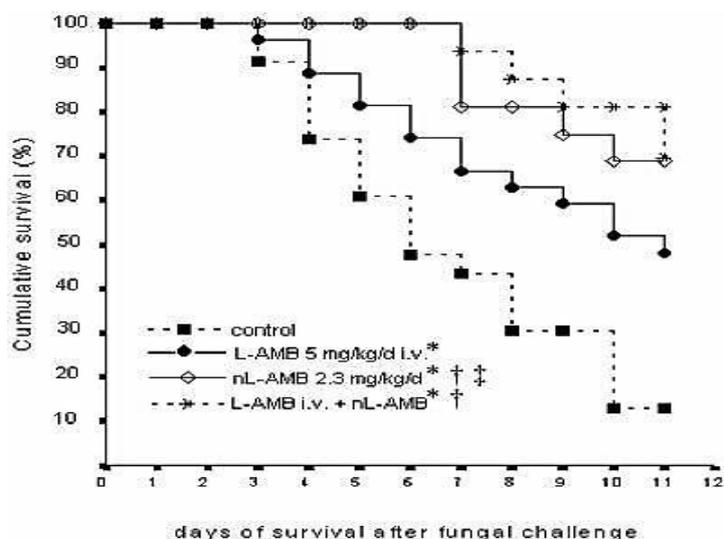


Figure 22 : Courbes de survies montrant l'effet thérapeutique de l'administration de l'amphotéricine B liposomiale par nébulisation ou par voie IV commencée 24h après infection et administré quotidiennement. L-AMB : formulation administrée par voie IV ; nL-AMB : formulation administrée par nébulisation [99].

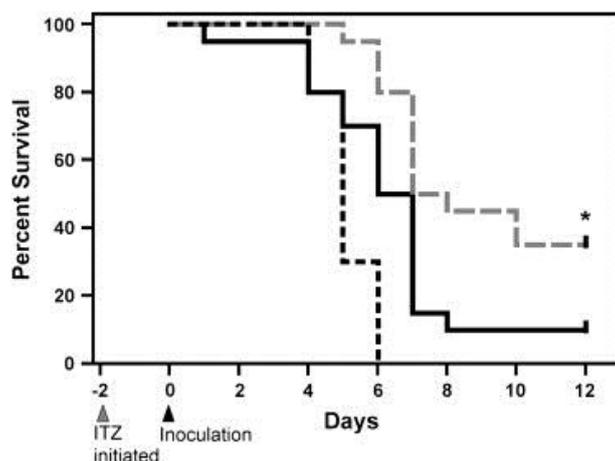


Figure 23 : Courbes de survies, lors d'un traitement prophylactique par l'ITZ, obtenues sur un modèle murin d'API. La courbe grise correspond au groupe traité par l'inhalation d'une dose estimée de 30 mg/kg de nanoparticules amorphes d'ITZ une fois par jour. La courbe noire continue correspond au groupe traité par administration orale d'une dose équivalente à 30 mg/kg d'ITZ sous forme de solution orale (Sporanox®). La courbe noire pointillée correspond au groupe contrôle non traité [100].

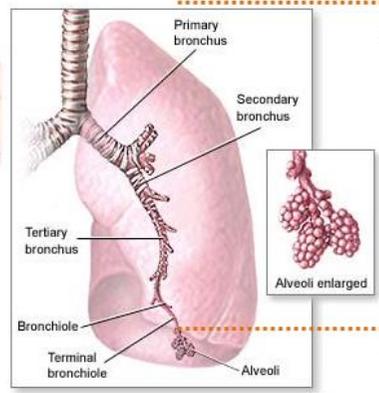
ont également été rapportées avec une supériorité significative comparativement aux résultats obtenus par administration IV des mêmes formulations (**Figure 22**, [99, 101]). Ces pistes concrètes et encourageantes ont conduit à l'extrapolation de ce mode d'administration chez l'homme et à la réalisation d'études cliniques. Toutefois, le manque de concordance et la variabilité des conclusions qui en sont ressorties, notamment en ce qui concerne sa toxicité [102], ainsi que le problème du manque d'activité de l'AmpB à l'égard de souches non *fumigatus* (*A. flavus*, *A. terreus*) n'ont pas encore permis de valider et d'enregistrer ce mode d'administration pour la prophylaxie de l'API.

L'effet prophylactique de l'ITZ par inhalation dans des modèles murins d'API à *A. fumigatus* et *A. flavus* a également été évalué par nébulisation de suspensions de nanoparticules (NP) d'ITZ préparées par différentes techniques de précipitation [100, 103, 104]. Comme exposé dans la **Figure 23**, la nébulisation de ces formulations d'ITZ a permis d'apporter un bénéfice en terme de survie de l'animal qui était supérieur à celui apporté par administration orale d'une même dose de la solution d'ITZ commercialisée (Sporanox®). L'effet prophylactique de la nébulisation d'une solution IV de VCZ (Vfend®) a également été évalué dans le même cadre, menant à des conclusions similaires [105]. Des études de toxicité chronique n'ont pas révélé de réactions inflammatoires exacerbées ou de modifications particulières après administrations répétées de ces deux composés sous les formes galéniques étudiées [106, 107]. Récemment, des cas isolés de l'utilisation de cette solution IV de VCZ par nébulisation chez des patients atteints d'API, réfractaires ou ne pouvant pas continuer la thérapie qu'ils suivaient, et dont le pronostic vital n'était pas favorable, ont été rapportés avec l'éradication de l'infection comme résultat [108].

Toutes ces observations laissent donc penser qu'il y aurait moyen d'améliorer l'effet d'un traitement antifongique lors de son administration par voie inhalée. Or, la plupart des formulations qui ont été évaluées dans ce but, n'ont pas été spécifiquement prévus pour cette application. Une démarche qui pourrait alors être grandement profitable en permettant d'augmenter la potentialité d'une telle approche thérapeutique, serait de développer une formulation de poudres sèches pour inhalation d'antifongique.

Voies aériennes supérieures

Voies aériennes inférieures



Zone de conduction

Zone respiratoire

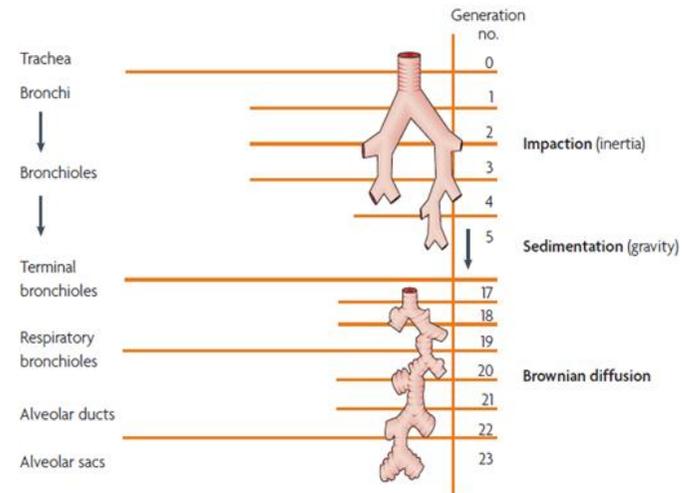


Figure 24 : Représentation de la structure générale du tractus respiratoire ainsi que des différentes générations dichotomiques qui y sont associées selon Weibel (modifié de [109, 110]).

	Generation	Diameter,cm	Length,cm	Number	Total cross-sectional area, cm ²		
Conducting zone	Trachea	0	1.80	12.0	1	2.54	
	Bronchi	1	1.22	4.8	2	2.33	
		2	0.83	1.8	4	2.13	
	Bronchioles	3	0.56	0.8	8	2.00	
		4	0.45	1.3	16	2.48	
5		0.35	1.07	32	3.11		
Transitional and respiratory zones	Terminal Bronchioles	16	0.06	0.17	4×10^4	180.0	
	Respiratory Bronchioles	17	↓	↓	↓	↓	
		18	↓	↓	↓	↓	
		19	0.05	0.10	5×10^5	10^5	
	Alveolar ducts	T ₃	20	↓	↓	↓	
		T ₂	21	↓	↓	↓	
		T ₁	22	↓	↓	↓	
	Alveolar sacs	T	23	0.04	0.05	6×10^6	10^4

Figure 25 : Modèle de divisions dichotomiques du système respiratoire inférieur selon Weibel et valeur de diamètre, longueur et surface spécifique qui y sont associées [111].

2. L'inhalation :

Etant donné le potentiel évident illustré dans le point précédent de l'administration d'antifongiques par inhalation dans le cadre de la prophylaxie et du traitement de l'aspergillose pulmonaire, nous avons décidé de développer une forme galénique administrable via un inhalateur de poudre sèche. Afin de comprendre la délivrance de médicaments, la déposition des particules ainsi que leur devenir au sein du poumon après inhalation, nous allons tout d'abord décrire le tractus respiratoire (2.1.), ensuite, détailler les facteurs influençant la déposition des particules au sein de ce tractus (2.2) ainsi que leur devenir au sein du poumon (2.3.).

2.1. Le système respiratoire

2.1.1. Structure générale du système respiratoire

Le tractus respiratoire se divise en deux parties (**Figure 24**) :

- les voies aériennes supérieures qui démarrent par la cavité nasale et buccale et qui comprennent les sinus, le nasopharynx, l'oropharynx et le larynx et se finissent au sommet de la trachée,
- les voies aériennes inférieures qui comprennent la trachée, les bronches, les bronchioles, les bronchioles terminales, les bronchioles respiratoires et l'espace alvéolaire.

D'un point de vue structurel, les voies aériennes inférieures ont une structure ramifiée constituée d'une succession de subdivisions, chaque subdivision étant appelée génération, commençant par la trachée jusqu'aux sacs alvéolaires. Cette ramification permet aux voies aériennes de prendre une grande expansion et de se répartir de manière dense et homogène au sein du poumon afin d'acheminer l'air en grande quantité aux niveaux des alvéoles [112]. Weibel a développé un modèle [111] suivant lequel chaque voie aérienne se subdivise en deux voies aériennes « filles » de plus petit calibre (**Figure 25**). Ce modèle propose l'existence au total de 24 générations de voies aériennes (la génération 0 étant la trachée et les sacs alvéolaires la génération 23) et repose sur leur symétrie. Cependant, dans la réalité, les voies aériennes ne sont pas tout à fait symétriques [113]. Toutefois, ce modèle reste un des modèles les plus couramment utilisés pour décrire et modéliser le tractus

respiratoire. *In vivo*, la trachée (génération 0) se subdivise en deux bronches primaires qui bifurquent dans le poumon droit et le poumon gauche pour ensuite se subdiviser en trois bronches lobaires (ou secondaires) dans le poumon droit et deux bronches lobaires dans le poumon gauche. Ces bronches lobaires se subdivisent à leur tour en bronches segmentaires (ou tertiaires) puis en bronchioles qui, elles aussi, se subdivisent en bronchioles de plus en plus petites jusqu'aux bronchioles terminales et respiratoires, puis aux canaux alvéolaires aboutissant aux sacs alvéolaires (**Figure 24**). Chaque génération des voies aériennes présente un diamètre inférieur et une surface spécifique totale supérieure comparativement à sa génération « mère » (**Figure 25**).

2.1.2. Zone de conduction et zone respiratoire

D'un point de vue fonctionnel, les voies aériennes inférieures sont considérées en deux zones distinctes : la partie supérieure, la zone de conduction, et la partie inférieure, la zone respiratoire (**Figure 24**).

La zone de conduction a pour but d'acheminer l'air inspiré vers la zone respiratoire où les échanges gazeux se feront. Aucun échange gazeux ne se fait à ce niveau. La zone de conduction comprend la trachée, les bronches primaires, lobaires, segmentaires, les bronchioles et les bronchioles terminales. Cette portion du tractus respiratoire bifurque approximativement 17 fois selon la représentation de Weibel [111]. Cette succession d'embranchements permet une augmentation de la surface spécifique totale exposée ainsi qu'une diminution de la vitesse de progression de l'air inspiré [114]. Une fonction secondaire de la zone de conduction est de s'assurer que l'air inspiré est chauffé et humidifié de façon à fournir aux alvéoles un air présentant une température et un taux d'humidité similaires à leur environnement préexistant. L'inspiration d'air trop froid peut évidemment générer une importante perte de chaleur par le transfert de chaleur du corps vers l'air inspiré. Une humidification optimale de l'air inspiré est primordiale pour assurer un fonctionnement correct des voies respiratoires [115]. Par exemple, l'inspiration d'un air trop sec a été corrélée avec des dysfonctionnements notamment celui de l'escalator mucociliaire (destruction des cils, désorganisation de la structure cellulaire, dégénérescence cytoplasmique et nucléaire, desquamation, ulcération) [116-118].

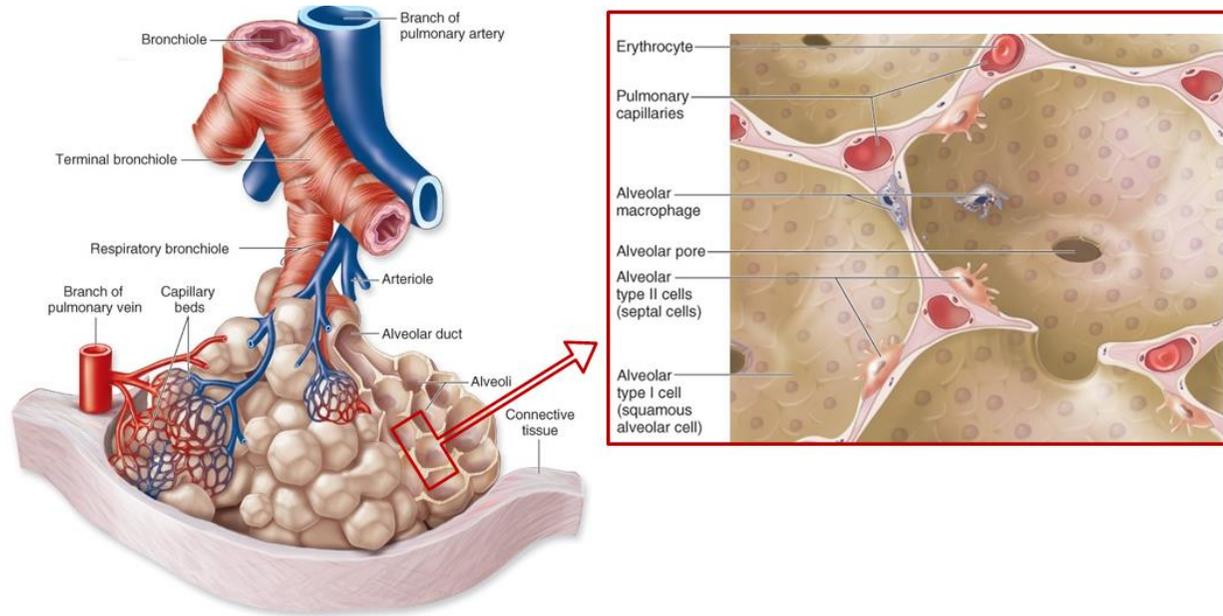


Figure 26 : Représentation de la structure des alvéoles pulmonaires (Modifié de [119]).

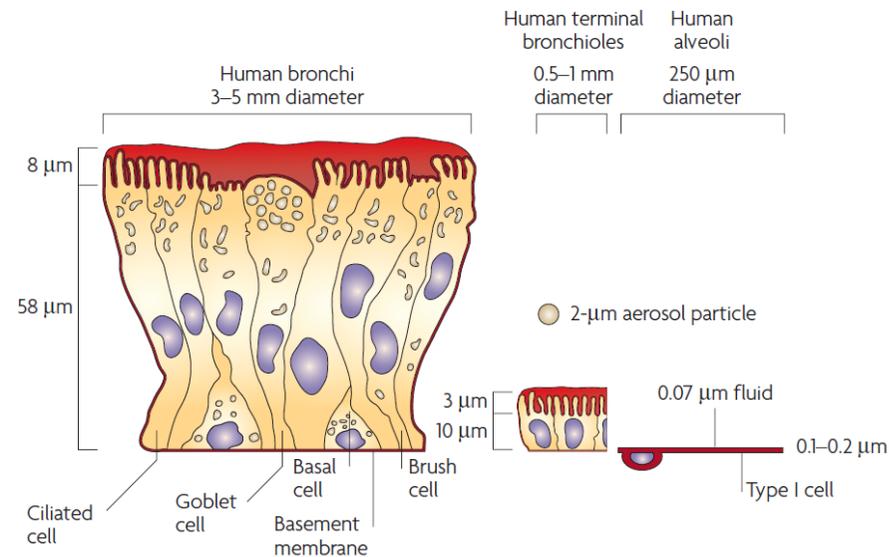


Figure 27: Représentation des différentes cellules épithéliales pulmonaires ainsi que des fluides qui tapissent l'épithélium pulmonaire suivant la zone des voies respiratoires [120].

La zone respiratoire (générations 17 à 23) comprend les bronchioles respiratoires, les canaux alvéolaires et les sacs alvéolaires. Les canaux alvéolaires sont généralement de 1 mm de longueur, formés par des groupes liés d'alvéoles [112]. Les sacs alvéolaires sont des chambres polyédriques ayant un diamètre moyen de 250 μm . Leur structure est comparable à celle d'une ruche d'abeille [112], chaque petite logette communiquant avec les autres via des pores alvéolaires (**Figure 26**). La fonction principale de cette zone est l'échange gazeux entre l'air inspiré et la circulation sanguine. Les caractéristiques physiques de la zone respiratoire la prédisposent à cette fonction. En effet, la surface totale de l'espace distal est approximativement de 100-120 m^2 (contre 2-3 m^2 pour la zone de conduction), ce qui augmente considérablement la surface de contact entre l'air inspiré et la zone d'échange gazeux [121]. De plus, l'épaisseur de la couche de cellules, qui constitue l'épithélium des voies respiratoires, est progressivement réduite à partir d'environ 60 μm , dans les voies respiratoires supérieures, à 0,1-0,4 μm au niveau des sacs alvéolaires. Il en est de même pour l'épaisseur des fluides tapissant ces structures cellulaires (**Figure 27**). Ces réductions favorisent également la diffusion des gaz et donc l'échange gazeux au niveau alvéolaire étant donné la faible épaisseur que les gaz doivent franchir [120]. En outre, la circulation pulmonaire est très dense et abondante au niveau des alvéoles et bronchioles respiratoires. Le système bronchique artériel provient de l'aorte thoracique qui émerge du ventricule droit où est acheminé via la veine cave le sang déchargé en oxygène suite à son trajet corporel. L'artère pulmonaire thoracique se subdivise ensuite en artères pulmonaires bronchiques qui alimentent les deux poumons (une artère pour le poumon droit et deux artères pour le poumon gauche). Ces artères bronchiques se divisent afin de perfuser l'entièreté du poumon. Chaque artère bronchique fournit au moins deux artères pour chaque bronche [122]. Au niveau des bronchioles terminales, les artères bronchiques se subdivisent en lits capillaires qui entourent les alvéoles (**Figure 26**). A ce niveau, les parois des capillaires sont à proximité immédiate de la membrane alvéolaire et, dans de nombreux cas, fusionnent directement avec celle-ci afin de faciliter la diffusion des gaz entre les deux compartiments (air/sang). De plus, le débit sanguin pulmonaire y étant très important, les échanges gazeux peuvent s'effectuer en continu [122]. Finalement, la pression partielle en oxygène au niveau des alvéoles est considérablement plus basse que celle observée dans le sang veineux circulant dans les capillaires alvéolaires qui, lui, est riche en dioxyde de carbone. Ces différences en pressions partielles couplées à la fine épaisseur séparant ces deux

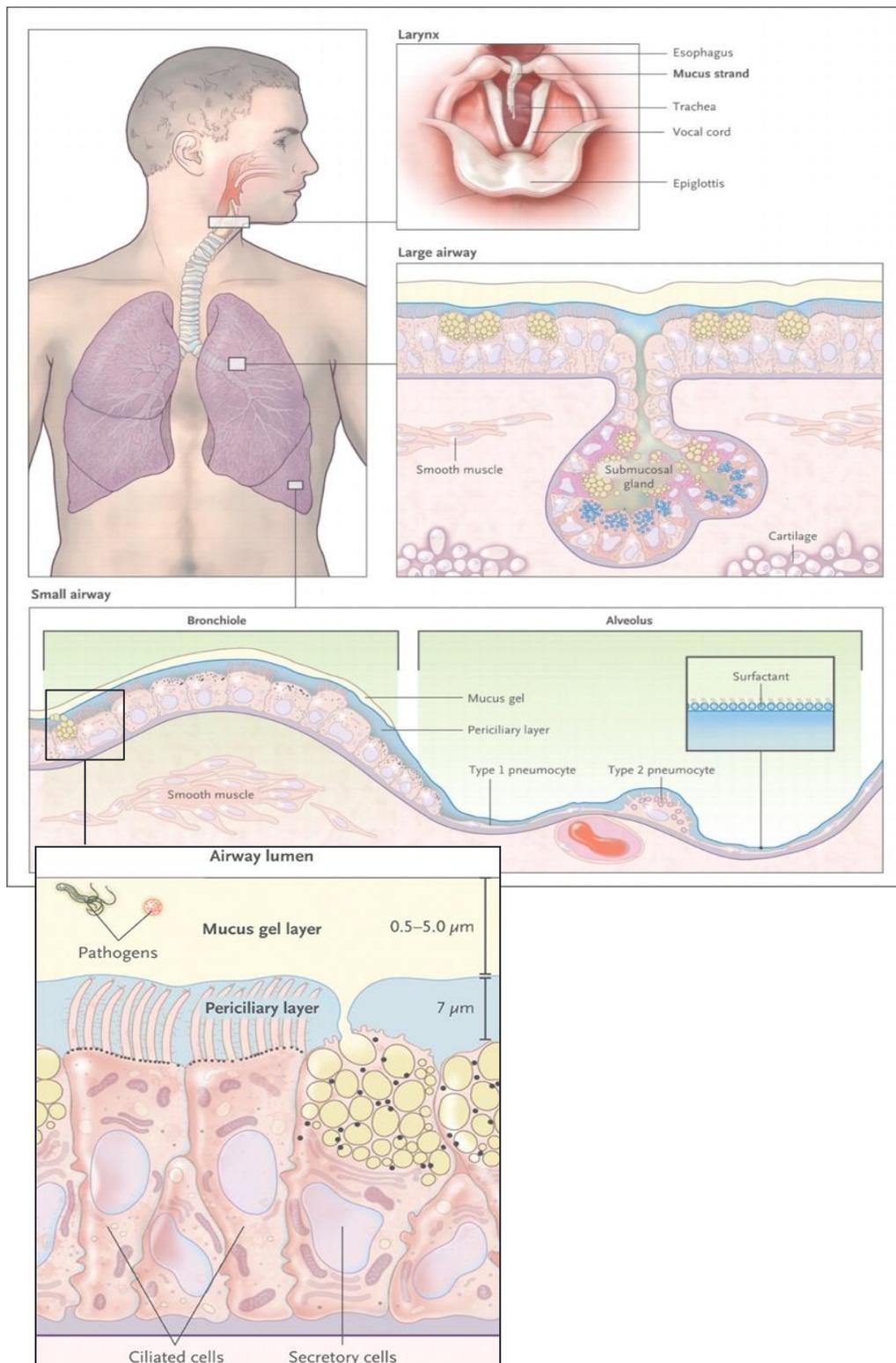


Figure 28 : Représentation structures cellulaires constituant l'épithélium pulmonaire et localisation des cellules qui secrètent les constituants du fluide pulmonaire (modifié de [123]).

« compartiments » permettent à l'oxygène de diffuser des alvéoles vers le sang alors que le dioxyde de carbone diffuse dans l'autre sens.

Ces particularités facilitent également l'absorption systémique des molécules atteignant la zone respiratoire après inhalation, ce qui est bénéficiaire en cas d'administration médicamenteuse à visée systémique. Par contre, ce mécanisme contribuera à éliminer le médicament rapidement du site d'administration, ce qui va diminuer le temps de résidence des substances à visée locale.

2.1.3. Structures cellulaires constituant l'épithélium pulmonaire

Les voies respiratoires sont recouvertes d'un épithélium qui sert principalement à séparer les structures sous épithéliales des voies aériennes de l'environnement extérieur (l'air et les particules inhalées). L'épithélium remplit ce rôle protecteur par (i) la sécrétion de mucus produit et renouvelé en continu via les battements ciliaires, ce qui empêche sa déshydratation, mais également l'adhésion et la stagnation de particules inhalées, d'endogènes et de pathogènes [124] (ii) la présence de jonctions serrées entre les cellules minimise la pénétration de substances inhalées entre les espaces intercellulaires vers l'espace sous-épithélial [125]. L'épithélium repose sur un chorion formé d'un tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux qui le sépare du tissu musculaire lisse et de la sous-muqueuse qui contient les glandes séro-muqueuses. Ces glandes exposent leurs canaux sécréteurs, qui produiront le mucus, au pôle apical de l'épithélium (**Figure 28**) [124]. Au niveau de leur partie externe, les voies respiratoires sont, au niveau de la trachée, constituées d'une succession de muscles lisses et d'anneaux cartilagineux incomplets (l'ouverture étant dirigée vers l'œsophage) en forme de fer à cheval leur conférant une certaine rigidité et les empêchant de se collapser. La présence de muscles lisses, reliant les anneaux cartilagineux incomplets, augmente progressivement à partir de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales pour devenir finalement une couche complète dans la partie terminale du poumon [122].

Le type de cellules (fonctionnalité et morphologie) constituant l'épithélium du tractus respiratoire varie suivant la zone pulmonaire concernée. Comme dit précédemment, l'épithélium des voies respiratoires est graduellement plus fin à mesure que l'on pénètre profondément dans le tractus respiratoire (**Figure 27**). Au niveau de la région

trachéo-bronchique (zone de conduction), on retrouve un épithélium pseudo-stratifié. Quatre types cellulaires majoritaires y sont retrouvés : les *cellules basales*, les *cellules ciliées*, les *cellules en gobelets* qui sont remplacées par les *cellules de Clara* dans la partie la plus terminale de la zone de conduction [122]. Au niveau de la *zone respiratoire*, le remplacement de l'épithélium bronchique par les structures alvéolaires se fait de manière progressive jusqu'aux alvéoles proprement dites. L'épithélium pseudo-stratifié de la zone trachéo-bronchique fait progressivement place, à partir des bronchioles terminales, à un épithélium simple cuboïde non cilié, pour finir par être simplement pavimenteux au niveau des alvéoles (pneumocytes de type 1) où l'on retrouve également des cellules cuboïdes, les pneumocytes de type 2 (**Figure 28**).

Les cellules basales sont des cellules pro-génitrices pyramidales qui se différencient par la suite en types de cellules retrouvées au niveau de l'épithélium [126]. Les cellules ciliées sont retrouvées jusqu'aux bronchioles respiratoires [122]. Elles permettent d'éliminer le mucus via le battement continu des cils exposés à leur pôle apical. Les cellules en gobelets qui sont interdispersées entre les cellules ciliées produisent des mucines (glycoprotéines) et participent ainsi, avec les glandes séro-muqueuses, à la constitution du mucus trachéo-bronchique et du liquide péri-ciliaire. Les cellules de Clara, quant à elles, contribuent également à la sécrétion des mucines, mais sont aussi impliquées dans différents rôles clés tels que la sécrétion de protéines contenues dans le surfactant pulmonaire, la détoxification des xénobiotiques (présence de cytochrome P450), la production d'inhibiteur des protéases, la régénération de l'épithélium et la production de cytokines. Les pneumocytes de type 1 sont majoritaires au niveau de la paroi alvéolaire. Ils ont pour rôle de garantir les échanges gazeux, facilités, comme précédemment expliqué, par leur fine paroi cytoplasmique ($\sim 0.2 \mu\text{m}$). Les pneumocytes de type 2 ont pour fonction primaire de sécréter les constituants du surfactant pulmonaire (section 2.1.4) et comme fonction secondaire de régénérer les pneumocytes de type 1. En effet, lors de leur division, ils peuvent soit proliférer en pneumocytes de type 2 ou se différencier en pneumocytes de type 1 pour aider à l'entretien et à la réparation de la surface alvéolaire [122]. Les pneumocytes de type 2 sont moins nombreux que les pneumocytes de type 1. Ils recouvrent seulement 5 à 10 % de la surface alvéolaire. Des macrophages alvéolaires sont également présents au niveau de la paroi

alvéolaire. Ils sont mobiles et ont pour rôle de phagocyter les particules, microorganismes ou débris cellulaires de l'espace alvéolaire (section 2.3.2).

2.1.4. Les fluides du tractus respiratoire

Traditionnellement, le mucus est considéré comme étant constitué de deux phases séparées par une couche de surfactant : la phase aqueuse péri-ciliaire qui est la moins visqueuse et la plus fluide (dans laquelle les cils peuvent battre aisément sans trop de résistance) et une phase de plus haute viscosité beaucoup plus riche en mucines et autres glycoprotéines [127]. Le mucus est constitué majoritairement d'eau (95 %) ainsi que de lipides (1 %), de protéines (1 %), de glycoprotéines (2 % – principalement des mucines) et de sels inorganiques (1 %) [127]. Les mucines jouent un rôle gélifiant qui confère au mucus sa nature visqueuse et y forme un réseau. Cela permet au mucus de piéger les particules de tous types inhalées qui s'y sont déposées, mais également de limiter leur pénétration jusqu'au liquide péri-ciliaire et à l'épithélium pulmonaire. Le déplacement de la phase péri-ciliaire au contact des cils en mouvement entraîne alors la phase plus visqueuse directement en contact avec l'air inhalé en direction proximale jusqu'au niveau du pharynx ou le liquide entraîné peut alors être dégluti. De ce fait, les corps étrangers tels que les agents thérapeutiques, les pathogènes dont les spores d'*aspergillus* susceptibles de s'y être déposés ainsi que les macrophages alvéolaires y ayant migrés sont ainsi éliminés (= clairance mucociliaire, section 2.3.1).

A mesure que l'on descend profondément dans le tractus respiratoire, la couche de mucus viscoélastique à la surface de l'épithélium pulmonaire est réduite et progressivement remplacée par le surfactant pulmonaire (**Figure 28**). Le rôle premier du surfactant est d'agir comme tensio-actif au niveau des alvéoles diminuant ainsi la tension superficielle à l'interface air-liquide. Cette réduction de la tension de surface empêche l'effondrement des alvéoles sur elles-mêmes durant l'exhalation, diminue la résistance pulmonaire lors de l'inspiration et facilite l'étalement et la stabilisation du mucus sécrété à la surface de l'épithélium pulmonaire [128, 129]. Le surfactant pulmonaire est composé de 85 à 90 % de phospholipides (dont plus de 70 % de phosphatidylcholine saturée composée à 40 % de dipalmitoyl phosphatidylcholine, 7 % de phosphatidylglycérine, 5 % de phosphatidylinositol et de phosphatidylsérine, 3 % de phosphatidyléthanolamine et 2 % de sphingomyéline), de 6 à

8 % de protéines (SP-A, SP-B, SP-C et SP-D), de 4 à 7 % de lipides neutres (essentiellement du cholestérol) et d'une petite fraction d'hydrate de carbone [130]. Parmi les protéines précitées, les protéines de type collectines SP-A et SP-D possèdent un rôle, dans l'immunité innée, important à soulever dans le cadre de l'aspergillose pulmonaire (section 2.3.6).

2.2. Paramètres influençant la déposition des particules inhalées

Lors de l'inhalation de particules et l'administration d'un médicament par inhalation orale, différents facteurs propres aux particules inhalées (taille, densité, forme, propriétés de surface, hygroscopie) et à la personne les inhalant (ventilation, morphologie, pathologie) peuvent influencer leur déposition au sein des poumons.

La zone du poumon où une particule inhalée va se déposer, ainsi que le mécanisme de déposition de cette particule, va dépendre du diamètre aérodynamique qu'elle présentera. Dans le domaine de l'inhalation, le diamètre aérodynamique (d_{ae}) est le moyen le plus approprié d'exprimer la taille des particules pouvant être inhalées, car il considère le comportement dynamique des particules dans un flux d'air, qui dépend de leur taille, leur densité et leur forme. Le d_{ae} peut être défini comme étant le diamètre d'une particule sphérique de densité unitaire ayant la même vitesse de dépôt que la particule mesurée [131]. Il est calculé selon la relation suivante :

$$d_{ae} = d \sqrt{\frac{\rho}{\rho_0 \chi}}$$

Où d = diamètre géométrique de la particule, ρ = densité de la particule et ρ_0 = densité de la particule sphérique de référence – 1 g/cm³, χ = facteur dynamique caractérisant la forme des particules (= 1 pour une particule sphérique).

Parmi les mécanismes de déposition directement influencés par le d_{ae} d'une particule inhalée, nous retrouvons l'impaction inertielle, la sédimentation et la diffusion.

L'impaction inertielle concerne principalement les particules inhalées dont le d_{ae} est supérieur à 5 μm . Ce mode de déposition se produit lorsque les particules en suspension dans un flux d'air possèdent une énergie cinétique suffisante pour maintenir leur trajectoire malgré les changements de direction brusques du flux d'air, consécutivement à la bifurcation des voies respiratoires. Les particules sont donc stoppées par collision avec les

parois de l'appareil respiratoire supérieur. Ce phénomène a donc lieu là où les bifurcations sont les plus abruptes et où le flux d'air est le plus turbulent, c'est-à-dire, au niveau de la région oropharyngée et des trois premières générations de l'arbre trachéo-bronchique (**Figures 24 et 25**).

La sédimentation concerne les particules dont le d_{ae} est compris entre 1 et 5 μm . C'est un processus pendant lequel les particules se déposent sous l'influence de la gravité. Elle est donc dépendante du temps et, par conséquent, les manœuvres permettant d'augmenter le temps alloué aux particules pour sédimenter, comme par exemple l'apnée post-inspiratoire, augmentent le taux de sédimentation et donc le taux de déposition pulmonaire après inhalation [132]. La sédimentation aura donc lieu pour les particules ayant échappé à l'impaction inertielle dans une zone du poumon où le temps de résidence est suffisamment long et où l'écoulement de l'air y pénétrant se fait de manière laminaire, c'est-à-dire de la génération 4 à la génération 23 des voies respiratoires inférieures (**Figures 24 et 25**). Il s'agit du mécanisme de déposition principale des particules inhalées permettant la déposition de particules des bronchioles jusqu'à l'espace alvéolaire.

La diffusion concerne les particules dont le d_{ae} est inférieur à 1 μm . Elle se produit lorsque les particules sont suffisamment petites pour échapper à la force gravitationnelle et sont, par conséquent, animées par un mouvement brownien. La déposition par diffusion a lieu principalement dans l'espace alvéolaire, c'est-à-dire dans les dernières générations bronchiques. Ici encore, l'apnée post-inspiratoire permet d'augmenter la probabilité de déposition par diffusion et donc, le taux de déposition pulmonaire. Toutefois, lorsqu'elles sont trop petites, les particules ont tendance à rester en suspension dans l'air inspiré assez longtemps que pour être éliminées pendant l'exhalation sans pouvoir migrer vers les parois pulmonaires [133].

Parmi les autres mécanismes de déposition existants, on retrouve l'interception, qui résulte d'une interaction non spécifique entre une particule inhalée et les parois du tractus respiratoire, même si le centre de masse de cette particule se déplace avec le flux d'air. L'interception dépend principalement de la forme du matériel inhalé et concerne principalement les matériels inhalés aciculaires [134]. Des interactions électrostatiques peuvent également causer l'arrêt des particules inhalées dans le tractus respiratoire.

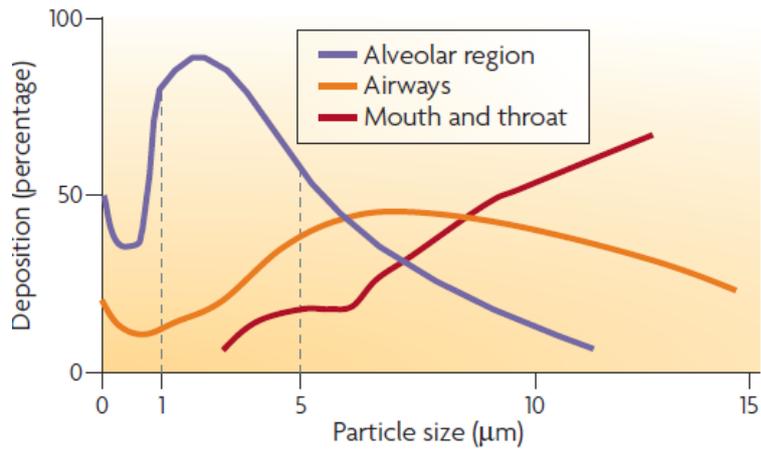


Figure 29 : Effet de la taille des particules sur la déposition des aérosols dans le tractus respiratoire humain après une inhalation lente et une pause post inspiratoire de 5 secondes. Les particules les plus larges ($> 5 \mu\text{m}$) sont majoritairement déposées dans la région oropharyngée et dans les trois premières générations de l'arbre trachéo-bronchique alors que les particules plus fines ($< 5 \mu\text{m}$) atteignent majoritairement la région broncho-alvéolaire. Les particules inférieures à $1 \mu\text{m}$ peuvent être exhalées réduisant considérablement leur déposition pulmonaire après inhalation. [120]

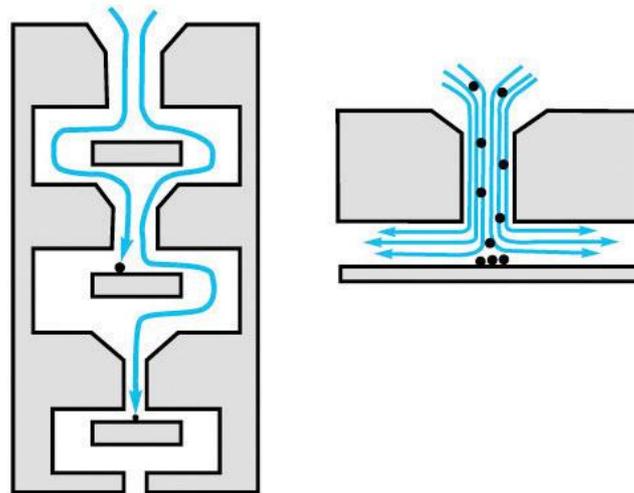


Figure 30 : Mécanisme de déposition des particules dans un impacteur [135]

L'apparition de ces interactions dépendra donc des propriétés de surface et surtout de la charge du matériel inhalé.

Dès lors, on comprend bien que, pour qu'une délivrance de médicament au sein du système respiratoire inférieur soit optimale, les particules inhalées doivent présenter idéalement un d_{ae} qui se situe entre 1 et 5 μm (**Figure 29**). Elles doivent être suffisamment petites pour éviter les phénomènes d'impactions inertielles et pénétrer dans le poumon tout en étant suffisamment grandes pour éviter d'être éliminées durant l'exhalation. Il a été démontré que le d_{ae} idéal permettant d'atteindre spécifiquement la zone respiratoire se situe entre 1 et 3 μm [136].

La Pharmacopée européenne recommande de caractériser les formes pharmaceutiques destinées à être administrées par inhalation orale sous forme d'aérosol, par le d_{ae} médian massique (MMAD) du nuage d'aérosol généré dans des conditions standards d'évaluation et par leur fraction de particules fines ou dose de particules fines (FPF et FPD, respectivement). Ces paramètres sont déterminés lors de la réalisation de tests d'impaction effectués conformément aux recommandations de la pharmacopée. Ces méthodes sont basées sur le fractionnement et la collecte de particules sur les plateaux d'un impacteur multi-étages après émission de la formulation à partir d'un dispositif pour inhalation dans des conditions standards mimant une inspiration. Le principe de base de ces impacteurs repose sur le passage d'un flux d'air ayant entraîné les particules au niveau du dispositif pour inhalation à travers des orifices de plus en plus étroits séparés par des plateaux dits d'impaction. A mesure que l'on pénètre plus profondément dans l'impacteur, le flux d'air est de plus en plus rapide. Ainsi, l'impacteur est capable de fractionner les particules inhalées qui, suivant l'énergie cinétique qu'elles auront emmagasinée, s'impacteront sur un plateau d'impaction plutôt que de continuer leur chemin avec le flux d'air vers les étages d'impaction suivants (**Figure 30**). Chaque appareil est calibré de sorte que, pour un flux d'air déterminé, chaque étage récolte la fraction du nuage d'aérosol présentant un d_{ae} seuil bien défini. Par la réalisation de ces tests d'impaction, le MMAD, la FPD et la FPF des formulations pour inhalation peuvent alors être calculés. Le MMAD correspond au d_{ae} pour lequel 50 % des particules (exprimé en masse) déposées dans l'impacteur ont un diamètre inférieur et 50 % ont un diamètre supérieur. La FPD correspond à la masse de principe actif déposée dans l'impacteur présentant un d_{ae} inférieur à 5 μm .

Cette masse peut être exprimée en pourcents (FPF) en fonction de la dose nominale en principe actif ou de la dose émise et récoltée dans l'impacteur. La FPF permet de comparer directement les performances de différentes formulations quelle que soit leur teneur en principe actif.

L'hygroscopie des particules inhalées peut également modifier leur site de déposition. En effet, le mucus pulmonaire ainsi que la vapeur ubiquitaire du poumon génèrent un taux d'humidité très élevé au sein des voies respiratoires (HR ~ 99,5 %). De ce fait, les particules fortement hygroscopiques inhalées vont voir leur d_{ae} et donc leur zone de déposition modifiés en pénétrant dans le tractus respiratoire [137].

Le site de déposition et l'étendue de dépôt pulmonaire de particules dépendent également du mode et de l'intensité d'inspiration du patient [138, 139]. Une inhalation rapide à haut débit peut conduire à une accentuation du phénomène d'impaction oropharyngée. Comme vu précédemment, plus le temps de séjour des particules inhalées est long, plus la probabilité de déposition par sédimentation gravitationnelle et de diffusion augmente dans les voies respiratoires inférieures. Ce temps de séjour peut être augmenté en effectuant une inspiration lente et profonde suivie d'une pause respiratoire de 5 à 10 secondes. L'application de cette pause post-inspiratoire peut résulter en une augmentation de 50 à 75 % du taux de déposition des particules inhalées de d_{ae} compris entre 1 et 5 μm [139]. La morphologie individuelle de la zone oropharyngée et des voies respiratoires de chaque patient va également influencer les zones de déposition des particules inhalées. Les variations de taille, de forme et de diamètre des différentes générations du système respiratoire créent des différences structurelles et volumétriques inhérentes à chaque individu [140] pouvant influencer le profil de déposition de particules ayant le même d_{ae} entre deux individus. Des variations morphologiques consécutives à des pathologies respiratoires comme la BPCO, l'asthme ou la mucoviscidose, qui sont des pathologies pouvant mener à une aspergillose pulmonaire, peuvent également modifier le flux d'air et la pénétration d'aérosol au sein du tractus respiratoire étant donné que la déposition des particules inhalées dépend fortement des flux d'air qui les transportent [141]. Par exemple, il a été montré que, chez des patients souffrant de crises d'asthme, le rétrécissement de la zone pharyngée est associé à une forte augmentation de la déposition par impaction à ce niveau et donc, à une diminution de la dose de médicament inhalée dans le poumon [142].

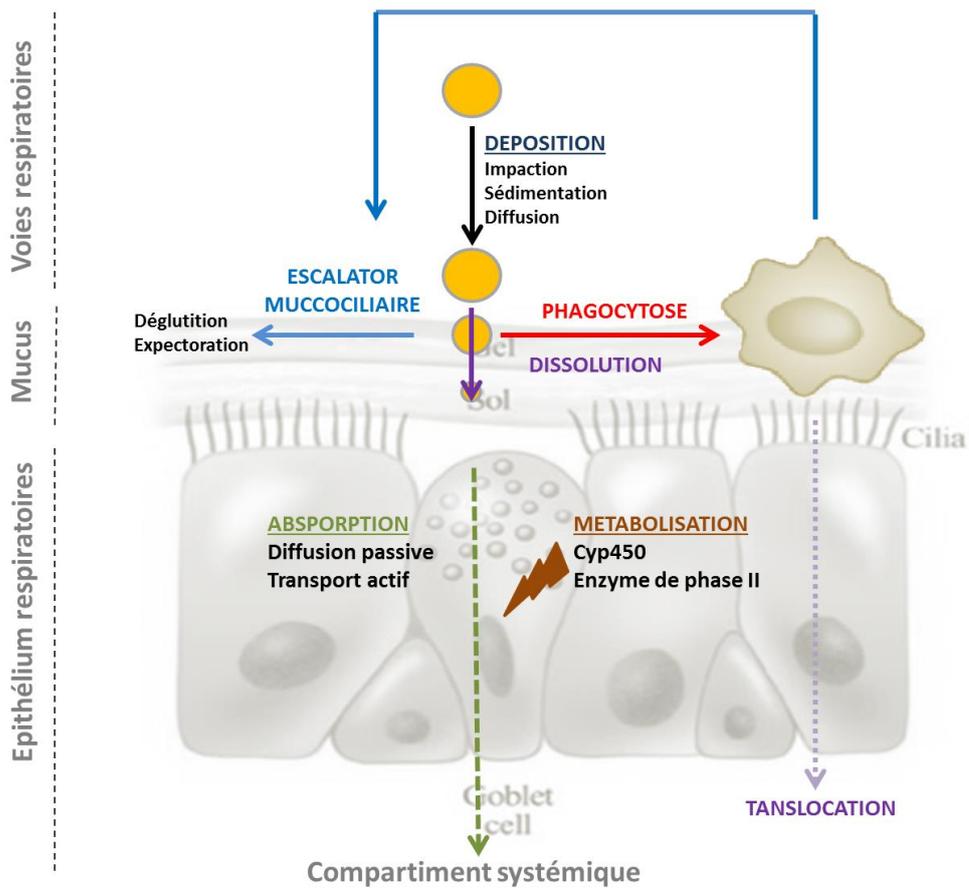


Figure 31 : Représentation des différents systèmes de clairance pulmonaire (modifié de [143]).

A l'inverse, l'obstruction des voies bronchiques plus profondes, notamment observée en cas de BPCO, peut y augmenter le taux de déposition en favorisant les phénomènes d'impaction et de sédimentation dus aux altérations du flux d'air et au rétrécissement des voies aériennes consécutifs à cette pathologie [144].

2.3. Devenir des particules inhalées

Une fois déposées au sein du tractus respiratoire, les particules inhalées vont être éliminées via différents systèmes de clairance pulmonaire (**Figure 31**), c'est-à-dire, l'escalator mucociliaire, la phagocytose par les macrophages, l'absorption et la métabolisation. Les points suivants détaillent ces différents systèmes d'élimination. La clairance totale du poumon est considérée comme étant l'addition des clairances absorbative et non-absorbative. Un point particulier concernant la dissolution et la solubilité des particules inhalées est également exposé. Le devenir des spores d'*aspergillus* après inhalation y est également décrit.

2.3.1. La clairance mucociliaire et l'expectoration (« mucociliary clearance and cough clearance »)

Comme cela a été évoqué dans les chapitres précédents, la clairance mucociliaire consiste en une évacuation continue du mucus tapissant l'épithélium pulmonaire dans une direction proximale sous l'action du battement des cils présents à la surface de l'épithélium. Une fois à l'entrée de la trachée, le mucus et les particules qu'il contient sont soit déglutis ou expectorés (**Figure 28**). Quand des particules sont déposées dans le poumon, elles vont pénétrer le mucus, suivre sa direction étant donné qu'il est déplacé en continu, en même temps s'y dissoudre, et dès lors se diffuser pour être absorbées (section 2.3.4) ou être éliminées par déglutition/expectoration. La vitesse de déplacement du mucus est d'environ 1 mm/min dans la zone périphérique et s'accélère à mesure que l'on remonte dans le tractus respiratoire pour atteindre une vitesse d'environ 20 mm/min au niveau de la trachée [145]. Les particules ainsi déposées dans la partie périphérique du poumon seront éliminées plus lentement que celles déposées dans une zone plus proximale. L'élimination de particules par l'escalator mucociliaire peut s'étaler de 2 à 24 h [146].

2.3.2. Les Macrophages alvéolaires

Les substances non dissoutes ou les substances qui se dissolvent lentement au niveau de l'espace broncho-alvéolaire auront tendance à se faire phagocyter par les macrophages qui y sont présents en nombre important (~10 macrophages patrouillant dans le surfactant de chacune des ~500 millions d'alvéoles présentes dans les poumons [147]). Une fois phagocytées, les macrophages vont alors détruire les particules par dégradation enzymatique et/ou les transporter vers l'escalator mucociliaire ou vers les canaux lymphatiques trachéo-bronchiques par translocation [148, 149]. Différents facteurs tels que la taille, la forme géométrique, la structure chimique ou les propriétés antigéniques des particules inhalées favorisent ou inhibent la phagocytose par les macrophages. La taille particulaire optimale pour être phagocyté se situe entre 0.5 et 5 μm (les macrophages alvéolaires mesurant 15-22 μm) [150]. Au-dessus de 6-10 μm et en deçà de ~ 0.2 μm , il semblerait que la phagocytose par les macrophages alvéolaires soit évitée [151, 152]. Il a été rapporté que la forme géométrique des particules et l'orientation avec laquelle elles sont présentées aux macrophages peuvent influencer l'activation de la phagocytose [153]. Cependant, les facteurs clés à ce sujet ne sont pas encore tout à fait élucidés. La pégylation des particules les rend également moins susceptibles à la phagocytose par les macrophages [109].

2.3.3. La métabolisation pulmonaire

Bien que majoritairement exprimés au niveau des cellules hépatiques et des entérocytes, les enzymes de détoxification de la famille des cytochromes P450 sont également présentes au niveau du poumon. Tout comme dans les autres organes, les cytochromes présents le sont sous différentes isoformes, mais à un taux d'expression considérablement inférieur (10 à 20 x) à celui du foie [137]. Au niveau du poumon, les cytochromes P450 1B1, 2B6, 2E1, 2J2, 3A5, 2S1 et 1A1 prédominent [154]. L'expression du cytochrome P450 3A4 y est négligeable [155]. Des enzymes de phase II sont également présentes au niveau du parenchyme pulmonaire à un taux inférieur (à l'exception des sulfotransférases et de certaines estérases) à celui observé au niveau des hépatocytes [155]. La contribution du métabolisme pulmonaire à la clairance totale d'une substance inhalée est généralement considérée comme négligeable. Toutefois, certaines molécules comme le

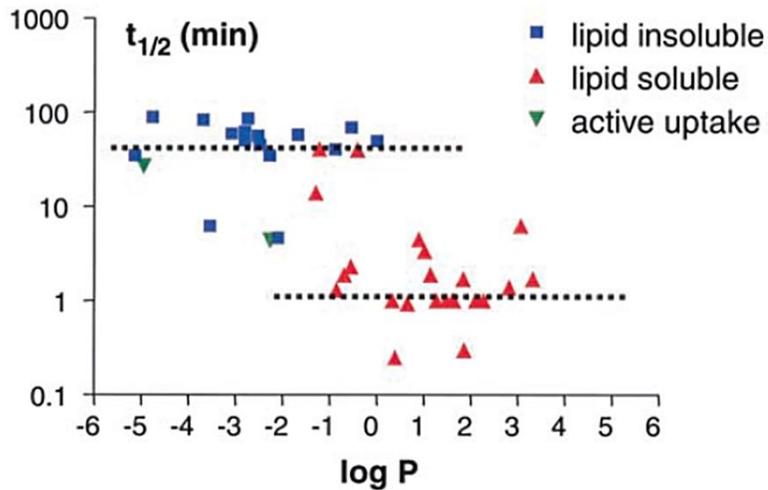


Figure 1. Pulmonary absorption data from Schanker and colleagues (30–45), demonstrating that the rate of drug absorption from the lungs is dependent on drug lipophilicity. Here, $t_{1/2}$ represents the time taken for absorption of 50% of the initial dose through the lung following intratracheal administration in rats, and $\log P$ represents the octanol-water partition coefficient. Molecules characterized by Schanker and coworkers as lipid-insoluble or as lipid-soluble are shown as *squares* and *triangles*, respectively. Molecules with active uptake are denoted by *inverted triangles*.

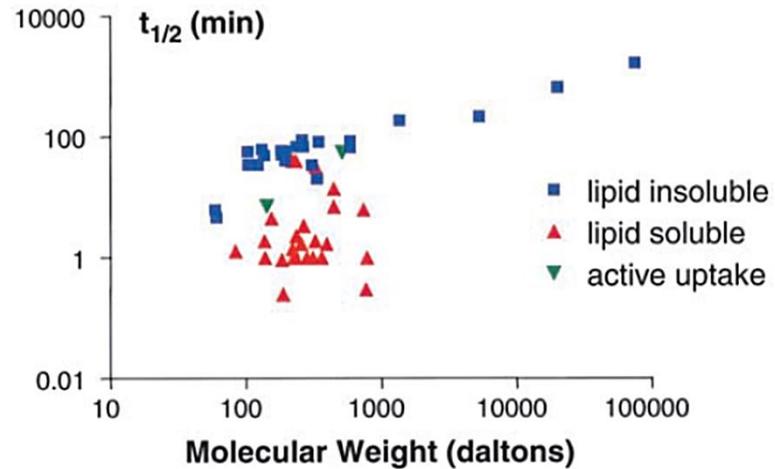


Figure 2. Relationship between molecular weight and rate of absorption through the lung (data from Schanker and coworkers [30–45]). Molecules characterized by Schanker and colleagues as lipid-insoluble or as lipid-soluble are shown as *squares* and *triangles*, respectively. Molecules with active uptake are denoted by *inverted triangles*.

Figure 32: Données reprises et cumulées des différents travaux de *Schanker et ses collaborateurs* illustrant l'influence du $\log P$ (gauche) et du poids moléculaire (droite) sur le $t_{1/2}$ d'absorption des molécules après administration pulmonaire chez l'animal [156].

budésonide, le formotérol ou la théophylline sont fortement métabolisées aussi au niveau du poumon après inhalation ce qui peut avoir un impact sur leur comportement PK ou le profil d'activité de la molécule [155]. Par exemple, le budésonide est conjuguée par estérification avec un acide gras par les enzymes métaboliques pulmonaires [157]. Cette biotransformation résulte en une accumulation de la forme estérifiée du budésonide dans les cellules et donc à un temps de résidence pulmonaire plus élevé [158]. Des systèmes de « prodrug » sont également rapportés. L'exemple le plus connu est celui du béclométhasone dipropionate qui une fois administré et dissout est métabolisé en béclométhasone monopropionate qui est la forme la plus active [159]. La capacité métabolique pouvant être différente d'un individu à l'autre, il paraît donc important de pouvoir élucider lors du développement d'un nouveau médicament, les mécanismes de biotransformation auxquelles ils peuvent être soumis dans le poumon après administration par inhalation. De plus, certains facteurs extérieurs, comme le tabagisme, peuvent également modifier le métabolisme pulmonaire (notamment par induction des cytochromes) et avoir un impact direct sur la clairance de substances inhalées [160].

2.3.4. L'absorption

L'absorption pulmonaire peut avoir lieu par diffusion passive ou transport actif (formation de pores, transport vésiculaire, transporteurs para- et trans-cellulaires). Schanker et ses collaborateurs ont effectués toute une série de travaux qui ont permis de mettre en évidence les principaux facteurs régissant la vitesse d'absorption et les mécanismes via lesquels les molécules sont absorbées du poumon vers le sang [156]. Comme on peut observer sur la **figure 32** il y a une augmentation très marquée du $t_{1/2}$ d'absorption (temps pour absorber la moitié de la dose administrée au poumon) des différentes molécules testées lorsque leur log de P est inférieure à zéro. Les molécules « lipophiles » ($\log P > 0$) sont rapidement absorbées (de quelques secondes à quelques minutes) alors que les molécules « hydrophiles » ($\log P < 0$) le sont nettement plus lentement (plusieurs dizaines de minutes à une heure). Toutefois, cette relation n'est valable que pour les petites molécules (de 100 à 1000 Da), car au-delà de 1000 Da une augmentation considérable du $t_{1/2}$ d'absorption est observée (**Figure 32**). La facilité des molécules lipophiles à traverser les doubles couches lipidiques des membranes cellulaires épithéliales explique facilement cette rapidité d'absorption. Elles sont absorbées de manière trans-épithéliale en diffusant

passivement du pôle apical au pôle basolatéral des cellules. Les molécules hydrophiles sont, elles, incapables d'emprunter ce chemin. Elles sont absorbées via la voie para-cellulaire en diffusant au travers de pores formés dans les jonctions serrées présentes entre les cellules. Le poids moléculaire ainsi que le degré d'ionisation de ces molécules hydrophiles semblent influencer la vitesse à laquelle elles sont absorbées via ce mécanisme. Les mécanismes de diffusion passive du poumon ne sont généralement pas saturables. Il existe toutefois des exceptions, c'est-à-dire des petites molécules (< 1000 Da) qui résident longtemps au niveau du poumon. C'est le cas des petites molécules insolubles pouvant stagner dans le fluide pulmonaire sans se dissoudre totalement. L'influence de la solubilité des particules inhalées va être discutée dans le point suivant. Des interactions spécifiques, pouvant avoir lieu entre une molécule et le milieu environnant peuvent également favoriser la rétention pulmonaire et ainsi diminuer la vitesse d'absorption.

Les mécanismes exacts et les voies d'absorption pulmonaire des macromolécules restent largement inconnus. Il n'est pas certain que les peptides, comme l'insuline et les protéines soient absorbés principalement para-cellulairement via les jonctions serrées ou para-cellulairement via des transporteurs. Les mécanismes de transport actif ont été largement moins étudiés. Cela est probablement dû à la difficulté d'établir des modèles de cultures cellulaires *in vitro* représentatifs étant donné la diversité cellulaire ainsi qu'à la modification progressive et drastique de la composition de l'épithélium bronchique dans les différentes zones du tractus respiratoire. Toutefois, durant la dernière décennie, le rôle des transporteurs dans l'absorption systémique de substances inhalées a largement été mis en avant [161]. Ils facilitent le passage d'une substance au travers de la membrane plasmique et permettent donc leur accumulation dans la cellule. Les transporteurs travaillent généralement de concert avec les pompes à efflux et le phénomène de diffusion pour réguler la concentration intracellulaire et donc l'absorption d'une substance [162].

2.3.5. Influence de la dissolution et de la solubilité des particules inhalées

Comme on vient de le décrire, une fois déposée dans le poumon, une particule non dissoute sera évacuée par l'escalator mucociliaire ou phagocytée par les macrophages alvéolaires (dépendamment de leur site de déposition). Une fois dissoute dans le mucus ou le surfactant pulmonaire, la substance en solution soit sera absorbée au travers de

l'épithélium, soit restera localisée au niveau des tissus, soit passera vers le compartiment systémique tout en étant susceptible d'être métabolisée. Etant donné que les caractéristiques physicochimiques des particules inhalées vont influencer leur mouillabilité, leur vitesse de dissolution et leur fraction solubilisée dans les fluides pulmonaires, elles conditionneront également les systèmes de clairance par lesquels ces particules seront prises en charge. Par conséquent, la formulation galénique peut grandement influencer le devenir des particules inhalées en modifiant ses propriétés physicochimiques.

Pour les composés solubles administrés par inhalation, la vitesse de dissolution n'est pas considérée comme pouvant influencer la vitesse de clairance pulmonaire. Ce type de substance va rapidement être dissous dans les fluides pulmonaires puis absorbé à une vitesse dépendant de ses caractéristiques physicochimiques et du mécanisme par lequel elle traversera l'épithélium (section 2.3.4.). Une fois dissoutes dans le fluide pulmonaire, ces molécules vont constituer une sorte de réservoir à partir duquel elles vont être absorbées à une certaine vitesse suivant leur lipophilie ($\log P$), leur poids moléculaire et les interactions spécifiques auxquelles elles peuvent être sujettes avec le milieu environnant. Seules les formulations ayant pour but de contrôler ou retarder la libération du principe actif, de modifier sa zone de déposition pulmonaire ou même de générer des interactions avec le milieu environnant (protéines, macrophages...) augmentant son temps de résidence au niveau sus épithélial pourraient en modifier le profil PK après administration par inhalation [163]. De ce fait, lors de l'administration pulmonaire de substances très solubles visant une action locale, diverses stratégies de formulations visant à augmenter le temps de rétention et à minimiser l'absorption pulmonaire consécutive à leur haute solubilité peuvent être envisagées afin de réduire les fréquences d'administration nécessaires au maintien de concentrations pulmonaires suffisamment élevées [164]. De nombreux principes de formulation ont été développés dans ce sens comme, par exemple, l'encapsulation de l'agent thérapeutique dans des liposomes administrables par nébulisation ou sous forme de poudres sèches [165-167], l'utilisation de polymères (PLGA, PLA, PEG,...) pour former des microparticules encapsulant la substance active ou recouvrant leur surface alors qu'elles sont déjà sous forme micronisée, ou même encore la pégylation des substances actives [168]. Un cas particulier est celui des macromolécules (protéines, peptides) qui peuvent s'agréger au contact des protéines hydrophobes contenues dans le surfactant et par

conséquent, voir leur solubilité fortement diminuée et leur susceptibilité d'être phagocytées par les macrophages augmentée [156]. Certaines molécules hydrophiles peuvent également se dissoudre dans le mucus pulmonaire sans être absorbées, dès lors, leur temps de résidence dépendra de l'efficacité du système mucociliaire [109].

A l'inverse, pour les composés peu solubles, la solubilité et la vitesse de dissolution peuvent être des facteurs modifiant leur profil PK en variant la fraction de particules déposées sous forme dissoute [163]. De manière générale, une fois déposées dans le poumon, le profil PK de telles substances est caractérisé par une absorption très rapide (étant donné leur log P qui est généralement élevé), suivie par une phase d'absorption prolongée dans le temps [163]. Ceci s'explique par le fait que le volume du fluide pulmonaire (10-30 ml chez un individu sain) est, pour les substances faiblement solubles, généralement insuffisant que pour pouvoir dissoudre la totalité de la dose déposée dans le poumon. Une fois déposées, la fraction des particules qui sera dissoute, sera absorbée extrêmement rapidement alors que la vitesse d'absorption de la fraction non dissoute sera directement dépendante de sa solubilité et de sa cinétique de dissolution [169]. Il y aurait donc une balance entre la concentration dissoute et la fraction non dissoute qui pourra être maintenue à mesure que la substance est absorbée et ce, en fonction de sa solubilité et de sa cinétique de dissolution. Le comportement PK typique de substances insolubles est parfaitement illustré après l'administration du propionate de fluticasone (solubilité $\sim 0.13 \mu\text{g/ml}$; $\log p \sim 4.5$) sous forme de particules sèches micronisées administrées telles quelles via un inhalateur ou en suspension dans un aérosol pressurisé. Après administration par inhalation de doses comprises entre 200 et 1000 μg , une rapide absorption est observée avec des C_{max} ne dépassant pas $0.35 \text{ ng/ml}_{\text{plasma}}$ atteintes entre 0.9 et 1.88 h (traduisant le faible taux d'absorption de cette molécule consécutivement à la faible proportion de la dose administrée sous forme dissoute) [163]. Cette étude a montré que la phase d'absorption rapide était ensuite suivie par une absorption prolongée dans le temps. Toutefois, 10 % de la dose déposée était toujours présente après 12 h. Le temps de rétention pulmonaire du propionate de fluticasone administré sous forme de poudre sèche peut atteindre 20 h consécutivement à sa faible solubilité et à sa lente dissolution dans les fluides pulmonaires [158, 170]. Dans le même sens, il a été observé que le temps moyen d'absorption pulmonaire après inhalation sous forme de poudre sèche du propionate de fluticasone

(5-7 h) était plus long que celui du budésonide (1h) qui est plus soluble [171]. Il a été suggéré que, pour les substances micronisées lipophiles, la vitesse d'obtention de la concentration maximale systémique (t_{max}) est directement corrélée avec leur solubilité intrinsèque [163]. L'inclusion d'excipients, permettant d'augmenter la solubilité et la mouillabilité des composés inhalés insolubles (cyclodextrine, surfactants, phospholipides permettant la formation de liposomes) et donc d'accélérer leur vitesse de solubilisation, semble également permettre d'accélérer la vitesse ainsi que (de manière moins systématique) le taux d'absorption des mêmes substances sans excipients [163].

Dès lors, à ce niveau, l'enjeu de la formulation pharmaceutique est considérable du point de vue de l'intensité et de la durée de l'action pharmacologique de la substance inhalée. En effet, la proportion de substance non dissoute va donc être plus susceptible d'être éliminée par l'escalator mucociliaire et par les macrophages alvéolaires réduisant ainsi la dose potentiellement active. La vitesse d'élimination de la fraction non dissoute de composés faiblement solubles peut énormément varier de plusieurs heures à plusieurs jours [156]. En cas d'administration à visée locale, une cinétique de dissolution lente peut s'avérer bénéfique, car elle permettrait d'augmenter le temps d'exposition au niveau du poumon. Toutefois, au plus la particule va stagner dans le fluide pulmonaire, au plus elle sera éliminée via les systèmes de clairance non absorbatifs. Il est évident que l'augmentation de la solubilité permettrait d'augmenter la fraction dissoute du composé et donc, en plus d'augmenter son potentiel pharmacologique, minimiserait la fraction éliminée par les systèmes de clairance non absorbatifs. Il s'agit alors de trouver, via différentes stratégies de formulation, la balance optimale permettant un temps de rémanence suffisamment long et une absorption systémique non désirée suffisamment basse. Ce problème sera un des enjeux majeurs de notre travail qui concerne justement la formulation sous forme de poudres sèches pour inhalation d'une substance insoluble, l'ITZ.

2.3.6. Inhalation de spores, devenir et interaction avec le milieu environnant

La contamination pulmonaire par *Aspergillus* se fait, comme il a été expliqué précédemment, par inhalation des spores émises dans l'atmosphère. Pour rappel, ces spores présentent un d_{ae} compris entre 1,9 et 6 μm et peuvent donc être déposées aux différents niveaux du tractus respiratoire. Une fois déposées, le poumon va essayer de les éliminer via

ses mécanismes de défenses pour les empêcher de germer et de détruire les cellules puis les membranes basales de l'épithélium pulmonaire via la production de toxines et d'enzymes (protéases, phospholipases, élastases, gliotoxines, aflatoxines,...) [5]. Les spores d'*A. flavus* et *A. Niger* présentent des tailles plus importante que celles d'*A. fumigatus* (3-5 μm Vs 1,9-3 μm). Par conséquent, elles sont préférentiellement déposées au niveau de la zone de conduction et sont plus facilement éliminées des poumons par l'escalator mucociliaire. A l'inverse, les spores d'*A. fumigatus* pénètrent beaucoup plus profondément les voies respiratoires et peuvent atteindre la zone broncho-alvéolaires [5]. La plupart des souches d'*Aspergillus*, et particulièrement *A. fumigatus*, sont capable via la production de toxines de diminuer l'efficacité d'élimination mucociliaire en ralentissant la fréquence de battement des cils et en dégradant l'épithélium [172]. Comme nous l'avons cité préalablement, le surfactant pulmonaire contient des protéines de type collectines secrétées par les pneumocytes de type II et les cellules de Clara (SP-B et SP-C). Ces protéines sont capables de lier et d'agglutiner les spores d'*aspergillus* déposées au sein du tractus respiratoire après inhalation qui sont susceptibles de germer. Cela a pour effet d'activer le système du complément, d'accentuer la phagocytose, la destruction et la dégradation oxydatives des spores auxquelles elles sont liées via les macrophages alvéolaires et les neutrophiles [173, 174]. Elles participent donc pleinement à leur élimination initiale après déposition, mais également à la reconnaissance et à l'élimination des fragments d'hyphes susceptibles de s'être développés. Une protéine qui joue un rôle similaire, mais qui est secrétée par le foie et qui est retrouvée dans le poumon est la « mannose binding lectine ». De plus, étant des acteurs complets de l'immunité, les macrophages présentent à leur surface des récepteurs « pattern recognition receptors » tels que les « Toll-like receptors 4 et 2 » et le « dectin-1 receptor » [5]. Ils sont capables de reconnaître directement (ou via l'intermédiaire des collectines) des domaines antigéniques caractéristiques de la membrane fongique *aspergillaires*. Ils activent alors l'attachement, l'engloutissement et l'élimination du pathogène ainsi que les synthèses des chémokines et cytokines recrutant les acteurs de l'immunité cellulaire (dont les neutrophiles). Finalement, l'épithélium pulmonaire en lui-même constituerait un élément actif de l'élimination des spores. Les cellules bronchiques et les pneumocytes de type II seraient capables de reconnaître et d'internaliser les spores adhérant à leur surface pour former un phagolysosome capable de les dégrader [175]. Les spores restent cependant « viables » pendant plus de 20 heures dans le phagolysosome

et peuvent parfois germer au sein de la cellule [176]. Il a été démontré que le champignon en se développant peut franchir la barrière épithéliale de manière intracellulaire via cette voie, mais également en pénétrant dans la cellule après avoir germé [177]. Il peut également la franchir via les espaces intercellulaires [177]. Les hyphes se développant à la surface de l'épithélium peuvent eux aussi être reconnus par les cellules épithéliales ce qui active la production de défensines actives à leur égard ainsi que de chémokines et cytokines pouvant initier une réaction immunitaire cellulaire [178].

3. Stratégies et objectifs de formulations envisagés pour le traitement de l'aspergillose pulmonaire par inhalation

3.1. Choix du principe actif à formuler

Malgré la prédominance du VCZ dans la thérapie et du PSZ dans la prophylaxie de l'aspergillose pulmonaire, dans le cadre de ce travail, notre attention s'est portée sur l'ITZ. En effet, l'efficacité de cette molécule est non négligeable [179]. Cette substance est d'ailleurs toujours recommandée dans les traitements à long terme de l'aspergillose pulmonaire chronique, de l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique et dans les traitements de maintien de l'aspergillose pulmonaire invasive [21, 22]. Nous pensons que deux facteurs majeurs sont liés à sa progressive éviction de l'arsenal thérapeutique et que l'administration pulmonaire permettrait d'outrepasser ces problèmes et donc de potentialiser au maximum l'activité de cette molécule. Le premier problème est sa faible biodisponibilité orale, très erratique sous forme de gélule, qui sans contrôle plasmatique (comme largement évoqué dans les points précédents) peut mener à des concentrations sub-optimales ou toxiques. Outre ces deux causes évidentes de la minimisation du potentiel thérapeutique de l'ITZ, cette molécule, comparativement au VCZ, pénètre beaucoup moins bien les tissus pulmonaires après administration orale ou IV [91] et cible donc moins efficacement les lésions pulmonaires après son administration via ces voies classiques. De plus, comme vu précédemment, l'ITZ administré par inhalation sous forme de suspension de NP s'est déjà avéré efficace dans un contexte prophylactique d'API dans des modèles murins précliniques [100, 103]. Plus récemment, il a été démontré dans un modèle *in vitro* d'alvéole pulmonaire que l'administration d'ITZ directement sur la surface des alvéoles permettait

d'obtenir un effet antifongique sur une souche d'*Aspergillus* résistante. Cet effet était accentué par la co-administration d'un autre antifongique dans le compartiment dit systémique par additivité [95]. L'ITZ est donc un bon candidat à l'administration pulmonaire. Toutefois, ITZ présente un important désavantage qui est sa très faible solubilité, évaluée à 8 ng/ml à 37°C dans un liquide mimant le surfactant pulmonaire [180]. Cette faible solubilité pourrait, après inhalation, mener à une proportion de dose dissoute trop faible par rapport à la dose déposée dans le poumon et donc, à une fraction active minimale par rapport à la fraction éliminée via les mécanismes de clairance non-absorptives. Nous avons dès lors, dans nos concepts de formulation, intégré une stratégie permettant d'accélérer la cinétique de dissolution et d'augmenter sa solubilité afin de maximiser au mieux la proportion de la dose capable de se solubiliser une fois déposée dans le poumon. Idéalement la formulation qui sera produite, devrait également permettre de maximiser le temps d'exposition de l'ITZ au niveau des poumons.

3.2. Type de forme galénique et mode d'administration envisagés

Afin de rendre possible l'administration de l'ITZ par voie inhalée, nous avons privilégié le développement de formulations administrables via un inhalateur à poudre sèche en raison des nombreux avantages que présente ce mode d'administration comparativement aux nébuliseurs ou aux inhalateurs pressurisés [181]. À l'inverse des inhalateurs pressurisés, les inhalateurs à poudres sèches ne nécessitent pas la coordination du déclenchement de la dose et de l'inspiration, car l'émission de la dose est déclenchée par l'inspiration du patient. Cela évite donc les problèmes de déposition oropharyngée inappropriée rencontrés avec les inhalateurs pressurisés. De plus, comparativement aux nébuliseurs, ce mode d'administration est beaucoup plus rapide (quelques secondes vs des dizaines de minutes pour les nébuliseurs), portable, moins coûteux et permet un taux de déposition de la dose inhalée beaucoup plus élevé [181]. De plus, ce type de formulation pourrait permettre d'augmenter le temps de résidence des particules inhalées au niveau du poumon. Outre les avantages liés à l'administration, les poudres sèches pour inhalation sont généralement plus stables durant leur stockage à long terme que leurs formulations homologues destinées à être administrées via un nébuliseur ou un inhalateur pressurisé.

Une attention particulière a été portée sur la taille primaire des particules formulées et sur leur capacité à être redisperser après émission à partir d'un dispositif pour inhalation en condition inspiratoire. Le d_{ae} ciblé pour les particules constituant l'aérosol émis de l'inhalateur à partir des différentes formulations produites, devait être compris entre 1 et 5 μm . Cet intervalle étant nécessaire pour éviter l'impaction inertielle de la majorité de la dose inhalée et cibler la zone broncho-alvéolaire. En effet, pour rappel, les spores d'*aspergillus* présentent un d_{ae} compris entre 1,9 et 6 μm (ex : *A. fumigatus* 1,9-3,2 μm [3-5]). Ils sont donc capables de pénétrer profondément dans le poumon jusque dans l'espace broncho-alvéolaire. De ce fait, il était nécessaire que nos formulations puissent, après inhalation, également atteindre cette zone afin de pouvoir cibler les foyers où l'infection est susceptible d'avoir lieu.

Durant l'évaluation des formulations produites dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé un inhalateur à poudre sèche unidose, rechargeable et présentant une faible résistance au flux d'air, le Axahaler®. Cette dernière caractéristique était très intéressante dans le cadre d'une future thérapie d'aspergillose pulmonaire par inhalation. En effet, les dispositifs d'inhalation à poudre sèche sont caractérisés par leur résistance au flux d'air. Au plus la résistance aux flux d'un inhalateur sera élevée, au plus sera élevé l'effort inspiratoire nécessaire, à fournir par le patient, pour disperser correctement la poudre contenue dans l'inhalateur. Comme on l'a vu dans les parties précédentes, l'aspergillose pulmonaire touche surtout des patients dont l'immunité est atteinte, mais également des patients au terrain bronchique anormal (asthme, BPCO, mucoviscidose,...). Conjointement à ces pathologies sous-jacentes, une conséquence de l'aspergillose pulmonaire est bien entendu une diminution de la fonction respiratoire des patients atteints. Ils peuvent donc présenter une diminution de leur capacité inspiratoire. Dès lors, il est important de choisir un système d'inhalation à poudre sèche où la turbulence nécessaire pour disperser correctement la poudre après inspiration soit générée sans trop de « résistance ».

Différentes études précliniques (section 1.5) évaluant les antifongiques par voie inhalée dans le cadre d'API ont été préalablement réalisées. Il en ressort que le maintien d'une concentration pulmonaire en antifongique, exprimée en microgramme d'actif par gramme de poumon ($\mu\text{g}_{pa}/\text{g}_{\text{poumon}}$), supérieure à la CMI (g/ml) du principe actif évalué

à l'égard de la souche incriminée permettait une activité antifongique optimale. Nous nous baserons sur ce concept pour estimer les doses pulmonaires minimales devant être atteintes. Un poumon humain pèse environ 0,35 % du poids corporel [182], ce qui correspond à une masse de 200 à 300 g pour un individu de 70 à 85 kg. En considérant la CMI de l'ITZ à l'égard d'*A. fumigatus* (la souche la plus répandue) comme étant de 2 µg/g de poumon, une dose pulmonaire de ~600 µg devrait être administrée. Comme la dose à déposer doit présenter un d_{ae} inférieur à 5 µm, nous considérons donc qu'une FPD de 600 µg devrait être obtenue et nous utiliserons la FPD et la FPF pour attester des performances de nos formulations.

3.3. Principes de formulation

Afin d'améliorer les propriétés de solubilisation de l'ITZ à partir de nos formulations, tout en permettant d'obtenir des particules aux caractéristiques de taille correspondant au profil de déposition pulmonaire souhaité, nous avons imaginé deux stratégies de formulation différentes. Ces principes de formulation ont été développés afin de permettre l'utilisation exclusive d'excipients présentant un faible potentiel toxique ou étant bien tolérés après inhalation par le tractus respiratoire. En effet, ce dernier point est très important, car le poumon est un organe sensible qui ne tolère, après inhalation, qu'un nombre très limité de substances [183]. Pour ce faire, nous avons privilégié la modification de l'état physique du principe actif (le rendre amorphe ou former des nanoparticules cristallines) plutôt que de chercher l'augmentation de la solubilité et l'accélération du profil de dissolution uniquement via l'ajout d'excipients spécifiquement destinés à cet effet (ex : cyclodextrines, polymères hydrophiles, surfactant,...).

3.3.1. Dispersions solides d'itraconazole amorphe

La première stratégie de formulation qui pourrait permettre d'augmenter la solubilité et d'accélérer la cinétique de dissolution de l'ITZ était de l'obtenir après formulation sous forme amorphe. Les structures solides amorphes sont caractérisées par une absence d'organisation moléculaire. De ce fait, elles présentent une entropie configurationnelle supérieure à celle du même composé solide dans une conformation cristalline donnée, facilitant ainsi la solubilisation de la molécule. De ce fait, les composés amorphes présentent généralement une solubilité augmentée et une cinétique de dissolution accélérée

comparativement à leurs composés homologues cristallins. Il a été rapporté dans la littérature qu'il est possible d'obtenir l'ITZ dans un état amorphe [184]. Afin d'effectuer cette transformation à partir de l'ITZ cristallin, nous avons opté pour l'atomisation par la chaleur (« spray drying »), qui est un procédé continu, transposable industriellement, permettant la transformation d'une solution ou d'une suspension en une forme particulaire sèche et ce, en une étape unique. Obtenir un composé sous forme amorphe après atomisation d'une solution de ce composé est tout à fait réalisable, car le temps rapide de séchage des gouttelettes peut favoriser la formation d'une structure amorphe en ne laissant pas suffisamment de temps au principe actif pour recristalliser vers une forme cristalline plus stable.

Nous avons également évalué l'impact qu'à le fait de disperser l'ITZ sous cette forme dans un agent matriciel soit hydrophobe (le cholestérol), soit hydrophile (le lactose ou le mannitol) selon les différents paramètres prédéterminés (solubilité, cinétique de dissolution, taille particulaire, performances aérodynamiques). La formation d'une DS a été réalisée par l'atomisation d'une solution contenant à la fois l'agent matriciel et l'ITZ sous forme dissoute. L'inclusion de l'ITZ dans une matrice pourrait être favorable et faciliter sa mise en solution par l'amélioration de sa mouillabilité et l'augmentation de sa surface exposée au liquide. La formation d'une DS peut également conduire à la formation d'une dispersion moléculaire entre l'actif et l'agent matriciel ce qui peut, en combinaison avec la modification de l'état cristallin, conduire à une augmentation de la solubilité [185].

L'effet de l'ajout d'un surfactant (compatible avec l'administration pulmonaire) à la formulation a également été évalué. Ce dernier pouvait, en effet, permettre d'améliorer d'avantage la mouillabilité des particules augmentant ainsi la solubilité et les propriétés de dissolution du principe actif.

3.3.2. Formulations à base de nanoparticules cristallines d'itraconazole

La deuxième stratégie de formulation devant permettre d'augmenter la solubilité et d'accélérer la cinétique de dissolution de l'ITZ était basée sur la réduction de la taille des cristaux d'ITZ jusqu'à l'échelle submicronique. La formation de NP cristallines permettrait d'augmenter la courbure des particules, ce qui induirait une augmentation de leur pression de surface, augmentant ainsi la solubilité des particules (équation de Kelvin et

Oswald-Freundlich). En outre, la réduction de la taille engendre également une augmentation considérable de la surface spécifique (surface par unité de masse) des particules ce qui, conjointement avec l'augmentation de la solubilité, conformément à l'équation de Noyes-Whitney, accélère la vitesse de dissolution de la particule.

Pour produire des NP sèches d'ITZ, nous avons tout d'abord produit une nanosuspension qui a été par la suite séchée par atomisation par la chaleur. La nanosuspension a été générée par homogénéisation à haute pression à partir d'une suspension d'ITZ micronisée. Cette méthode de réduction de taille a été choisie à la fois en raison de ses applications reconnues dans la production de nanosuspension de composés insolubles et pour sa possibilité de transposition à l'échelle industrielle [186-188]. Une fois produite, la nanosuspension était alors séchée par atomisation par la chaleur pour récupérer les particules sous forme de poudre sèche. Toutefois, afin d'essayer à la fois de minimiser les problèmes inhérents aux forces interparticulaires très prononcées liées à la surface spécifique très élevée des NP (mauvais écoulement et faible dispersion), ainsi que les phénomènes d'agrégation pouvant minimiser l'augmentation de la solubilité généralement rencontrée lors du séchage de telles suspensions, nous avons tenté de disperser ces NP dans un agent matriciel (le mannitol). Dans ce but, une fraction de la nanosuspension était redispersée dans une solution de mannitol qui était par la suite atomisée.

4. BUTS DU TRAVAIL

L'administration d'ITZ par inhalation sous forme de poudre sèche est une alternative thérapeutique de l'aspergillose pulmonaire qui pourrait s'avérer très avantageuse. Nous avons, dans ce sens, développé de telles formulations. Comme ce principe actif est très peu soluble dans les liquides physiologiques nous avons dû inclure dans les concepts de formulation une stratégie permettant l'amélioration de ses propriétés de solubilisation. Nous avons envisagé deux principes de formulation qui pouvaient permettre de répondre à ces critères. Le premier étant la formation de DS d'ITZ sous forme amorphe et le deuxième l'inclusion de NP d'ITZ dans des microparticules de mannitol. Toutefois, l'augmentation de la solubilisation du principe actif peut également résulter en une élimination trop rapide du poumon. Nous avons alors tenté de déterminer si l'un des concepts de formulation envisagé pouvait permettre une rétention prolongé de l'ITZ au niveau du tissu pulmonaire.

Ce travail s'articule en deux volets. Durant le premier (chapitres 2 à 4), nous avons développé et optimisé les méthodes de fabrication permettant la mise au point des deux principes de formulation envisagés. Nous avons alors caractérisé les formulations ainsi produites sur le plan *in vitro*. La caractérisation avait pour but d'évaluer ces formulations au niveau :

- de leur taille particulière,
- de leurs propriétés d'écoulement,
- de leur profil cristallin,
- de leur humidité résiduelle,
- de leur profil de déposition pulmonaire,
- de leur solubilité et de leur profil de dissolution.

Durant le deuxième volet (chapitres 5 à 7), nous avons évalué les DS d'ITZ amorphe qui se sont avérées être globalement les plus performantes durant l'étape de caractérisation *in vitro* dans un système biologique complet, la souris. Pour cela, nous avons validé une méthode d'administration des poudres chez la souris, l'insufflation endotrachéale. Nous avons ensuite tenté de corrélérer les observations faites sur le plan *in vitro* aux paramètres PK obtenus et de mettre en exergue la potentialité de ces formulations par inhalation dans un contexte pathologique d'API.

Le chapitre 2 (article 1) décrit la mise au point des DS d'ITZ amorphe. Nous avons évalué s'il était nécessaire de former une DS avec un agent matriciel pour pouvoir augmenter la solubilité et la solubilisation de l'ITZ. Nous avons évalué différents agents matriciels et tenté de mettre en avant celui qui était le plus performant. Nous avons également procédé à l'optimisation des conditions d'atomisation ainsi qu'à la caractérisation complète des formulations étudiées. L'effet de l'ajout d'un surfactant polymérique conjugué a également été évalué, car l'incorporation de ce genre d'excipient pouvait permettre d'améliorer la mouillabilité de l'ITZ et ainsi d'améliorer sa solubilisation.

Le chapitre 3 (article 2) porte sur l'amélioration des performances aérodynamiques et de dissolution du premier type de formulation développé en utilisant un autre type de surfactant, les PL. En effet, comme nous le verrons dans le chapitre 2, l'utilisation d'un

surfactant polymérique permettait d'accélérer la solubilisation de l'ITZ, mais réduisait considérablement les performances aérodynamiques des formulations. Nous avons donc utilisé les PL comme agent tensio-actif alternatif afin de déterminer s'ils pouvaient promouvoir la solubilisation du principe actif sans diminuer les performances aérodynamiques des formulations étudiées. Une attention particulière a été portée sur le polymorphisme des constituants des formulations étudiées.

Le chapitre 4 (article 3) porte sur le deuxième concept de formulation, les nanocristaux d'ITZ dispersés dans un agent matriciel. La première partie de ce chapitre avait pour but d'optimiser les conditions d'homogénéisation afin produire des nanoparticules d'ITZ présentant une taille déterminée (diamètre médian < 250 nm). Nous avons ensuite procédé à différents essais d'atomisation en l'absence ou en présence d'excipients compatibles avec la voie pulmonaire (le taurocholate de sodium et le mannitol). Ces excipients étaient destinés à minimiser les problèmes généralement rencontrés lors de la manipulation (mauvais écoulement) et de l'administration pulmonaire de NP (faible dispersion) en formant des microparticules dans lesquelles les NP étaient dispersées. La caractérisation *in vitro* complète des formulations sèches y est ensuite exposée.

Le chapitre 5 (article 4) entame le deuxième volet de ce travail c'est-à-dire les résultats obtenus *in vivo*. Dans ce chapitre, le mode d'administration des poudres sèches chez la souris, l'insufflation endotrachéale, qui a été utilisé dans les chapitres ultérieurs, a été validé au niveau des tailles particulières générées, de la dose émise et de la reproductibilité des doses pulmonaires générées.

Le chapitre 6 (article 5) décrit une étude PK réalisée chez la souris par administration endotrachéale d'une dose de 0.5 mg/kg d'ITZ sous forme d'une DS de mannitol et d'ITZ soit cristallin (micronisé) soit amorphe en présence et en absence de PL. Le profil des concentrations plasmatiques et pulmonaires en ITZ en fonction du temps après administration sous les différentes formes y est exposé. Nous avons déterminé l'influence des différents facteurs de formulation étudiés sur le devenir de l'ITZ après inhalation dans ce modèle.

Enfin, dans le chapitre 7 (article 6), la mise au point d'un modèle d'API sur souris neutropénique a été réalisée. La potentialité thérapeutique et prophylactique des DS d'ITZ amorphe a été étudiée sur ce modèle.

La partie expérimentale est donc constituée de 6 chapitres (chapitres 2 à 7) contenant chacun un article scientifique publié ou soumis pour publication. Ces articles contiennent les parties « matériels et méthodes » et la majeure partie des résultats expérimentaux. Les résultats supplémentaires non intégrés aux articles sont repris dans une section nommée de la sorte. Chaque article est précédé d'une introduction permettant au lecteur de se situer chronologiquement par rapport à l'état d'avancement du travail.

CHAPITRE II

**DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION DE DISPERSIONS SOLIDES POUR
INHALATION À BASE D'ITRACONAZOLE AMORPHE**

1. Introduction

Envisager l'administration d'ITZ par inhalation dans le cadre du traitement ou de la prévention de l'aspergillose pulmonaire est une alternative thérapeutique particulièrement intéressante. En effet, cela permettrait de maintenir de façon régulière une dose élevée d'antifongique au niveau des lésions pulmonaires sans avoir recours à des concentrations systémiques élevées. De ce fait, nous avons tenté de développer une formulation destinée à administrer ce principe actif via cette voie sous forme de poudre sèche. Pour pouvoir cibler les zones d'infections pulmonaires, il faut que la poudre, après inhalation, puisse pénétrer aussi loin dans le tractus respiratoire que les spores d'*Aspergillus*. Le d_{ae} des particules inhalées conditionne principalement leur zone de déposition pulmonaire après inhalation. Or, les spores des différentes espèces d'*Aspergillus* présentent un d_{ae} compris 1,9 et 6 μm et sont donc capables de pénétrer profondément dans le poumon jusqu'à l'espace broncho-alvéolaire. Nous avons donc essayé de maximiser la proportion de la dose de poudre comprise dans cette gamme de d_{ae} au sortir de l'inhalateur sélectionné (l'Axahaler®). En d'autres termes, nous avons pour objectif de maximiser la FPF de nos formulations. Les approches classiques de formulation de poudres sèches pour inhalation consistent à microniser le principe actif et, via différents moyens, (mélange avec un transporteur de plus grosse granulométrie, recouvrement de surface,...) à en améliorer les propriétés de redispersion pour maximiser leur FPF. Or, l'ITZ est une molécule très hydrophobe et qui présente une faible solubilité aqueuse pouvant mener à une forte proportion de la dose inhalée sous forme non dissoute et donc pharmacologiquement inactive. Ces approches classiques de formulation ne permettent pas d'améliorer les propriétés de solubilisation du principe actif. De ce fait, nous avons développé une stratégie de formulation originale permettant à la fois de produire une poudre sèche présentant une FPF élevée et d'améliorer les propriétés de solubilisation de l'ITZ.

La première approche que nous avons envisagée est d'obtenir l'ITZ sous sa forme amorphe et de former une DS avec un agent matriciel compatible avec la voie inhalée à l'aide du procédé d'atomisation par la chaleur. Nous avons tout d'abord évalué l'intérêt de la formation d'une DS avec un agent matriciel (le cholestérol, le lactose et le mannitol) pour arriver à produire une poudre permettant d'améliorer la solubilisation de l'ITZ et de fournir un taux élevé de particules fines ($d_{ae} < 5\mu\text{m}$) en condition d'inhalation. Nous avons ensuite

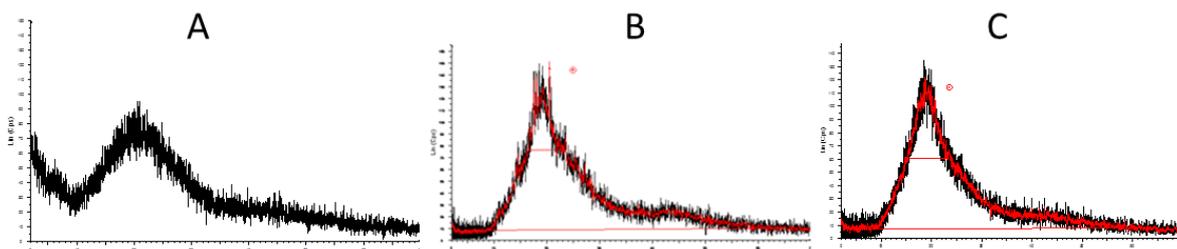


Figure 33 : Spectres PXRD de l'ITZ atomisé après sa solubilisation à une concentration de 0.56 % m/v dans (A) de l'isopropanol (par ajout de 0.25 ml d'HCl à 32 %), (B) de l'isopropanol chauffé à 70°C, (C) un mélange isopropanol : eau (80 : 20) chauffé à 70°C. Les conditions d'atomisation étaient similaires à celles utilisées dans l'article 1, excepté pour les échantillons atomisés à partir d'une solution d'isopropanol à 100 % (A et B) où la température d'atomisation a été fixée à 70°C. Le halo caractéristique des formes amorphes est bien observé dans ces diffractogrammes traduisant ainsi l'absence de réseau cristallin.

Tableau 1 : Composition des solutions atomisées (M/I, C/I, L/I) durant l'étape de sélection de l'agent matriciel optimal (mannitol, cholestérol ou lactose). Ces solutions ont été atomisées dans les mêmes conditions que celles employées dans l'article 1, à l'exception de la formulation C/I qui a été atomisée à une température d'entrée fixée à 70°C au lieu de 90°C. La formulation M/I correspond à la formulation A1 de l'article 1.

Formulation	Solution atomisée	Itraconazole (% m/v)	Mannitol (% m/v)	Cholestérol (% m/v)	Lactose (% m/v)
M/I	Isopropanol/Eau (80 : 20 v/v)	0,56	1	-	-
C/I	Isopropanol	0,56	-	1	-
L/I	Isopropanol (80 : 20 v/v)	0,56	-	-	1

comparé les performances de nos formulations en fonction de l'agent matriciel utilisé. L'effet de l'ajout d'un surfactant (le TPGS, un polymère conjugué de la vitamine E), choisi sur base de son utilisation potentielle dans l'administration pulmonaire, a également été évalué (article 1).

2. Résultats supplémentaires non publiés

La première difficulté lors du développement de ce type de formulations a été de trouver un milieu permettant de dissoudre l'ITZ et un mélange d'ITZ et d'agent matriciel. Cette étape de mise en solution était en effet nécessaire pour obtenir l'ITZ sous sa forme amorphe et sous forme de DS avec l'agent matriciel sélectionné. La difficulté était d'autant plus importante que nous nous étions fixés comme objectif de n'utiliser que des solvants à faible potentialité toxique (solvant de classe III selon l'USP). Or, l'ITZ est très peu soluble dans la majorité des solvants de classe III, avec par exemple une solubilité à 25°C, mesurée par une méthode HPLC-UV, de 547 µg/ml dans l'isopropanol (Article 1). Cette concentration ne permettait pas d'obtenir une solution atomisée suffisamment chargée en soluté que pour avoir un rendement de poudre acceptable en fin de procédé d'atomisation (> 30-40 %). Nous nous sommes dès lors penchés sur d'autres possibilités. Dans un premier temps, nous sommes parvenus à solubiliser jusqu'à 1 g d'ITZ dans 100 ml d'isopropanol par ajout de 0,25 ml d'HCl (32 %). L'ITZ obtenu à partir de ce type de solution par atomisation était effectivement amorphe comme observé par PXRD (**Figure 33**). Toutefois, ce principe de solubilisation a dû être écarté, car nous nous sommes aperçus qu'après reconstitution de cette formulation dans un milieu aqueux, le pH chutait dramatiquement aux alentours de pH 4, ce qui aurait pu engendrer des problèmes d'intolérance par le tractus respiratoire après inhalation [189]. Par la suite, nous nous sommes aperçus qu'il était possible de solubiliser l'ITZ jusqu'à 0,8 % (m/v) dans l'isopropanol sous agitation magnétique en chauffant à 70°C, et que l'ajout de 20 % d'eau ne modifiait pas la quantité maximale qui pouvait y être solubilisée. Cette méthode était très avantageuse, car il était dès lors possible de solubiliser l'ITZ avec des agents matriciels hydrophobes ou hydrophiles avant atomisation et de répondre aux prérequis pratiques nécessaires à la stratégie de formulation envisagée (**Tableau 1**).

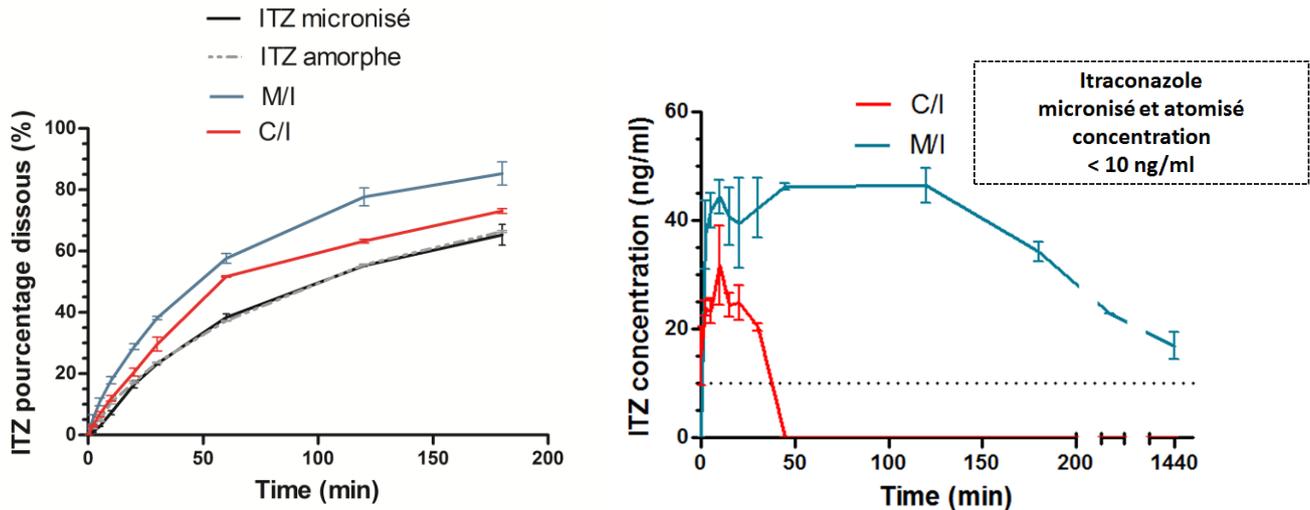


Figure 34 : Profils de dissolution de l'ITZ cristallin micronisé, de l'ITZ atomisé (amorphe) et des formulations matricielles à base de mannitol (M/I) et de cholestérol (C/I) contenant 35 % d'ITZ (Tableau 1), ainsi que le profil des concentrations solubilisées en ITZ dans les conditions de sursaturation. Ces tests ont été réalisés comme décrit dans l'article 1.

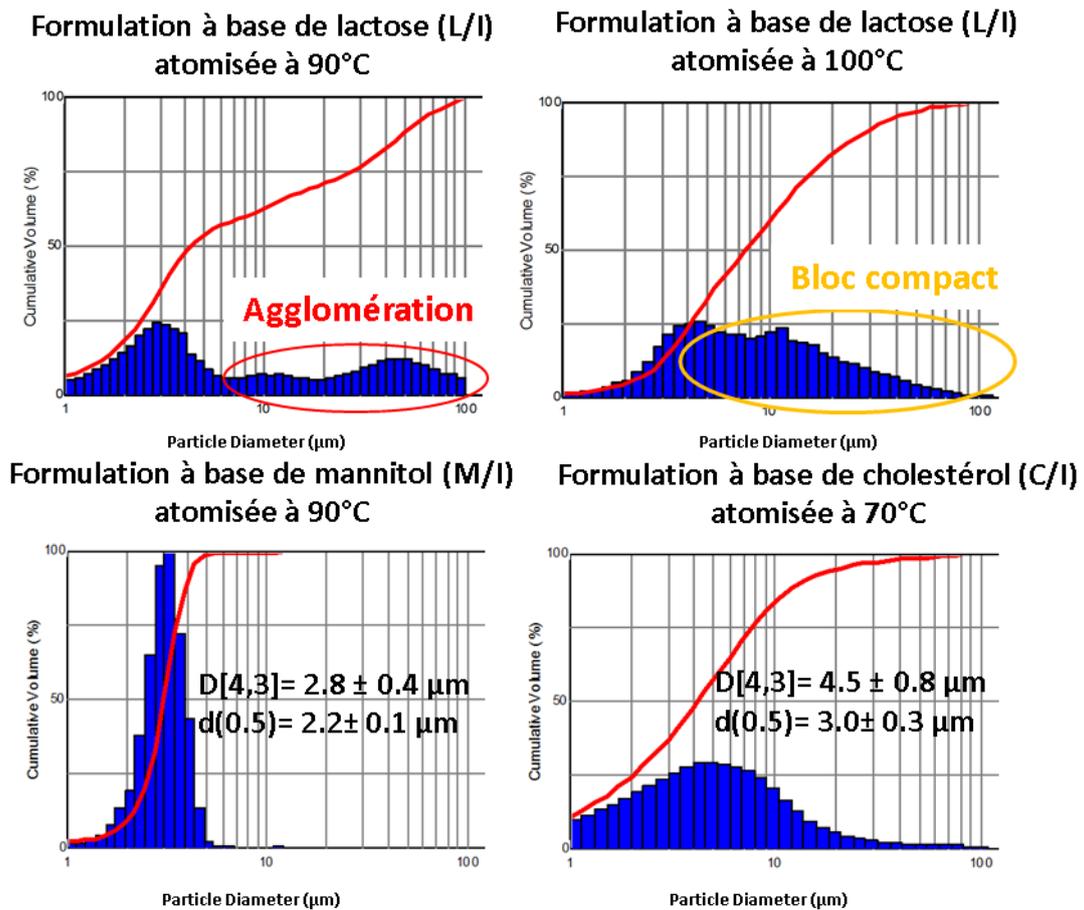


Figure 35 : Représentation de courbes de distribution et de fréquence de taille particulaire ainsi que les valeurs de taille moyenne et médiane ($n=3$) déterminées par Spraytec® (Axhalaer®, 100 L/min, 2.4 sec) des formulations du **tableau 1**. La formulation L/I a été atomisée à 90°C et 100°C

L'ITZ a tout d'abord été atomisé seul pour s'assurer qu'il était bel et bien retrouvé sous forme amorphe comme confirmé par les analyses PXRD (**Figure 33**). Toutefois, nous n'observons pas d'amélioration de ses propriétés de solubilité et de dissolution quand il était atomisé seul (**Figure 34**). Nous supposons d'une part, qu'étant donné la forte hydrophobicité de cette molécule, les particules présentaient une mouillabilité très faible, ce qui entravait fortement le mouillage des particules par le milieu de dissolution et le passage de l'ITZ en solution. D'autre part, nous avons observé une recristallisation progressive de l'ITZ amorphe qui s'effectuait au contact du liquide à l'aide de la microscopie optique associée à un polariseur. L'ITZ en solution avait tendance à recristalliser afin d'atteindre une forme thermodynamiquement plus stable mais celle-ci présentait également une plus faible solubilité dans l'eau. Nous avons alors considéré la formation de DS entre l'ITZ et les agents matriciels précités en atomisant une solution contenant tous les agents sous leur forme dissoute. Le lactose, le cholestérol et le mannitol ont été considérés comme agents matriciels.

L'atomisation du lactose a posé certaines difficultés. Vraisemblablement dû à la formation d'une forme hydratée de lactose, l'élévation de la température d'atomisation à 100°C était nécessaire afin de minimiser l'humidité résiduelle de ces formulations en deçà de 2 %. Les formulations atomisées à une température inférieure à 100°C se désaggloméraient mal en raison de la présence probable de forces capillaires supplémentaires qui entravaient la séparation optimale des particules lors de l'émission à partir du dispositif d'inhalation, comme évalué par Spraytec® (**Figure 35**). Or, comme expliqué dans l'article 1, une température d'atomisation de 100°C génèrait une température de sortie au niveau de l'atomiseur supérieure à la température de transition vitreuse de l'ITZ, ce qui provoquait la formation de cristaux liquides qui, en se solidifiant, créaient une masse compacte, impossible à désagglomérer lors de l'aérosolisation (**Figure 35**). Pour ces raisons, le lactose a été écarté du développement. Ensuite, le cholestérol et le mannitol ont été évalués. Tout d'abord, il a été possible de former des particules respirables comprises dans la gamme de d_{ae} souhaitée en formant des dispersions solides d'ITZ et de cholestérol (C/I) ou de mannitol (M/I). La composition quantitative de ces formulations est reprise dans le **Tableau 1**. La taille particulaire de ces deux formulations, après émission du dispositif Axahaler® dans des conditions simulant une inhalation, était comprise dans la gamme des particules

respirables (diamètres médians et moyens $< 5 \mu\text{m}$, **Figure 35**). Ces deux types de formulations présentaient également de bonnes propriétés aérodynamiques et donc une bonne propension à se désagglomérer avec des FPF de $47 \pm 2\%$ et $53 \pm 3\%$ pour les formulations M/I et C/I, respectivement. Toutefois, la formulation à base de cholestérol était nettement moins performante en ce qui concerne l'accroissement de la vitesse de dissolution et l'augmentation de la solubilité de l'ITZ (**Figure 34**). Pour ces raisons, nous avons privilégié l'utilisation du mannitol pour la suite du projet.

ARTICLE 1

*“Solid Dispersions of Itraconazole for Inhalation with Enhanced Dissolution,
Solubility and Dispersion Properties”*

Christophe Duret, Nathalie Wauthoz, Thami Sebti, Francis Vanderbist, Karim Amighi.

Int J Pharm 428(1-2): 103-113 (2012)

CHAPITRE III

**OPTIMISATION DES DISPERSIONS SOLIDES POUR INHALATION À BASE
D'ITRACONAZOLE AMORPHE**

1. Introduction

Dans le chapitre 2 (article 1), il a été mis en avant que la formation d'une DS d'ITZ amorphe avec le mannitol par atomisation permettait d'obtenir une poudre sèche pouvant atteindre, après inhalation, l'espace broncho-alvéolaire à un taux tout à fait respectable (FPF > 40 %). De plus, via ce principe de formulation, il a été possible d'améliorer les propriétés de solubilisation de l'ITZ. Nous avons observé que l'utilisation d'un agent tensio-actif dans la formulation (le TPGS) permettait d'accélérer davantage le profil de dissolution de ce principe actif, comparativement aux formulations n'en contenant pas, en améliorant probablement sa mouillabilité. Toutefois, l'utilisation de ce type de surfactant était systématiquement accompagnée d'une augmentation de taille particulaire ce qui entraînait une diminution importante de la FPF. Or, l'accélération du profil de dissolution et l'amélioration de la mouillabilité de l'ITZ étaient des caractéristiques qui, *in situ*, pouvaient être profitables en permettant de maximiser la proportion de la dose inhalée sous forme dissoute. Nous avons alors considéré un autre type de surfactant susceptible d'améliorer les propriétés de solubilisation du principe actif sans altérer les propriétés aérodynamiques de la poudre atomisée. Des lécithines hydrogénées de soja contenant plus de 90 % de phosphatidylcholine ont été retenues pour les nombreux avantages qu'elles peuvent présenter. En effet, comme ces PL sont présents dans la composition du surfactant pulmonaire, ils sont théoriquement biocompatibles et donc administrables par inhalation. De plus, leur structure amphiphile pourrait augmenter la mouillabilité et donc, au même titre que le TPGS, promouvoir la dissolution de l'ITZ dans les liquides aqueux physiologiques. En outre, les PL que nous avons utilisés sont totalement saturés (contenant principalement du distéaroyl phosphatidylcholine). Le produit que nous avons utilisé (le Phospholipon 90 H®) est caractérisé par une température de transition de phase (~54°C) et un point de fusion relativement élevés (~120°C), ce qui pourra être également profitable lors de l'atomisation. Finalement, l'aptitude des PL à améliorer les propriétés aérodynamiques des formulations atomisées ont largement été démontrées au préalable au sein de notre Laboratoire [190-193]. Dans cette partie du travail, nous avons évalué l'impact qu'avait l'introduction de ces PL dans ce type de DS au niveau de leurs tailles particulières, leurs propriétés aérodynamiques, leurs propriétés de solubilisation de l'ITZ et leurs propriétés d'écoulement. Nous avons également porté une attention particulière sur le polymorphisme du mannitol après atomisation (article 2).

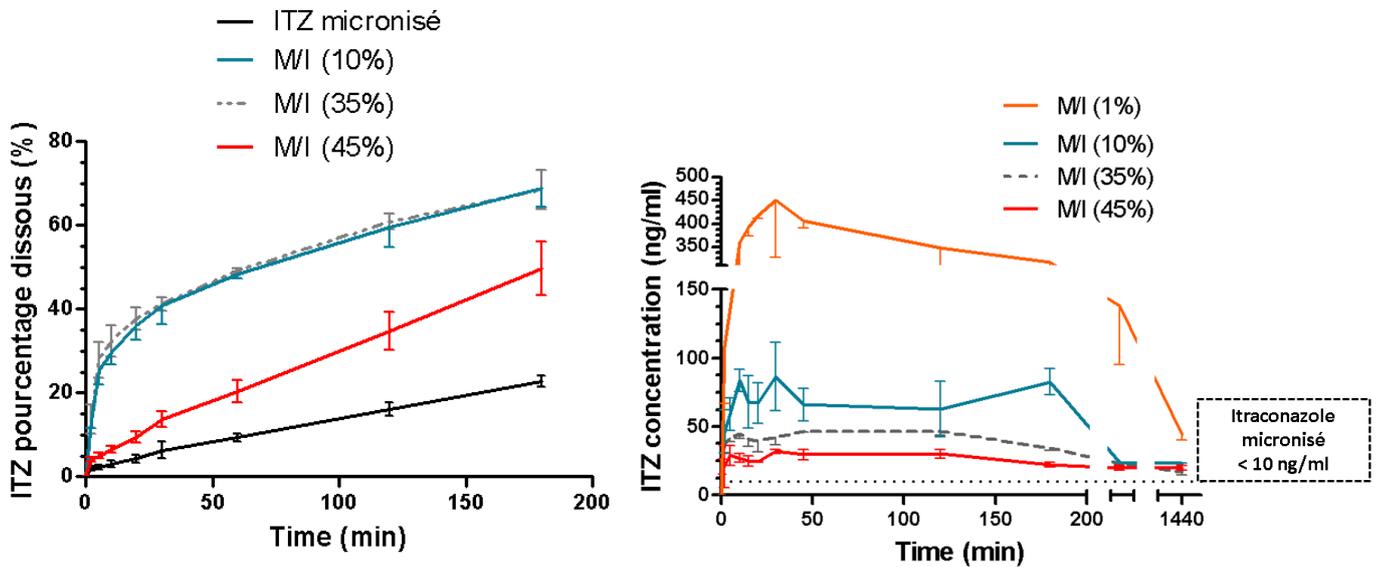


Figure 36 : Profils de dissolution (gauche ; obtenus dans les conditions décrites dans l'article 2) et profils de concentrations solubilisées en itraconazole dans des conditions de sursaturation (droite ; obtenus dans les conditions décrites dans l'article 1) de l'ITZ cristallin micronisé et des dispersions solides à base de mannitol (M/I) contenant 1 %, 10 % (F2 de l'article 2), 35 % (F1 de l'article 2) et 45 % m/m d'ITZ. Toutes les formulations ont été atomisées dans les mêmes conditions. La formulation M/I 1 % n'a pas été évaluée dans ces conditions durant les tests de dissolution, car la quantité de poudre récoltée sur l'insert utilisé au niveau de l'étage 3 du NGI était trop faible comparativement aux autres formulations testées.

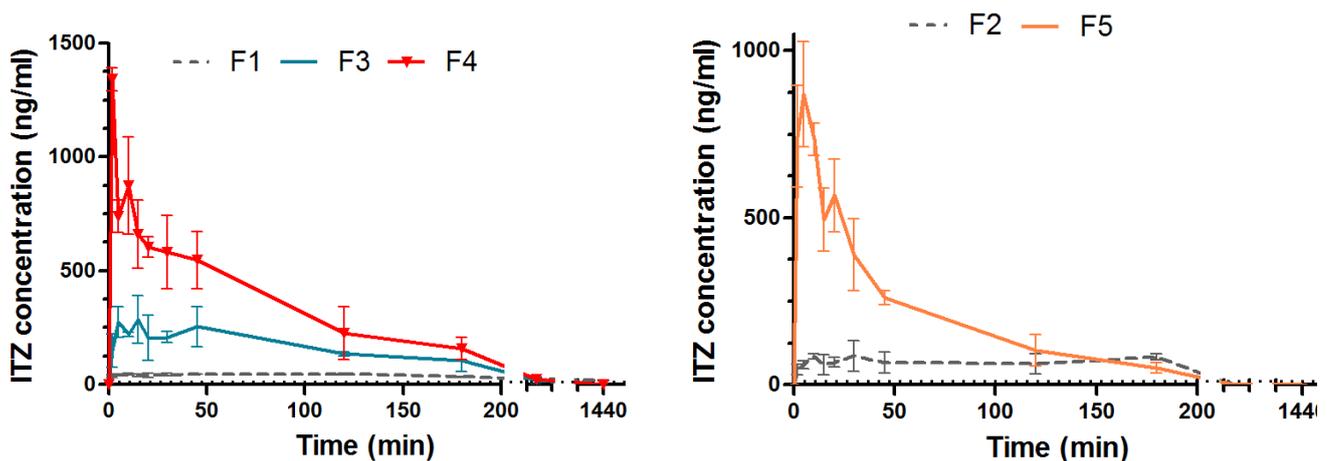


Figure 37 : Profil de concentration en ITZ dans des conditions de sursaturation (obtenu dans les conditions décrites dans l'article 1) des formulations matricielles à base de mannitol de l'article 2 (formulations F1, F2, F3, F4 et F5, Table I de article 2) illustrant l'augmentation de la solubilité de l'ITZ par ajout des PL aux formulations.

2. Résultats supplémentaires non publiés

Parmi les formulations présentées dans les chapitres 2 et 3, on notera que le pourcentage massique maximal d'ITZ était de 35 %. Nous avons envisagé, dans un premier temps, d'augmenter la concentration en ITZ dans la DS, mais comme exposé dans la **Figure 36**, au-delà de cette limite supérieure de teneur en ITZ, nous notions une diminution des performances de dissolution. A l'inverse, en deçà de cette concentration en actif, le profil de dissolution de l'ITZ n'était pas modifié comme illustré avec les formulations contenant 35 % et 10 % d'ITZ (respectivement F1 et F2 de l'article 2). Toutefois, l'analyse des tests de dissolution en conditions de sursaturation (**Figure 37**) ont mis en exergue le fait que la dilution de l'ITZ dans le mannitol avait pour effet d'en augmenter davantage la solubilité avec une valeur maximale de 450 ng/ml pour la formulation contenant 1 % d'ITZ (M/I 1 %) contre 84 ng/ml, 46 ng/ml et 32 ng/ml pour les formulations à 10 % (M/I (10 %)), 35 % (M/I (35 %)) et 45 % (M/I (45 %)) d'ITZ, respectivement. Cependant, le corollaire du faible taux en ITZ nécessaire à l'augmentation si prononcée de sa solubilité est la faible quantité de principe actif déposée après inhalation d'une même masse de poudre d'une formulation plus concentrée. Or, il est possible par ajout de PL d'atteindre des taux de sursaturation aussi élevés qu'avec les formulations ayant une très faible teneur en ITZ. En effet, comme on peut le constater sur la **Figure 37**, l'ajout d'1 % (F3) et 10 % (F4) de PL (exprimés par rapport à la quantité d'ITZ dans la formulation) à la formulation contenant 35 % (F1 ; m/m) d'ITZ augmente de manière conséquente les solubilités mesurées. Les valeurs de solubilité maximales atteintes sont de 46 ng/ml (après 45 min), 284 ng/ml (après 5 min) et 1342 ng/ml (après 2 min) pour F1, F3 et F4, respectivement. La même observation a été faite en comparant la formulation F2 qui contenait 10 % (m/m) d'ITZ et la formulation F5 ayant la même teneur en principe actif, mais qui contenait également 10 % de PL (exprimés par rapport à la quantité d'ITZ dans la formulation) (**Figure 37**). Il est alors possible pour des formulations à haute teneur en ITZ (35 % m/m) d'atteindre des valeurs de solubilité supérieures à celles obtenues avec des formulations à faible teneur en ITZ (1 et 10%) dans la DS par simple ajout de PL.

Tableau 2 : Pourcentage de phase amorphe et évaluation qualitative du pourcentage de participation des formes α , β , δ -mannitol déterminés par PXRD (comme décrit dans l'article 2) des formulations F1, F2, F3, F4 et F5 de l'article 2 directement après atomisation (T 0) et après deux ans de conservation (T 2 ans) à température ambiante dans un dessiccateur.

		% amorphe	% α	% β	% δ
F1	<i>T 0</i>	55	42	2.5	55.1
	<i>T 2ans</i>	51	42	2.1	55.9
F2	<i>T 0</i>	34.5	38.3	1.3	60.3
	<i>T 2ans</i>	33	34.9	1.2	63.8
F3	<i>T 0</i>	53	31.4	2.9	65.7
	<i>T 2ans</i>	53	40.3	1.3	58.5
F4	<i>T 0</i>	57	1.4	0.4	98.5
	<i>T 2ans</i>	56.5	0	0.8	99.2
F5	<i>T 0</i>	37	20.5	0.8	78.8
	<i>T 2ans</i>	36	30.5	0.9	68.6

Comme présenté dans l'article 2, le mannitol est retrouvé après atomisation sous forme cristalline. Le degré de participation des différentes formes polymorphiques du mannitol (α , β , δ -mannitol) à la formation du réseau cristallin total est influencé par les paramètres de formulations tels que la teneur en ITZ et en PL. Comme il existe une relation entre la taille des particules et le profil polymorphique du mannitol, la modification de son profil polymorphique au cours du temps pourrait modifier la taille et donc le comportement aérodynamique des particules constituant les formulations. Toutefois, comme illustré dans le **Tableau 2**, nous n'avons pas observé de modification majeure de la répartition qualitative des trois formes polymorphiques du mannitol ainsi que du pourcentage amorphe des différentes formulations au cours du temps. Cela atteste donc, par la même occasion, de la stabilité (physique) de la forme amorphe de l'ITZ.

ARTICLE 2

“New Respirable and Fast Dissolving Itraconazole Dry Powder Composition for the Treatment of Invasive Pulmonary Aspergillosis”

Christophe Duret, Nathalie Wauthoz, Thami Sebti, Francis Vanderbist, Karim Amighi

Pharm Res 29(10): 2845-2859 (2012)

CHAPITRE IV

**DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION DE FORMULATIONS D'ITRACONAZOLE
POUR INHALATION À BASE DE NANOPARTICULES**

1. Introduction

Nous avons envisagé un deuxième principe de formulation devant également permettre d'obtenir un taux de déposition pulmonaire élevé en ITZ après inhalation tout en augmentant sa solubilité à saturation. Il consistait à réduire la taille de microparticules d'ITZ cristallines en suspension via une procédure d'homogénéisation à haute pression jusqu'à obtenir une taille submicronique et à utiliser ensuite l'atomisation par la chaleur pour les obtenir sous forme de poudre sèche.

La première partie de ce travail avait pour but d'optimiser les conditions d'homogénéisation pouvant influencer l'efficacité du procédé telles que la composition du liquide à homogénéiser, le type et la concentration en surfactant ainsi que la concentration en ITZ de la suspension. Nous avons fixé arbitrairement que les paramètres de distribution de taille de la suspension homogénéisée, le $d(0.5)$ et le $d(0.9)$, devaient être respectivement inférieurs à 250 nm et 2 μm , car il est généralement impossible d'obtenir des tailles inférieures avec ce type de procédé. Après avoir déterminé les conditions d'homogénéisation permettant de produire une nanosuspension répondant aux critères de taille préétablis, nous avons procédé à différents essais d'atomisation en l'absence ou en présence d'excipients compatibles avec la voie pulmonaire (le taurocholate de sodium et le mannitol). Ces excipients étaient destinés à minimiser les problèmes généralement rencontrés lors de la manipulation (mauvais écoulement) et de l'administration pulmonaire de NP (faible dispersion) en formant des microparticules dans lesquelles les NP étaient dispersées. Ils devaient également modifier l'état d'agrégation des NP après séchage par atomisation. Les différentes formulations produites ont ensuite été caractérisées au niveau de leur taille particulière, de leur comportement aérodynamique, de leurs propriétés d'écoulement, de leur capacité à sursaturer un liquide simulant le fluide pulmonaire. L'état d'agrégation des NP séchées au sein des différentes formulations a également été évalué.

ARTICLE 3

“New inhalation-optimized itraconazole nanoparticle-based dry powders for the treatment of invasive pulmonary aspergillosis.”

Christophe Duret, Nathalie Wauthoz, Thami Sebti,
Francis Vanderbist, Karim Amighi

Int J Nanomed 7: 5475-5489 (2012)

CHAPITRE V

**ÉVALUATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* D'UN DISPOSITIF D'INSUFFLATION
ENDOTRACHÉALE DE POUDRES SÈCHES**

1. Introduction

Ce chapitre entame le deuxième volet de ce travail, c'est-à-dire, l'évaluation *in vivo* des DS d'ITZ amorphe. Afin de pouvoir administrer les formulations qui ont été évaluées, dans un premier temps, dans une étude PK chez la souris (chapitre 6) et, dans un deuxième temps, dans une étude d'activité sur un modèle murin d'API (chapitre 7), nous avons choisi une méthode d'administration qui est l'insufflation endotrachéale. L'insufflation endotrachéale consiste à introduire dans la trachée de l'animal, via la cavité buccale, une canule reliée à un réservoir contenant une poudre sèche. La poudre est ensuite propulsée hors de la canule et pénètre ainsi dans les poumons de l'animal au moyen d'une pompe activée manuellement. Bien que les formulations qui allaient être insufflées présentent des FPF élevées au sortir de l'Axahaler® dans des conditions mimant une inhalation, il n'était pas garanti qu'après insufflation, elles puissent se répartir correctement et pénétrer profondément dans les poumons des souris. En effet, l'état d'agglomération des poudres, lorsqu'elles sont émises à l'aide d'un dispositif d'inhalation peut ne pas être le même qu'à la sortie de l'insufflateur endotrachéale. L'utilisation de l'insufflateur endotrachéal au lieu de l'Axahaler® pour administrer ces poudres pouvait donc modifier leur état d'agrégation lors de l'administration et donc modifier la taille des particules inhalées. De ce fait, avant de commencer les études *in vivo* proprement dites, nous nous sommes assuré que ce mode de délivrance permettait de déposer les particules insufflées dans tous les lobes et à tous les niveaux du tractus respiratoire. Pour cela, nous avons évalué la distribution de taille de nos formulations au sortir de l'insufflateur à l'aide d'une technique de diffraction laser adapté aux aérosols (Spraytec®). Pour visualiser leur site de déposition pulmonaire, des sphères fluorescentes présentant une distribution granulométrique similaire à nos formulations ont été administrées par insufflation endotrachéale puis visualisées sur des sections de poumon à l'aide de coupes histologiques et de microscopie à fluorescence. Comme la concentration pulmonaire résultante après insufflation est un facteur primordial dans le type d'étude préclinique que nous voulions mener à bien, nous avons également mis en évidence les paramètres permettant d'obtenir une dose pulmonaire contrôlable et reproductible. Pour cela, différentes formulations ont été insufflées à différents dosages. Les concentrations pulmonaires résultantes ont ensuite été mesurées à l'aide d'une technique de chromatographie couplée à un détecteur UV/Visible.

ARTICLE 4

“In vitro and in vivo evaluation of a dry powder endotracheal insufflator device for use in dose-dependent preclinical studies in mice.”

Christophe Duret, Nathalie Wauthoz, Romain Merlos, Jonathan Goole, Calliope Maris, Isabelle Roland, Thami Sebti, Francis Vanderbist, Karim Amighi.

Eur J Pharm Biopharm 81(3): 627-634 (2012)

CHAPITRE VI

**ÉVALUATION PHARMACOCINÉTIQUE DES DISPERSIONS SOLIDES À BASE
D'ITRACONAZOLE AMORPHE**

1. Introduction

Comme nous l'avons développé dans les deux premiers articles (chapitres 2 et 3), la formation d'une DS entre le mannitol et l'ITZ par une étape d'atomisation par la chaleur a permis de produire une poudre aux caractéristiques aérodynamiques intéressantes tout en augmentant la solubilité et en accélérant la cinétique de dissolution de ce principe actif. L'inclusion de PL à ces DS avait pour effet d'augmenter davantage la solubilité et d'accélérer la cinétique de dissolution de l'ITZ. Nous avons voulu déterminer si, effectivement, l'augmentation de la solubilité et la présence de PL avaient un impact *in vivo* sur le profil PK pulmonaire et systémique (concentrations pulmonaire et plasmatique en fonction du temps) de l'ITZ après administration pulmonaire par insufflation endotrachéale chez des souris saines de type CD-1. En effet, le risque était d'observer une élimination rapide de l'ITZ à partir du poumon, consécutivement à une absorption accrue de la fraction dissoute, vers le compartiment systémique, réduisant rapidement la concentration pulmonaire en ITZ à une valeur inférieure à celle de la CMI d'*A. fumigatus* ($2 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{poumon}}$). L'utilisation de PL pourrait également accentuer ce phénomène, car, outre le fait de pouvoir accélérer la cinétique de dissolution et augmenter la solubilité de l'ITZ, ils peuvent avoir un effet promoteur d'absorption.

Il a été observé, dans le chapitre précédent, qu'une masse minimale de 1 mg de poudre devait être insufflée pour garantir une régularité de la dose pulmonaire générée et pour qu'au moins 30 % de la dose insufflée atteigne les lobes pulmonaires. Or, les formulations développées présentaient une teneur en ITZ de 35 % à 10 % (m/m). Nous avons réduit la concentration en ITZ des formulations ici testées à 1 % (m/m). L'insufflation de 1,5 mg de formulation permettrait d'atteindre une dose pulmonaire théorique en ITZ de $30 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{poumon}}$ (si 40 % de la dose insufflée est retrouvée au niveau pulmonaire), ce qui correspondrait à une masse réaliste de poudre ($\sim 20 \text{ mg}$ de formulation à 35 % m/m) devant être inhalée en une prise par un patient. Cette dose de $30 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{poumon}}$ a été choisie de sorte à ce qu'après élimination de 90% de la dose inhalée, la concentration pulmonaire soit toujours supérieure à la CMI du champignon ($2 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{poumon}}$). Trois formulations contenant 1 % d'ITZ ont été produites et évaluées dans le cadre de cette étude PK. La première (F1) constituait la formulation de référence, c'est-à-dire, une formulation où l'ITZ était sous forme micronisée cristalline. Elle a été produite par atomisation d'une suspension d'ITZ micronisé contenant

du mannitol dissous. La deuxième formulation (F2) devait permettre d'évaluer l'impact qu'avait la formation de la DS entre le mannitol et l'ITZ amorphe, comme décrit dans les articles 1 et 2. Cette dernière présentait la même composition qualitative que la formulation de référence, mais était produite à partir d'une solution hydro-alcoolique contenant à la fois le mannitol et l'ITZ sous forme dissoute, de sorte à former une DS où l'ITZ y était cette fois-ci sous forme amorphe. La troisième formulation (F3) était, elle, similaire à la deuxième formulation, mais contenait en plus des PL en grande quantité comparativement à l'ITZ (3:1 m/m d'ITZ) pour en étudier l'effet sur le profil PK après insufflation endotrachéale. Après avoir produit les différentes formulations, nous les avons caractérisées du point de vue de leur taille (brute et au sortir de l'inhalateur), de leur comportement aérodynamique, de leur propriétés de dissolution et de leur solubilité à saturation. Ensuite, nous avons insufflé une dose équivalente de chaque formulation correspondant à 15 µg d'ITZ à différents groupes de souris qui ont été euthanasiées à des intervalles de temps déterminés (5 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h et 24 h ; n=5 par temps). Les concentrations plasmatiques et pulmonaires en ITZ et hydroxy-ITZ de chaque animal ont alors été déterminées.

ARTICLE 5

“Pharmacokinetic evaluation in mice of amorphous itraconazole-based dry powder formulations for inhalation with high bioavailability and extended lung retention”

Christophe Duret, Romain Merlos, Nathalie Wauthoz,
Thami Sebti, Francis Vanderbist, Karim Amighi.

Accepted for publication, Eur J Pharm Biopharm

CHAPITRE VII

ÉTUDE D'ACTIVITÉ DES DISPERSIONS SOLIDES À BASE D'ITRACONAZOLE

1. Introduction

Lors de l'étude PK qui a été réalisée (chapitre VI) nous avons constaté que les DS d'ITZ amorphe permettaient d'une part d'augmenter la fraction d'ITZ dissoute, qui était par conséquent en partie absorbée vers le compartiment systémique, et d'autre part de prolonger le temps de rétention pulmonaire de l'ITZ. De plus, il a été observé que les PL au sein de ces formulations accentuaient d'avantage l'absorption de l'ITZ. Nous avons, comme objectif d'évaluer l'activité des DS d'ITZ amorphe dans un modèle murin d'API sur le plan prophylactique et thérapeutique après administration pulmonaire par insufflation endotrachéale. Cependant, cette méthode d'administration présente le désavantage de nécessiter l'anesthésie de l'animal, ce qui limite la fréquence d'administration. Dans le but de maximiser le temps d'exposition du poumon en ITZ après une insufflation, nous avons décidé d'évaluer les DS d'ITZ amorphe sans PL.

Nous avons développé un modèle murin (Balb/c) neutropénique, car cette caractéristique immunitaire est l'un des facteurs majeurs qui prédisposent au développement de l'API. La neutropénie a été induite par injection intrapéritonéale (ip.) de cyclophosphamide (200 mg/kg), un agent antinéoplasique très puissant. La contamination pulmonaire a été réalisée par administration endotrachéale de 50 µl d'une suspension de spores contenant 2.10^6 spores d'*Aspergillus fumigatus* ATCC 293 (AF293), une souche commune d'*A. fumigatus* sensible à l'ITZ. L'administration endotrachéale a été réalisée via un embout endotrachéale Microsprayer® IA-1C (PennCentury, Philadelphia, États-Unis) qui permet de générer un aérosol à partir de suspension liquide grâce à une seringue à haute pression FMJ-250 (PennCentury, Philadelphia, États-Unis). Nous avons choisi comme comparateur le VCZ (Vfend®) administré par voie orale sous forme d'une suspension buvable à une dose de 12,5 mg/kg administrée toutes les 12 heures.

Nous avons tout d'abord évalué l'effet prophylactique (administration avant l'inoculation des spores) de l'administration pulmonaire des DS d'ITZ amorphe (article 6). Dans un deuxième temps (résultats non publiés) nous avons tenté de mettre en avant l'effet thérapeutique (administration après l'inoculation des spores) de ce type de formulation.

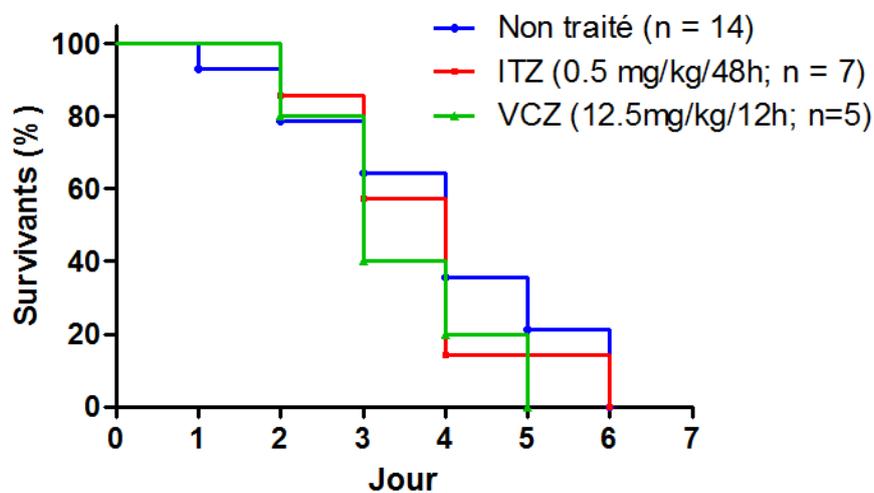


Figure 38 : Courbes de survie Kaplan-Meier de souris femelles Balb/c infectées par *A. fumigatus* suivant le protocole d'infection repris dans l'article 6. Les courbes présentées correspondent aux groupes d'animaux non traités (bleu) et aux groupes dans lesquels le régime thérapeutique (initié au jour 2) a été adopté. Les deux traitements consistent soit à l'administration endotrachéale d'une formulation d'ITZ (L-ITZ, article 6) à une dose de 0.5mg/kg tous les deux jours (rouge), soit à l'administration par gavage orale d'une suspension de VCZ (Vfend®) à une dose de 12.5 mg/kg toutes les 12 heures.

2. Résultats supplémentaires non publiés

Le protocole d'infection qui a été suivi lors de l'étude visant à mettre en avant un effet thérapeutique de l'administration pulmonaire de nos DS d'ITZ amorphe est identique à celui employé dans l'étude prophylactique décrite dans l'article 6. La différence était que les traitements étaient administrés 2 jours post-infection. Nous avons choisi d'initier le traitement à ce moment, car une administration plus précoce n'était pas envisageable étant donné qu'une anesthésie était nécessaire le jour de l'infection par *Aspergillus*.

Nous n'avons pas observé d'effet tant du traitement de référence (la suspension de VCZ administrée par gavage orale) ou de de l'ITZ par inhalation (0.5 mg/kg) (**Figure 38**).

ARTICLE 6

“Inhaled Itraconazole-mannitol dried solid dispersion prophylactic efficacy in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis”

Christophe Duret, Rosière Rémi, Nathalie Wauthoz, Olivier Denis, Marie-Luce Delforge, Bernard Robaye, Thami Sebti, Francis Vanderbist, Karim Amighi.

Submitted to Journal of Antimicrobial Chemotherapy

CHAPITRE VIII

DISCUSSION, CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

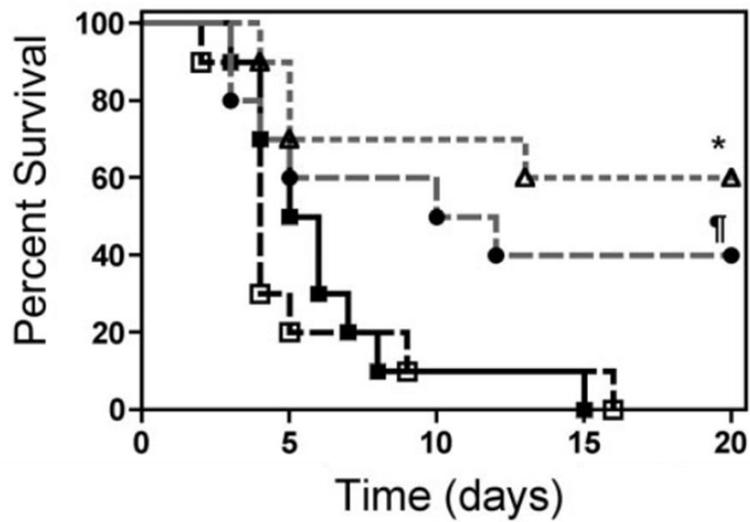


Figure 39 : Courbe de survie obtenue sur un modèle murin d'API à *A. flavus* (n=10 par groupe). Le groupe contrôle (□) n'a reçu aucun traitement avant l'inoculation des spores. La courbe (■) correspond au groupe ayant reçu l'ITZ sous forme de solution orale en prophylaxie à une dose de 30 mg/kg trois fois par jour. Les courbes (●) et (Δ) correspondent aux groupes ayant reçu l'ITZ en prophylaxie par nébulisation sous forme de NP cristallines et amorphes, respectivement à une dose de 30mg/kg 2 fois par jour [103].

L'administration par inhalation d'ITZ sous forme d'une poudre sèche pourrait présenter des avantages considérables, comparativement aux thérapies classiques orales et IV de l'aspergillose pulmonaire. Parmi ces avantages, nous retrouvons la possibilité de localiser une forte dose d'antifongique où l'infection se situe sans avoir recours à l'obtention de taux plasmatiques élevés nécessaires à l'obtention de taux pulmonaires adéquats (concentrations pulmonaires en antifongique > à la CMI du champignon concerné). Cependant, l'ITZ est une molécule très peu soluble qui présente, par exemple, une solubilité inférieure à 10 ng/ml dans un tampon phosphate contenant 0,02 % de DPPC (articles 1 et 3). De manière rationnelle, nous pouvons penser que cette faible solubilité conduirait à une forte proportion de la dose déposée dans le poumon sous forme non dissoute et donc sous forme pharmacologiquement non active. De plus, la stagnation des particules non solubilisées dans les fluides pulmonaires pourrait tendre à une élimination rapide de l'ITZ par les mécanismes de clairance non-absorptifs, réputés comme efficaces et très rapides, sans que celui-ci ait eu le temps d'agir. Il paraît dès lors évident que l'amélioration de ses propriétés de solubilisation (accroissement de sa vitesse de dissolution et augmentation de sa solubilité) puisse permettre de potentialiser au maximum son action pharmacologique. Cela semble prendre tout son sens, en comparant les données obtenues dans une étude de Hoebben *et coll.* [103]. Cette étude visait à évaluer l'effet prophylactique de l'administration pulmonaire par nébulisation d'agrégats de NP d'ITZ amorphes ou cristallines dans un modèle préclinique d'API à *A. flavus*. En effet, comme on peut le voir sur la **Figure 39**, les taux de mortalité obtenus après administration des NP cristallines sont nettement supérieurs à ceux observés après administration des NP amorphes. Cette différence a, par la suite, été attribuée à la plus grande capacité des NP amorphes à sursaturer les fluides pulmonaires de par leur solubilité intrinsèque supérieure à celles des NP cristallines [194].

Nous avons, dès lors, tenté de développer des formulations d'ITZ administrables par inhalation sous forme de poudres sèches pour les avantages que représente ce type de forme galénique. Ce type de formulation permettrait en une inhalation de garantir des taux pulmonaires en ITZ très élevés et supérieurs à la dose minimale requise. Afin de pouvoir l'administrer sous cette forme tout en améliorant ses propriétés de solubilisation (dissolution accélérée et solubilité augmentée), nous avons imaginé deux principes de formulation nouveaux. La première stratégie consistait à obtenir l'ITZ sous forme amorphe

et à le disperser dans un agent matriciel par formation d'une DS. La deuxième envisageait d'obtenir des NP d'ITZ et de les disperser dans un agent matriciel.

Développement et évaluation in vitro des formulations d'itraconazole

→ *Dispersions solides d'itraconazole amorphe*

L'atomisation d'une solution hydro-alcoolique d'ITZ dans les conditions déterminées dans le chapitre 2 a permis d'obtenir cette molécule sous une forme amorphe qui théoriquement présentait une solubilité supérieure et une cinétique de dissolution plus rapide comparativement à sa forme cristalline initiale [184]. Toutefois, les tests de dissolution et de solubilité *in vitro* n'ont pas permis de mettre en évidence ces phénomènes. Il a été pensé, d'une part, que l'hydrophobicité accrue de l'ITZ n'assurait pas une mouillabilité suffisante des particules en contact avec les milieux de solubilisation aqueux, ce qui entravait sa dissolution. D'autre part, le contact prolongé des particules amorphes avec la phase aqueuse induisait leur recristallisation progressive. Nous avons, dès lors, envisagé de former une DS avec un agent matriciel pour améliorer sa mouillabilité et tenter d'en augmenter la surface exposée au liquide de dissolution.

Parmi les agents matriciels potentiellement compatibles avec l'administration par inhalation (le lactose, le cholestérol et le mannitol) qui ont été évalués, le mannitol s'est avéré être l'excipient le plus efficace. En effet, d'une part, la formation d'une DS avec cet excipient permettait de former des particules sèches présentant un taux de déposition pulmonaire élevé après décharge à partir d'un inhalateur dans des conditions mimant une inhalation (FPF > 40 %). D'autre part, ce type de composition permettait d'accroître considérablement la vitesse de dissolution de l'ITZ et d'en augmenter sa solubilité (comparativement à la forme cristalline et à la forme amorphe non matricielle). Lorsque les particules sèches étaient en contact avec les différents milieux aqueux de dissolution, le mannitol, qui est hydrophile et très soluble (solubilité ~ 20 % m/v à pH 7, 20°C) améliorait indirectement la mouillabilité de l'ITZ. De plus, étant donné que le mannitol se dissolvait beaucoup plus rapidement, il augmentait également la surface totale des particules d'ITZ amorphes exposées au liquide qui se retrouvaient probablement dans un état finement divisé. Cette structure particulière permettait alors de pouvoir bénéficier pleinement de

l'augmentation de la solubilité consécutive à la configuration amorphe du principe actif, mais également d'en accroître la cinétique de dissolution. En effet, conformément à l'équation de Noyes-Whitney, l'augmentation de la concentration à saturation et l'augmentation de la surface exposée au milieu de dissolution des particules qui se solubilisent sont deux facteurs clés qui permettent d'accélérer la dissolution de l'ITZ.

La diminution de la quantité d'ITZ dans la DS (de 35 % à 1 %) a permis d'accentuer d'un facteur 10 l'augmentation observée en solubilité (de 45 ng/ml à 450 ng/ml) sans toutefois en modifier significativement la vitesse de dissolution. Cependant, cette augmentation spectaculaire de solubilité qui pouvait être profitable *in situ*, en augmentant la fraction dissoute de principe actif, n'avait lieu qu'en diminuant fortement sa teneur au sein de la DS. Cette forte diminution en teneur réduisait la possibilité d'administrer de fortes doses en une seule inhalation. Or, nous avons observé que l'inclusion d'un surfactant à ce type de DS, un polymère conjugué de la vitamine E (le TPGS, Chapitre 2), permettait d'augmenter sensiblement la solubilité et d'en accroître la vitesse de dissolution. Toutefois, son utilisation limitait les performances aérodynamiques des formulations, probablement en raison de son accumulation en surface des particules sèches et de son ramollissement pendant le processus de séchage par atomisation. Cela réduisait à la fois la fraction respirable des formulations en augmentant la taille des particules et pouvait également limiter l'amélioration des propriétés de solubilisation observées en réduisant la fraction de TPGS disponible à l'intérieur des particules séchées. En alternative, nous avons utilisé des PL (lécithines de soja hydrogénées avec plus de 90 % de phosphatidylcholine) pour leurs propriétés tensio-actives et leurs aptitudes précédemment démontrées à améliorer les propriétés aérodynamiques de formulations atomisées [190-193]. Leur utilisation a ouvert une porte intéressante au niveau de la possibilité d'améliorer et de moduler les paramètres de solubilité tout en conservant, voire en améliorant les propriétés aérodynamiques des formulations contenant un pourcentage d'actif élevé. En effet, leur présence permettait d'augmenter considérablement la solubilité de l'ITZ par rapport aux formulations n'en contenant pas jusqu'à un facteur ~ 30 (ex : solubilité maximale observée de 45 ng/ml à 1342 ng/ml pour F1 et F4 Vs < 10 ng/ml pour l'ITZ cristallin non formulé). L'introduction de PL a également eu pour effet d'améliorer les propriétés d'écoulement des poudres ainsi que d'accentuer la vidange du dispositif d'inhalation après décharge, améliorant les propriétés

aérodynamiques des poudres. Cependant, un effet de collage caractéristique des PL entravait ces améliorations pour les formulations qui en contenaient 3,45 % (m/m) (et 35 % d'ITZ), ce qui serait la limite supérieure en PL permettant d'augmenter la FPF.

Les DS d'ITZ amorphe constituent une approche de formulation qui permet l'amélioration considérable de la solubilisation de l'ITZ tout en garantissant, sur base des profils de déposition *in vitro*, des taux pulmonaires en antifongique très élevés. Ces objectifs ont été atteints en utilisant exclusivement des excipients à faible potentiel toxique. Ce type de formulation constitue une approche rationnelle très prometteuse dans le cadre d'une thérapie antifongique par inhalation. Toutefois, l'augmentation accrue de la solubilité observée ainsi que la présence de PL dans certaines de ces formulations pourraient engendrer une élimination très rapide du poumon par absorption vers le compartiment systémique consécutivement à une fraction dissoute *in situ* très élevée.

→ **Formulations à base de nanoparticules cristallines d'itraconazole**

La formation de microparticules par atomisation par la chaleur à partir d'une nanosuspension d'ITZ en présence d'un excès de mannitol s'est également avérée être une alternative de formulation envisageable. Ces formulations présentaient des fractions de particules fines entre 35 % et 46 %, exprimés en fonction de la dose nominale en ITZ, mais également des concentrations à saturation supérieures à celles obtenues avec le matériel de départ (l'ITZ cristallin micronisé). Les conditions d'homogénéisation n'ont pas modifié l'état cristallin du principe actif comme montré par les analyses PXRD. L'atomisation d'une nanosuspension sans agent matriciel a conduit à une agrégation irréversible des nanoparticules formant des microparticules cristallines d'ITZ aux propriétés aérodynamiques acceptables, mais dont la solubilité à saturation n'était pas améliorée. Par contre, l'atomisation de la nanosuspension en présence de mannitol a permis de minimiser ce phénomène d'agrégation permettant de bénéficier de l'augmentation de la solubilité recherchée tout en conservant les propriétés aérodynamiques de la formulation. L'ajout d'un surfactant chargé (le taurocholate sodique) a permis d'accentuer la minimisation de l'agrégation des NP après atomisation, jusqu'à totalement l'empêcher à concentration adéquate. La réduction de la taille des cristaux d'ITZ retrouvés dans la formulation sèche n'a pas été systématiquement accompagnée par une augmentation de la solubilité à saturation.

Les formulations à base de NP cristalline d'ITZ pourraient également être envisagées dans la thérapie antifongique par inhalation de l'aspergillose pulmonaire. Toutefois, comparativement aux DS précédemment décrites, ce type de formulation s'avère sensiblement moins intéressant. En effet, au niveau des performances aérodynamiques, les formulations à base de NP présentent des FPF inférieures à celles obtenues pour les DS tout en étant supérieures à celles que présentent les formulations à base de poudres sèches disponibles sur le marché. De plus, les taux de sursaturation atteints avec les formulations à base de NP d'ITZ sont nettement inférieurs à ceux obtenus avec les DS. En outre, le temps de production des nanosuspensions nécessitait un minimum de 300 cycles d'homogénéisation, ce qui représente un désavantage considérable en termes de temps de production et de transposition d'échelle comparativement à l'étape unique nécessaire pour la fabrication des DS. Pour ces raisons, seules les DS ont été évaluées *in vivo*.

Evaluation in vivo des dispersions solides

→ Validation du dispositif d'administration endotrachéale

Les nuages de poudres générés lors de l'émission de nos formulations, à l'aide de l'insufflateur endotrachéale DP-4M® (Penn-Century Inc., Philadelphia, PA), présentaient une distribution granulométrique (ex : d (0,5): $5 \pm 1 \mu\text{m}$; D [4,3]: $12 \pm 6 \mu\text{m}$; d (0,9): $32 \pm 12 \mu\text{m}$) permettant une bonne pénétration des particules insufflées dans le poumon. En effet, l'administration et la visualisation des sites de déposition d'un aérosol, via des sphères fluorescentes de même ordre de grandeur, nous a permis d'attester que les particules insufflées pouvaient pénétrer profondément dans l'arbre trachéo-bronchique de la souris. Les particules fluorescentes insufflées étaient largement distribuées dans le tractus respiratoire et étaient retrouvées jusque dans les sacs alvéolaires. De plus, il a été possible d'obtenir une corrélation entre les doses d'ITZ insufflées et les concentrations pulmonaires générées. Ce dispositif d'administration a donc pu être utilisé pour la réalisation des études précliniques envisagées, durant lesquelles la concentration pulmonaire générée était un facteur déterminant. Toutefois, la prudence fut requise, car la dose émise ne fournissait pas systématiquement les concentrations pulmonaires en ITZ prévues. L'insufflation d'une masse de poudre inférieure à 1 mg générait des concentrations pulmonaires tout à fait disparates. A l'inverse, il a été démontré qu'une masse de poudre administrée supérieure à

ce mg était nécessaire afin de pouvoir générer, lors d'administrations multiples, une concentration pulmonaire en principe actif corrélée et reproductible. Il a donc été possible d'utiliser ce mode d'administration lors de nos études *in vivo* ultérieures. Cependant, afin de travailler sur base de doses en antifongique administrables chez l'homme tout en garantissant une reproductibilité de dose pulmonaire chez la souris à l'aide de ce dispositif, nous avons décidé d'effectuer l'étude PK sur des formulations à concentration en ITZ réduite à 1 % (m/m).

→ *Etude pharmacocinétique*

Les formulations évaluées durant l'étude PK nous ont permis d'étudier de manière indépendante deux facteurs principaux, c'est-à-dire (i) l'augmentation de la solubilité et l'accroissement de la cinétique de dissolution de l'ITZ, en l'obtenant sous forme amorphe et en formant une DS avec le mannitol, et (ii) l'influence de la présence de PL qui a été fixé à un certain ratio (ITZ : PL ; 1 : 3) sur l'augmentation de la cinétique de dissolution de l'ITZ sans faire varier significativement la solubilité à saturation, comparativement à la formulation qui n'en contenait pas.

Durant cette étude, l'augmentation de la biodisponibilité systémique en ITZ observée pour les DS d'ITZ amorphe a démontré sa capacité à sursaturer les fluides pulmonaires consécutivement à l'amélioration de ses propriétés de solubilisation. Dans un contexte thérapeutique, ces conditions de sursaturation devraient, comparativement à une formulation d'ITZ inhalée de solubilité inférieure, permettre à un nombre supérieur de molécules actives de diffuser et d'agir envers les cellules fongiques potentialisant ainsi d'autant plus l'effet pharmacologique pour une même dose de principe actif déposé. L'inclusion de PL à la dispersion solide a accentué ce passage vers le compartiment systémique par (i) l'amélioration des propriétés de mouillabilité de l'ITZ et (ii) un effet promoteur d'absorption via une interaction avec les membranes épithéliales. L'inclusion de PL devrait donc également pouvoir permettre d'augmenter la proportion de molécules dissoutes après que la dose d'ITZ ait été déposée dans le poumon. Toutefois, l'absorption beaucoup plus prononcée de l'ITZ en présence de PL conduit à une élimination beaucoup plus rapide du poumon ne garantissant pas, dans la gamme des doses évaluées,

le maintien d'une concentration pulmonaire en antifongique de 2 µg/g (la CMI d'*A. fumigatus*) pendant au moins 24h.

Cette étude a concrètement démontré la capacité des SD d'ITZ amorphe à sursaturer le fluide pulmonaire. Les conditions de sursaturation créées *in situ* devraient améliorer l'effet de la dose inhalée comparativement à une formulation d'ITZ brut cristallin. Cette solubilité augmentée permettrait à un nombre supérieur de molécules d'actif de diffuser et d'agir au niveau des cellules fongiques. De plus, les SD d'ITZ amorphe (sans PL) offrent un temps de rétention pulmonaire prolongé, ce qui devrait également être bénéfique en termes d'activité antifongique. Les PL ont eu pour effet d'accentuer l'absorption de l'ITZ vers le compartiment systémique. Or comme cela a été vu dans le chapitre III, ils permettent également (dans les gammes de concentration utilisées) d'accentuer l'effet de sursaturation. On pourrait dès lors s'attendre à une amélioration de l'activité antifongique lors de leur utilisation. Toutefois, l'absorption plus rapide et beaucoup plus prononcée de l'ITZ quand les PL ont été incorporés dans la formulation peut conduire à une élimination rapide du poumon, ainsi qu'à l'apparition d'effets secondaires consécutivement à la haute concentration plasmatique qu'ils peuvent engendrer. Pour ces raisons, nous avons décidé d'évaluer le profil d'efficacité *in vivo* des DS sans PL dans un contexte d'API. En effet, cette rétention pulmonaire augmentée nous permettait de prolonger au maximum la présence de l'ITZ au niveau des poumons infectés, ce qui était nécessaire étant donné que, pour une administration endotrachéale, l'étape d'anesthésie requise limitait la fréquence d'administration.

→ Étude d'activité

Nous sommes parvenus à développer un modèle murin d'API pour lequel nous avons pu mettre en évidence un effet prophylactique (administration antifongique 2 jours avant l'administration des spores d'*A. fumigatus*) tant pour le VCZ par voie orale (25 mg/kg/24h en deux prises) que pour l'ITZ sous forme de DS par voie inhalée (5 mg/kg/48h ; formulation à 10 % m/m d'ITZ). Le bénéfice prophylactique observé a été traduit par une différence significative lorsque l'on compare les courbes de survie Kaplan-Meier du groupe ITZ inhalé et du groupe non-traité ($p < 0,01$; test Log-Rank) ainsi que du groupe VCZ oral et du groupe non-traité ($p < 0,05$; test Log-Rank). La médiane de survie pour le groupe ITZ inhalé était de

9 jours contre seulement 5 jours pour le groupe VCZ oral. Le pourcentage de survivants après 12 jours était pour le groupe ITZ inhalé de 50 % contre 25 % pour le groupe VCZ oral. Les coupes histologiques réalisées à partir des survivants des deux groupes traités ont montré des foyers aspergillaire résiduels ainsi que d'importantes zones de tissus nécrosés. L'infection à aspergillus a donc pu être freinée et contrôlée dans les deux cas, avec une efficacité plus marquée après administration pulmonaire d'ITZ. Toutefois, la dose requise d'ITZ (5 mg/kg/48h) par inhalation permettant d'apporter ces bénéfices fut 10 fois supérieure à celle que nous supposions (0,5 mg/kg/48h). Néanmoins, au regard de la concentration pulmonaire en ITZ obtenue pour ce groupe (5 mg/kg/48h) après administration endotrachéale ($215 \mu\text{g}/\text{g}_{\text{poumon}}$), cette dose est envisageable à échelle humaine. En effet, en concentrant l'antifongique dans les formulations à 35 % (m/m), il serait possible en quatre inhalations (sur 48h) d'administrer une masse de formulation de 50 mg, ce qui est tout à fait envisageable avec des inhalateurs à poudre sèche. Le désavantage majeur de l'administration endotrachéale qui est la nécessité d'anesthésier l'animal, nous a empêché d'augmenter les fréquences d'administration de la poudre. Nous étions par conséquent contraints d'administrer l'ITZ par insufflation à 48h d'intervalle. L'utilisation de méthodes d'inhalation passives, comme les tours d'inhalation, permettrait d'augmenter la fréquence d'administration. Nous pourrions alors tenter de déterminer si le fractionnement ou la réduction de la dose administrée par 48h dans notre étude s'avèreraient aussi efficace voire plus adéquate. De plus, nous avons procédé à l'infection par voie endotrachéale également. De ce fait, la quasi-totalité des spores contenues dans les 50 μl instillés s'est retrouvée dans le poumon induisant une API « massive ». Intuitivement, nous pouvons penser que cette charge fongique massive observée puisse requérir une concentration pulmonaire en antifongique surestimée par rapport à celle qui serait requise en pratique clinique réelle où les lésions invasives sont généralement moins étendues. L'utilisation de chambres acryliques permettant d'aérosoliser une suspension de spores et de contaminer les animaux par inhalation pourrait également permettre d'optimiser le modèle en le rendant moins agressif et plus proche de la clinique. Le profil de toxicité de l'ITZ sous cette forme devrait maintenant être établi dans une étude à grande échelle, afin de déterminer la limite de dose supérieure pouvant être administrée et de déterminer si les doses jugées efficaces dans ce genre de modèle optimisé seraient bien tolérées chez l'humain.

Cette étude soutient la supériorité supposée de l'administration par inhalation des DS d'ITZ amorphe développées au cours de ce travail comparativement à une administration d'antifongique standard par voie orale. Il est intéressant de comparer la dose ainsi que la posologie que nous avons utilisées (5 mg/kg/48h) avec celles administrées par voie orale (30 mg/kg/24h d'une solution buvable d'ITZ, Sporanox®) dans une étude d'activité prophylactique sur un modèle murin d'API conduite par Alvarez (**Figure 23**, [100]). En effet, nous avons obtenu une efficacité prophylactique nettement supérieure après administration pulmonaire de notre formulation à une dose et une fréquence d'administration considérablement réduite. Ces résultats illustrent parfaitement les avantages de l'administration pulmonaire de nos formulations, c'est-à-dire, la possibilité de les concentrer localement pour un effet supérieur sans avoir recours à l'obtention de concentrations plasmatiques considérables permettant ainsi la diminution de la probabilité d'apparition d'effets systémiques (effets secondaires et interactions médicamenteuses).

Néanmoins, nous ne sommes pas parvenus via ce modèle, à démontrer le bénéfice thérapeutique (administration antifongique post inoculation des spores) de l'administration pulmonaire d'une dose d'ITZ de 0,5 mg/kg/48h, ni après administration orale de VCZ (25 mg/kg/24h en deux prises). Nous imputons ces inefficacités à l'agressivité du modèle développé et au mode d'administration qui nous limite une fois de plus au niveau de la fréquence d'administration. En effet, la dose et la posologie de VCZ que nous avons utilisées garantissent l'atteinte de concentrations systémiques similaires à celles obtenues en clinique [195], qui ont préalablement démontré un effet dans différents modèles d'aspergillose invasive [54, 196, 197]. La mise au point d'un modèle moins agressif et plus représentatif de la contamination humaine (réduction du nombre de spores insufflés, immunosuppression moins sévère, administration passive des spores) [198] permettrait d'augmenter sa sensibilité et de pouvoir déterminer, dans une étude comparative, la potentialité de nos formulations après inhalation dans un tel cadre thérapeutique. En effet, comme nous l'avons vu, l'infection se développe très rapidement avec, deux jours après l'inoculation des spores, des foyers massifs qui se sont déjà développés et un taux de mortalité de 20 %. Toutefois, un point non testé dans ce cadre est l'augmentation de la dose d'ITZ qui n'a pas pu être réalisé lors de cette étude. L'évaluation de l'effet thérapeutique des DS d'ITZ amorphe à une dose supérieure sera réalisée ultérieurement.

Néanmoins, l'utilisation de méthodes d'administration passives, comme les tours d'inhalation, permettrait d'accélérer l'initiation du traitement antifongique. Il serait possible via cette méthode, par exemple, d'initier le traitement par inhalation beaucoup plus tôt après l'inoculation des spores, lorsque les premiers foyers fongiques se sont installés, comme cela a déjà été réalisé dans des études similaires [99, 101]. De plus, à ce niveau, une optimisation du modèle serait peut être également un point à ne pas négliger.

Conclusions générales et perspectives

En conclusion, nous sommes parvenus à développer deux principes de formulation nouveaux permettant un taux de déposition élevé après inhalation tout en améliorant considérablement les propriétés de solubilisation d'un principe à la base très peu soluble. Ces deux principes de formulation pourraient être appliqués à d'autres molécules insolubles destinées à être administrées par inhalation. L'administration par voie inhalée des DS d'ITZ amorphe développées dans ce travail semble être une piste très intéressante dans le cadre de la prophylaxie de l'API. Les formulations à base de NP cristalline d'ITZ ne doivent cependant pas être négligées. Ces types de formulation permettraient, après inhalation, à la fois d'atteindre rapidement des taux pulmonaires très élevés en antifongique sous forme active, tout en minimisant l'exposition systémique. L'étape unique du procédé de fabrication, la possibilité de n'utiliser que des excipients à faible potentiel toxique ainsi que les bonnes propriétés d'écoulement que présente ce type de formulation le rendent, sur le plan de l'applicabilité, d'autant plus intéressant.

Nous envisageons de continuer l'évaluation *in vivo* de ces formulations, mais de passer à un mode d'administration passif des poudres sèches chez la souris (une tour d'inhalation). Cela permettrait de pouvoir optimiser la dose et la fréquence d'administration des DS d'ITZ amorphe dans un cadre prophylactique. De plus, ce mode d'administration pourrait nous permettre d'essayer de mettre en avant leur efficacité sur le plan thérapeutique (initiation du traitement après inoculation des spores). Nous pourrions également, via cette méthode, évaluer l'effet qu'ont les PL sur l'activité antifongique des formulations. En effet, comme nous l'avons vu, les PL augmentent considérablement la capacité des formulations à solubiliser l'ITZ ce qui, par conséquent, accélère son élimination du poumon vers le compartiment systémique. De ce fait, nous n'avons pas pu évaluer l'effet

des PL durant l'étude d'activité via l'insufflation endotrachéale. Or, cette capacité à augmenter la solubilisation de l'ITZ pourrait s'avérer profitable *in vivo*. Via les tours d'inhalation, nous pourrions alors administrer les DS d'ITZ amorphe contenant des PL à fréquence rapprochée afin de compenser les pertes vers le compartiment systémique. Finalement, nous pourrions également, via ces inhalateurs passifs, administrer des volumes de poudre plus petits aux animaux à partir de formulations dont la teneur serait la même que celle administrée chez l'humain. Cela permettrait une transposition plus aisée et plus réaliste de la dose et de la posologie de l'animal à l'homme. Une fois ces doses déterminées, une étude toxicologique à plus grande échelle sera réalisée en parallèle afin de s'assurer de l'innocuité des doses envisagées. Il sera également intéressant d'évaluer l'effet de l'association d'une administration pulmonaire en ITZ et d'un antifongique faisant partie d'une autre classe thérapeutique (par exemple la CSP) par une voie générale (orale ou IV) en vue d'en dégager une possible interaction synergique. Il serait également très utile d'essayer d'étendre l'indication de l'administration des DS d'ITZ amorphe par voie pulmonaire à l'ABPA et à certaines formes d'APC où la prise d'antifongique est nécessaire sur le long cours. Finalement, le VCZ et le PSC vont être également formulés en vue de comparer leur profil efficacité avec celui des formulations d'ITZ ici développées. Ce travail fera l'objet d'une nouvelle thèse de doctorat qui sera effectuée dans notre Laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J.-P. Latgé, W.J. Steinbach, *Aspergillus fumigatus and aspergillosis*, ASM Press, Washington, D.C., 2009.
- [2] P.S. Dyer, C.M. O'Gorman, Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species, *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2012) 165-192.
- [3] W. Eduard, Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting, *Critical Reviews in Toxicology*, 39 (2009) 799-864.
- [4] G. Morris, M.H. Kokki, K. Anderson, M.D. Richardson, Sampling of *Aspergillus* spores in air, *Journal of Hospital Infection*, 44 (2000) 81-92.
- [5] A.C. Pasqualotto, Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*, *Medical Mycology*, 47 (2009) S261-S270.
- [6] G. Thompson, T. Patterson, Pulmonary Aspergillosis, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 29 (2008) 103-110.
- [7] M. Kousha, R. Tadi, A.O. Soubani, Pulmonary aspergillosis: a clinical review, *European Respiratory Review*, 20 (2011) 156-174.
- [8] S.J. Lin, Aspergillosis Case-Fatality Rate: Systematic Review of the Literature, *Clinical Infectious Diseases*, 32 (2001) 358-366.
- [9] O.P. Sharma, R. Chwogule, Many faces of pulmonary aspergillosis, *European Respiratory Journal*, 12 (1998) 705-715.
- [10] T.R.T. Dagenais, N.P. Keller, Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (2009) 447-465.
- [11] O. Gungor, Z. Tamay, N. Guler, Z. Erturan, Frequency of fungi in respiratory samples from Turkish cystic fibrosis patients, *Mycoses*, (2012).
- [12] W.J. Steinbach, K.A. Marr, E.J. Anaissie, N. Azie, S.-P. Quan, H.-U. Meier-Kriesche, S. Apewokin, D.L. Horn, Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry, *Journal of Infection*, (2012).
- [13] R.D. Diamond, R.A. Clark, Damage to *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* Hyphae by Oxidative and Nonoxidative Microbicidal Products of Human Neutrophils In Vitro, *Infection and immunity*, (1982) 487-495.
- [14] S.M. Levitz, T.P. Farell, Human Neutrophil Degranulation Stimulated by *Aspergillus fumigatus* *J Leukoc Biol*, 47 (1990) 170-175.
- [15] A.O. Soubani, The Clinical Spectrum of Pulmonary Aspergillosis*, *Chest*, 121 (2002) 1988-1999.
- [16] F. Traunmuller, M. Popovic, K.H. Konz, F.M. Smolle-Juttner, C. Joukhadar, Efficacy and safety of current drug therapies for invasive aspergillosis, *Pharmacology*, 88 (2011) 213-224.
- [17] S.L. Gerson, G.H. Talbot, S. Hurwitz, B.L. Strom, E.J. Lusk, P.A. Cassileth, Prolonged granulocytopenia: the major risk factor for invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukemia, *Ann Intern Med*, 100 (1984) 345-351.
- [18] M.S. Lionakis, D.P. Kontoyiannis, Glucocorticoids and invasive fungal infections, *Lancet*, 362 (2003) 1828-1838.
- [19] M.M. McNeil, S.L. Nash, R.A. Hajjeh, M.A. Phelan, L.A. Conn, B.D. Plikaytism, D.W. Warnock, Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the united states, 1980–1997, *Clinical Infectious Diseases*, 33 (2001) 641-647.
- [20] M.A. Pfaller, D.J. Diekema, Epidemiology of Invasive Mycoses in North America, *Critical Reviews in Microbiology*, 36 (2010) 1-53.
- [21] A.H. Limper, K.S. Knox, G.A. Sarosi, N.M. Ampel, J.E. Bennett, A. Catanzaro, S.F. Davies, W.E. Dismukes, C.A. Hage, K.A. Marr, C.H. Mody, J.R. Perfect, D.A. Stevens, An Official American Thoracic Society Statement: Treatment of Fungal Infections in Adult Pulmonary and Critical Care Patients, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183 (2010) 96-128.
- [22] T.J. Walsh, E.J. Anaissie, D.W. Denning, R. Herbrecht, D.P. Kontoyiannis, K.A. Marr, V.A. Morrison, B.H. Segal, W.J. Steinbach, D.A. Stevens, J.A. van Burik, J.R. Wingard, T.F. Patterson, Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America, *Clin Infect Dis*, 46 (2008) 327-360.

- [23] M. Mikulska, A.M. Raiola, B. Bruno, E. Furfaro, M.T. Van Lint, S. Bregante, A. Ibatci, V. Del Bono, A. Bacigalupo, C. Viscoli, Risk factors for invasive aspergillosis and related mortality in recipients of allogeneic SCT from alternative donors: an analysis of 306 patients, *Bone Marrow Transplant*, 44 (2009) 361-370.
- [24] F. Reichenberger, J.M. Habicht, A. Gratwohl, M. Tamm, Diagnosis and treatment of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients, *European Respiratory Journal*, 19 (2002) 743-755.
- [25] S.P. Georgiadou, D.P. Kontoyiannis, Concurrent lung infections in patients with hematological malignancies and invasive pulmonary aspergillosis: How firm is the *Aspergillus* diagnosis?, *Journal of Infection*, 65 (2012) 262-268.
- [26] D.W. Denning, P. Lucio, J.H. Seabury, A. de Kochko, STATE-OF-THE-ART CLINICAL ARTICLE. Invasive Aspergillosis, *Clinical Infectious Diseases*, 26 (1998) 781-805.
- [27] H. Ohba, S. Miwa, M. Shirai, M. Kanai, T. Eifuku, T. Suda, H. Hayakawa, K. Chida, Clinical characteristics and prognosis of chronic pulmonary aspergillosis, *Respiratory Medicine*, 106 (2012) 724-729.
- [28] C.N. Grahame-Clarke, C.M. Roberts, D.W. Empey, Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis and pulmonary phycomycosis in cystic fibrosis, *Respir Med*, 88 (1994) 465-468.
- [29] R.E. Binder, L.J. Faling, R.D. Pugatch, C. Mahasaen, G.L. Snider, Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity, *Medicine (Baltimore)*, 61 (1982) 109-124.
- [30] D.W. Denning, Chronic forms of pulmonary aspergillosis, *Clinical Microbiology Infection*, 7 (2001) 25-31.
- [31] J. Camuset, H. Nunes, M.C. Dombret, A. Bergeron, P. Henno, B. Philippe, G. Dauriat, G. Mangiapan, A. Rabbat, J. Cadranet, Treatment of chronic pulmonary aspergillosis by voriconazole in nonimmunocompromised patients, *Chest*, 131 (2007) 1435-1441.
- [32] A.O. Soubani, G. Khanchandani, H.P. Ahmed, Clinical significance of lower respiratory tract *Aspergillus* culture in elderly hospitalized patients, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23 (2004) 491-494.
- [33] W. Meersseman, S.J. Vandecasteele, A. Wilmer, E. Verbeken, W.E. Peetermans, E. Van Wijngaerden, Invasive aspergillosis in critically ill patients without malignancy, *Am J Respir Crit Care Med*, 170 (2004) 621-625.
- [34] J.F. Tomee, T.S. van der Werf, Pulmonary aspergillosis, *Neth J Med*, 59 (2001) 244-258.
- [35] M. Kawamura, S. Maesaki, K. Tomono, T. Thashiro, S. Kohno, Clinical Evaluation of 61 Patients with Pulmonary Aspergilloma, *Internal medicine* 39 (2000) 209-212.
- [36] D.J. Addrizzo-Harris, T.J. Harkin, G. McGuinness, D.P. Naidich, W.N. Rom, Pulmonary Aspergilloma and AIDS: A Comparison of HIV-infected and HIV-Negative Individuals, *Chest*, 111 (1997) 612-618.
- [37] W.B. Geffter, The spectrum of pulmonary aspergillosis, *J Thorac Imaging*, 7 (1992) 56-74.
- [38] R. Agarwal, Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis, *Chest*, 135 (2009) 805-826.
- [39] A.S. Davis, R.B. Moss, V.P. Kurup, A.P. Knutsen, P. Greenberger, M.A. Judson, D.W. Denning, R. Cramer, A.S. Brody, M. Light, M. Skov, W. Maish, G. Mastella, Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis—State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference, *Clinical Infectious Diseases*, 37 (2003) S225-264.
- [40] S.S. Mroueh, A., Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis *Chest*, 105 (1994) 32-36.
- [41] H.E. Elphick, K.W. Southern, Antifungal therapies for allergic bronchopulmonary aspergillosis in people with cystic fibrosis, *Cochrane Database Syst Rev*, 6 (2012) CD002204.
- [42] R. Agarwal, A.L. Aggarwal, D. Gupta, S.K. Jindal, *Aspergillus* hypersensitivity and allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with bronchial asthma: systematic review and meta-analysis, *Int J Tuberc Lung Dis*, 13 (2009) 936-944.
- [43] V. Maurya, H.C. Gugnani, P.U. Sarma, T. Madan, A. Shah, Sensitization to *Aspergillus* antigens and occurrence of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with asthma, *Chest*, 127 (2005) 1252-1259.
- [44] K. Patterson, M.E. Streck, Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7 (2010) 237-244.

- [45] F.C. Odds, A.J.P. Brown, N.A.R. Gow, Antifungal agents: mechanisms of action, *Trends in Microbiology*, 11 (2003) 272-279.
- [46] Kotler-Brajtburg, e. coll., Molecular Basis for the Selective Toxicity of Amphotericin B for Yeast and Filippin for Animal Cells, *antimicrob Agents Chemother*, 5 (1974) 377-382.
- [47] S.C. Chen, T.C. Sorrell, Antifungal agents, *Med J Aust*, 187 (2007) 404-409.
- [48] A.H. Limper, K.S. Knox, G.A. Sarosi, N.M. Ampel, J.E. Bennett, A. Catanzaro, S.F. Davies, W.E. Dismukes, C.A. Hage, K.A. Marr, C.H. Mody, J.R. Perfect, D.A. Stevens, An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients, *Am J Respir Crit Care Med*, 183 (2011) 96-128.
- [49] R. Herbrecht, D.W. Denning, T.F. Patterson, J.E. Bennett, R.E. Greene, J.W. Oestmann, W.V. Kern, K.A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R.H. Rubin, J.R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P.H. Chandrasekar, M.R. Hodges, H.T. Schlamm, P.F. Troke, B. de Pauw, Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis, *N Engl J Med*, 347 (2002) 408-415.
- [50] M. Sandherr, G. Maschmeyer, Pharmacology and metabolism of voriconazole and Posaconazole in the treatment of invasive aspergillosis: review of the literature, *Eur J Med Res*, 16 (2011) 139-144.
- [51] M.A. Garbati, F.A. Alasmari, M.A. Al-Tannir, I.M. Tleyjeh, The role of combination antifungal therapy in the treatment of invasive aspergillosis: a systematic review, *Int J Infect Dis*, 16 (2012) e76-81.
- [52] K.A. Marr, M. Boeckh, R.A. Carter, H.W. Kim, L. Corey, Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis, *Clin Infect Dis*, 39 (2004) 797-802.
- [53] I. Shalit, Y. Shadkchan, Z. Samra, N. Osherov, In vitro synergy of caspofungin and itraconazole against *Aspergillus* spp.: MIC versus minimal effective concentration end points, *Antimicrob Agents Chemother*, 47 (2003) 1416-1418.
- [54] S. Seyedmousavi, R.J. Bruggemann, W.J. Melchers, A.J. Rijs, P.E. Verweij, J.W. Mouton, Efficacy and pharmacodynamics of voriconazole combined with anidulafungin in azole-resistant invasive aspergillosis, *J Antimicrob Chemother*, 68 (2013) 385-393.
- [55] S. Krishnan-Natesan, W. Wu, P.H. Chandrasekar, In vitro efficacy of the combination of voriconazole and anidulafungin against voriconazole-resistant cyp51A mutants of *Aspergillus fumigatus*, *Diagn Microbiol Infect Dis*, 73 (2012) 135-137.
- [56] M. Karthaus, Prophylaxis and treatment of invasive aspergillosis with voriconazole, posaconazole and caspofungin: review of the literature, *Eur J Med Res*, 16 (2011) 145-152.
- [57] N.V. Sipsas, D.P. Kontoyiannis, Clinical issues regarding relapsing aspergillosis and the efficacy of secondary antifungal prophylaxis in patients with hematological malignancies, *Clin Infect Dis*, 42 (2006) 1584-1591.
- [58] Z.H. Abdul Salam, R.B. Karlin, M.L. Ling, K.S. Yang, The impact of portable high-efficiency particulate air filters on the incidence of invasive aspergillosis in a large acute tertiary-care hospital, *Am J Infect Control*, 38 (2010) e1-7.
- [59] T. Hahn, K.M. Cummings, A.M. Michalek, B.J. Lipman, B.H. Segal, P.L. McCarthy, Jr., Efficacy of high-efficiency particulate air filtration in preventing aspergillosis in immunocompromised patients with hematologic malignancies, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 23 (2002) 525-531.
- [60] T. Saito, S. Fujiuchi, Y. Tao, Y. Sasaki, K. Ogawa, K. Suzuki, A. Tada, M. Kuba, T. Kato, M. Kawabata, A. Kurashima, M. Sakatani, Efficacy and safety of voriconazole in the treatment of chronic pulmonary aspergillosis: experience in Japan, *Infection*, (2012).
- [61] K. Yoshida, A. Kurashima, K. Kamei, M. Oritsu, T. Ando, T. Yamamoto, Y. Niki, Efficacy and safety of short- and long-term treatment of itraconazole on chronic necrotizing pulmonary aspergillosis in multicenter study, *J Infect Chemother*, 18 (2012) 378-385.
- [62] T.S. Jennings, T.C. Hardin, Treatment of aspergillosis with itraconazole, *Ann Pharmacother*, 27 (1993) 1206-1211.
- [63] C.A. Kauffman, Quandary about treatment of aspergillomas persists, *Lancet*, 347 (1996) 1640.

- [64] E. Tsubura, [Multicenter clinical trial of itraconazole in the treatment of pulmonary aspergilloma. Pulmonary Aspergilloma Study Group], *Kekkaku*, 72 (1997) 557-564.
- [65] M. Fujita, Y. Tao, A. Kajiki, H. Ouchi, E. Harada, S. Ikegame, T. Matsumoto, J. Uchino, K. Watanabe, Y. Nakanishi, The clinical efficacy and safety of micafungin–itraconazole combination therapy in patients with pulmonary aspergilloma, *Journal of Infection and Chemotherapy*, (2012).
- [66] M. Skov, N. Hoiby, C. Koch, Itraconazole treatment of allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis, *Allergy*, 57 (2002) 723-728.
- [67] M. Sinnollareddy, S.L. Peake, M.S. Roberts, J. Lipman, J.A. Roberts, Using pharmacokinetics and pharmacodynamics to optimise dosing of antifungal agents in critically ill patients: a systematic review, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39 (2012) 1-10.
- [68] M.L. Goodwin, R.H. Drew, Antifungal serum concentration monitoring: an update, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61 (2007) 17-25.
- [69] R.E. Lewis, Managing drug interactions in the patient with aspergillosis, *Medical Mycology*, 44 (2006) 349-356.
- [70] D. Andes, A. Pascual, O. Marchetti, Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications, *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (2009) 24-34.
- [71] D.W. Bates, L. Su, D.T. Yu, G.M. Chertow, D.L. Seger, D.R. Gomes, E.J. Dasbach, R. Platt, Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy, *Clinical Infectious Diseases*, 32 (2001) 686-693.
- [72] J.R. Wingard, P. Kubilis, L. Lee, G. Yee, M. White, L. Walshe, R. Bowden, E. Anaissie, J. Hiemenz, J. Lister, Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis, *Clin Infect Dis*, 29 (1999) 1402-1407.
- [73] C.G. Baxter, A. Marshall, M. Roberts, T.W. Felton, D.W. Denning, Peripheral neuropathy in patients on long-term triazole antifungal therapy, *J Antimicrob Chemother*, 66 (2011) 2136-2139.
- [74] C. Lass-Flörl, Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review, *Drugs*, 71 (2011) 2405-2419.
- [75] J.M. Lestner, S.A. Roberts, C.B. Moore, S.J. Howard, D.W. Denning, W.W. Hope, Toxicodynamics of itraconazole: implications for therapeutic drug monitoring, *Clin Infect Dis*, 49 (2009) 928-930.
- [76] A.G. Prentice, A. Glasmacher, Making sense of itraconazole pharmacokinetics, *J Antimicrob Chemother*, 56 Suppl 1 (2005) i17-i22.
- [77] D.W. Denning, J.Y. Lee, J.S. Hostetler, P. Pappas, C.A. Kauffman, D.H. Dewsnup, J.N. Galgiani, J.R. Graybill, A.M. Sugar, A. Catanzaro, et al., NIAID Mycoses Study Group Multicenter Trial of Oral Itraconazole Therapy for Invasive Aspergillosis, *Am J Med*, 97 (1994) 135-144.
- [78] A. Pascual, T. Calandra, S. Bolay, T. Buclin, J. Bille, O. Marchetti, Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes, *Clin Infect Dis*, 46 (2008) 201-211.
- [79] Z. Desta, X. Zhao, J.G. Shin, D.A. Flockhart, Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism, *Clin Pharmacokinet*, 41 (2002) 913-958.
- [80] J.M. Poirier, F. Berlioz, F. Isnard, G. Cheymol, Marked intra- and inter-patient variability of itraconazole steady state plasma concentrations, *Therapie*, 51 (1996) 163-167.
- [81] R. Courtney, D. Wexler, E. Radwanski, J. Lim, M. Laughlin, Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults, *Br J Clin Pharmacol*, 57 (2004) 218-222.
- [82] F. Ezzet, D. Wexler, R. Courtney, G. Krishna, J. Lim, M. Laughlin, Oral bioavailability of posaconazole in fasted healthy subjects: comparison between three regimens and basis for clinical dosage recommendations, *Clin Pharmacokinet*, 44 (2005) 211-220.
- [83] A. Ghosal, N. Hapangama, Y. Yuan, J. Achanfuo-Yeboah, R. Iannucci, S. Chowdhury, K. Alton, J.E. Patrick, S. Zbaida, Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of posaconazole (Noxafil), *Drug Metab Dispos*, 32 (2004) 267-271.
- [84] M.J. Dolton, J.E. Ray, D. Marriott, A.J. McLachlan, Posaconazole exposure-response relationship: evaluating the utility of therapeutic drug monitoring, *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (2012) 2806-2813

- [85] A. Mayr, C. Lass-Flörl, Epidemiology and antifungal resistance in invasive Aspergillosis according to primary disease: review of the literature, *Eur J Med Res*, 16 (2011) 153-157.
- [86] S.J. Howard, D. Cerar, M.J. Anderson, A. Albarrag, M.C. Fisher, A.C. Pasqualotto, M. Laverdiere, M.C. Arendrup, D.S. Perlin, D.W. Denning, Frequency and evolution of Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure, *Emerg Infect Dis*, 15 (2009) 1068-1076.
- [87] S.P. Georgiadou, D.P. Kontoyiannis, The impact of azole resistance on aspergillosis guidelines, *Ann N Y Acad Sci*, 1272 (2012) 15-22.
- [88] D.W. Denning, S.A. Radford, K.L. Oakley, L. Hall, E.M. Johnson, D.W. Warnock, Correlation between in-vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo outcome of *Aspergillus fumigatus* infection, *J Antimicrob Chemother*, 40 (1997) 401-414.
- [89] P. Bowyer, C.B. Moore, R. Rautemaa, D.W. Denning, M.D. Richardson, Azole antifungal resistance today: focus on *Aspergillus*, *Curr Infect Dis Rep*, 13 (2011) 485-491.
- [90] P. Escribano, S. Recio, T. Pelaez, M. Gonzalez-Rivera, E. Bouza, J. Guinea, In vitro acquisition of secondary azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates after prolonged exposure to itraconazole: presence of heteroresistant populations, *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (2012) 174-178.
- [91] K.A. Rodvold, L. Yoo, J.M. George, Penetration of anti-infective agents into pulmonary epithelial lining fluid: focus on antifungal, antitubercular and miscellaneous anti-infective agents, *Clin Pharmacokinet*, 50 (2011) 689-704.
- [92] I. Sermet-Gaudelus, A. Lesne-Hulin, G. Lenoir, E. Singlas, P. Berche, C. Hennequin, Sputum itraconazole concentrations in cystic fibrosis patients, *Antimicrob Agents Chemother*, 45 (2001) 1937-1938.
- [93] S.D. Allen, K.N. Sorensen, M.J. Nejdil, C. Durrant, R.T. Proffit, Prophylactic efficacy of aerosolized liposomal (AmBisome) and non-liposomal (Fungizone) amphotericin B in murine pulmonary aspergillosis, *J Antimicrob Chemother*, 34 (1994) 1001-1013.
- [94] W.R. Kirkpatrick, L.K. Najvar, A.C. Vallor, N.P. Wiederhold, R. Bocanegra, J. Pfeiffer, K. Perkins, A.R. Kugler, T.D. Sweeney, T.F. Patterson, Prophylactic efficacy of single dose pulmonary administration of amphotericin B inhalation powder in a guinea pig model of invasive pulmonary aspergillosis, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (2012) 970-976.
- [95] Z. Al-Nakeeb, A. Sudan, A.R. Jeans, L. Gregson, J. Goodwin, P.A. Warn, T.W. Felton, S.J. Howard, W.W. Hope, Pharmacodynamics of itraconazole against *Aspergillus fumigatus* in an in vitro model of the human alveolus: perspectives on the treatment of triazole-resistant infection and utility of airway administration, *Antimicrob Agents Chemother*, 56 (2012) 4146-4153.
- [96] K.M. Ho, O. Duff, D. Chambers, R. Murray, Meta-analysis of nebulized amphotericin B to prevent or treat pulmonary aspergillosis in immunosuppressed animals, *Transpl Infect Dis*, 10 (2008) 168-176.
- [97] M.P. Lambros, D.W. Bourne, S.A. Abbas, D.L. Johnson, Disposition of aerosolized liposomal amphotericin B, *J Pharm Sci*, 86 (1997) 1066-1069.
- [98] V. Monforte, P. Ussetti, R. Lopez, J. Gavalda, C. Bravo, A. de Pablo, L. Pou, A. Pahissa, F. Morell, A. Roman, Nebulized liposomal amphotericin B prophylaxis for *Aspergillus* infection in lung transplantation: pharmacokinetics and safety, *J Heart Lung Transplant*, 28 (2009) 170-175.
- [99] J. Gavalda, M.T. Martin, P. Lopez, X. Gomis, J.L. Ramirez, D. Rodriguez, O. Len, Y. Puigfel, I. Ruiz, A. Pahissa, Efficacy of nebulized liposomal amphotericin B in treatment of experimental pulmonary aspergillosis, *Antimicrob Agents Chemother*, 49 (2005) 3028-3030.
- [100] C.A. Alvarez, N.P. Wiederhold, J.T. McConville, J.I. Peters, L.K. Najvar, J.R. Graybill, J.J. Coalson, R.L. Talbert, D.S. Burgess, R. Bocanegra, K.P. Johnston, R.O. Williams, 3rd, Aerosolized nanostructured itraconazole as prophylaxis against invasive pulmonary aspergillosis, *J Infect*, 55 (2007) 68-74.
- [101] E.J. Ruijgrok, M.H. Fens, I.A. Bakker-Woudenberg, E.W. van Etten, A.G. Vulto, Nebulized amphotericin B combined with intravenous amphotericin B in rats with severe invasive pulmonary aspergillosis, *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (2006) 1852-1854.

- [102] R.H. Drew, E. Dodds Ashley, D.K. Benjamin, Jr., R. Duane Davis, S.M. Palmer, J.R. Perfect, Comparative safety of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate as aerosolized antifungal prophylaxis in lung-transplant recipients, *Transplantation*, 77 (2004) 232-237.
- [103] B.J. Hoeben, D.S. Burgess, J.T. McConville, L.K. Najvar, R.L. Talbert, J.I. Peters, N.P. Wiederhold, B.L. Frei, J.R. Graybill, R. Bocanegra, K.A. Overhoff, P. Sinswat, K.P. Johnston, R.O. Williams, 3rd, In vivo efficacy of aerosolized nanostructured itraconazole formulations for prevention of invasive pulmonary aspergillosis, *Antimicrob Agents Chemother*, 50 (2006) 1552-1554.
- [104] J.T. McConville, K.A. Overhoff, P. Sinswat, J.M. Vaughn, B.L. Frei, D.S. Burgess, R.L. Talbert, J.I. Peters, K.P. Johnston, R.O. Williams, 3rd, Targeted high lung concentrations of itraconazole using nebulized dispersions in a murine model, *Pharm Res*, 23 (2006) 901-911.
- [105] J.A. Tolman, N.P. Wiederhold, J.T. McConville, L.K. Najvar, R. Bocanegra, J.I. Peters, J.J. Coalson, J.R. Graybill, T.F. Patterson, R.O. Williams, 3rd, Inhaled voriconazole for prevention of invasive pulmonary aspergillosis, *Antimicrob Agents Chemother*, 53 (2009) 2613-2615.
- [106] J.A. Tolman, N.A. Nelson, S. Bosselmann, J.I. Peters, J.J. Coalson, N.P. Wiederhold, R.O. Williams, 3rd, Dose tolerability of chronically inhaled voriconazole solution in rodents, *Int J Pharm*, 379 (2009) 25-31.
- [107] J.M. Vaughn, N.P. Wiederhold, J.T. McConville, J.J. Coalson, R.L. Talbert, D.S. Burgess, K.P. Johnston, R.O. Williams, 3rd, J.I. Peters, Murine airway histology and intracellular uptake of inhaled amorphous itraconazole, *Int J Pharm*, 338 (2007) 219-224.
- [108] O. Hilberg, C.U. Andersen, O. Henning, T. Lundby, J. Mortensen, E. Bendstrup, Remarkably efficient inhaled antifungal monotherapy for invasive pulmonary aspergillosis, *Eur Respir J*, 40 (2012) 271-273.
- [109] J.S. Patton, J.D. Brain, L.A. Davies, J. Fiegel, M. Gumbleton, K.J. Kim, M. Sakagami, R. Vanbever, C. Ehrhardt, The particle has landed--characterizing the fate of inhaled pharmaceuticals, *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 23 Suppl 2 (2010) S71-87.
- [110] <http://health.allrefer.com>.
- [111] E.R. Weibel, *Morphometry of the human lung*, Springer, Berlin,, 1963.
- [112] H. Itoh, M. Nishino, H. Hatabu, Architecture of the lung: morphology and function, *J Thorac Imaging*, 19 (2004) 221-227.
- [113] A.J. Hickey, *Pharmaceutical inhalation aerosol technology*, 2nd ed., M. Dekker, New York, 2004.
- [114] M. Lippmann, D.B. Yeates, R.E. Albert, Deposition, retention, and clearance of inhaled particles, *Br J Ind Med*, 37 (1980) 337-362.
- [115] G. Cinnella, C. Giardina, A. Fischetti, G. Lecce, M.G. Fiore, G. Serio, G. Carravetta, M. Dambrosio, T. Fiore, Airways humidification during mechanical ventilation. Effects on tracheobronchial ciliated cells morphology, *Minerva Anestesiol*, 71 (2005) 585-593.
- [116] S. Marfatia, P.K. Donahoe, W.H. Hendren, Effect of dry and humidified gases on the respiratory epithelium in rabbits, *J Pediatr Surg*, 10 (1975) 583-592.
- [117] M.P. Shelly, G.M. Lloyd, G.R. Park, A review of the mechanisms and methods of humidification of inspired gases, *Intensive Care Med*, 14 (1988) 1-9.
- [118] M.A. Tamer, J.H. Modell, C.N. Rieffel, Hyponatremia secondary to ultrasonic aerosol therapy in the newborn infant, *J Pediatr*, 77 (1970) 1051-1054.
- [119] http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/Respiratory%20System.htm.
- [120] J.S. Patton, P.R. Byron, Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat Rev Drug Discov*, 6 (2007) 67-74.
- [121] J.S. Patton, Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. , *Adv Drug Deliv Rev*, 19 (1996) 3-36.
- [122] A.J. Hickey, *Inhalation aerosols : physical and biological basis for therapy*, 2nd ed., Informa Healthcare, New York, 2007.
- [123] J.V. Fahy, B.F. Dickey, Airway mucus function and dysfunction, *N Engl J Med*, 363 (2010) 2233-2247.
- [124] C.M. Evans, J.S. Koo, Airway mucus: The good, the bad, the sticky, *Pharmacology & Therapeutics*, 121 (2009) 332-348.

- [125] Y. Soini, Tight junctions in lung cancer and lung metastasis: a review, *Int J Clin Exp Pathol*, 5 (2012) 126-136.
- [126] M.M. Ayers, P.K. Jeffery, Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium, *Eur Respir J*, 1 (1988) 58-80.
- [127] H. Fischer, J.H. Widdicombe, Mechanisms of acid and base secretion by the airway epithelium, *J Membr Biol*, 211 (2006) 139-150.
- [128] J.M. Hohlfeld, The role of surfactant in asthma, *Respir Res*, 3 (2002) 4.
- [129] J.G. Widdicombe, Airway liquid: a barrier to drug diffusion?, *Eur Respir J*, 10 (1997) 2194-2197.
- [130] R.H. Notter, *Lung surfactants : basic science and clinical applications*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [131] A.H. de Boer, D. Gjaltema, P. Hagedoorn, H.W. Frijlink, Characterization of inhalation aerosols: a critical evaluation of cascade impactor analysis and laser diffraction technique, *Int J Pharm*, 249 (2002) 219-231.
- [132] X.M. Zeng, G.P. Martin, C. Marriott, *Particulate interactions in dry powder formulations for inhalation*, Taylor & Francis, London ; New York, 2001.
- [133] W. Yang, J.I. Peters, R.O. Williams, 3rd, Inhaled nanoparticles--a current review, *Int J Pharm*, 356 (2008) 239-247.
- [134] I. Balashazy, M. Moustafa, W. Hofmann, R. Szoke, A. El-Hussein, A.R. Ahmed, Simulation of fiber deposition in bronchial airways, *Inhal Toxicol*, 17 (2005) 717-727.
- [135] W.C. Hinds, *Aerosol technology : properties, behavior, and measurement of airborne particles*, 2nd ed., Wiley, New York, 1999.
- [136] M.J. Telko, A.J. Hickey, Dry powder inhaler formulation, *Respir Care*, 50 (2005) 1209-1227.
- [137] N.R. Labiris, M.B. Dolovich, Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications, *Br J Clin Pharmacol*, 56 (2003) 588-599.
- [138] K.V. Dinh, D.J. Myers, P.D. Noymer, J.V. Cassella, In vitro aerosol deposition in the oropharyngeal region for Staccato loxapine, *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*, 23 (2010) 253-260.
- [139] Y. Imai, T. Miki, T. Ishikawa, T. Aoki, T. Yamaguchi, Deposition of micrometer particles in pulmonary airways during inhalation and breath holding, *J Biomech*, 45 (2012) 1809-1815.
- [140] T. Ehtezazi, I. Saleem, I. Shrubbs, D.R. Allanson, I.D. Jenkinson, C. O'Callaghan, The interaction between the oropharyngeal geometry and aerosols via pressurised metered dose inhalers, *Pharm Res*, 27 (2010) 175-186.
- [141] H.Y. Luo, Y. Liu, X.L. Yang, Particle deposition in obstructed airways, *J Biomech*, 40 (2007) 3096-3104.
- [142] K. Svartengren, M. Anderson, M. Svartengren, K. Philipson, P. Camner, Oropharyngeal deposition of 3.5 microns particles inhaled through an elongated mouthpiece, *Eur Respir J*, 9 (1996) 1556-1559.
- [143] http://dapharmprac.blogspot.be/2009_10_01_archive.html.
- [144] T. Meyer, B. Mullinger, K. Sommerer, G. Scheuch, P. Brand, H. Beckmann, K. Haussinger, N. Weber, R. Siekmeier, Pulmonary deposition of monodisperse aerosols in patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Exp Lung Res*, 29 (2003) 475-484.
- [145] J.B. West, *Pulmonary pathophysiology : the essentials*, 8th ed., Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, Philadelphia, 2012.
- [146] M. Lippmann, R.B. Schlesinger, Interspecies comparisons of particle deposition and mucociliary clearance in tracheobronchial airways, *J Toxicol Environ Health*, 13 (1984) 441-469.
- [147] K.C. Stone, R.R. Mercer, P. Gehr, B. Stockstill, J.D. Crapo, Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 6 (1992) 235-243.
- [148] A.G. Harmsen, B.A. Muggenburg, M.B. Snipes, D.E. Bice, The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes, *Science*, 230 (1985) 1277-1280.
- [149] J.P. Mizgerd, Acute lower respiratory tract infection, *N Engl J Med*, 358 (2008) 716-727.
- [150] D.A. Groneberg, C. Witt, U. Wagner, K.F. Chung, A. Fischer, Fundamentals of pulmonary drug delivery, *Respir Med*, 97 (2003) 382-387.

- [151] S. Chono, T. Tanino, T. Seki, K. Morimoto, Influence of particle size on drug delivery to rat alveolar macrophages following pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into liposomes, *J Drug Target*, 14 (2006) 557-566.
- [152] J.M. Lauweryns, J.H. Baert, Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics, *Am Rev Respir Dis*, 115 (1977) 625-683.
- [153] J.A. Champion, S. Mitragotri, Role of target geometry in phagocytosis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (2006) 4930-4934.
- [154] S. Anttila, H. Raunio, J. Hakkola, Cytochrome P450-mediated pulmonary metabolism of carcinogens: regulation and cross-talk in lung carcinogenesis, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44 (2011) 583-590.
- [155] G.I. Somers, N. Lindsay, B.M. Lowdon, A.E. Jones, C. Freathy, S. Ho, A.J. Woodrooffe, M.K. Bayliss, G.R. Manjee, A comparison of the expression and metabolizing activities of phase I and II enzymes in freshly isolated human lung parenchymal cells and cryopreserved human hepatocytes, *Drug Metab Dispos*, 35 (2007) 1797-1805.
- [156] J.S. Patton, C.S. Fishburn, J.G. Weers, The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery, *Proc Am Thorac Soc*, 1 (2004) 338-344.
- [157] A. Tunek, K. Sjodin, G. Hallstrom, Reversible formation of fatty acid esters of budesonide, an antiasthma glucocorticoid, in human lung and liver microsomes, *Drug Metab Dispos*, 25 (1997) 1311-1317.
- [158] K.I. van den Brink, M. Boorsma, A.J. Staal-van den Brekel, S. Edsbacker, E.F. Wouters, L. Thorsson, Evidence of the in vivo esterification of budesonide in human airways, *Br J Clin Pharmacol*, 66 (2008) 27-35.
- [159] P.T. Daley-Yates, A.C. Price, J.R. Sisson, A. Pereira, N. Dallow, Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man, *Br J Clin Pharmacol*, 51 (2001) 400-409.
- [160] L.A. Kroon, Drug interactions with smoking, *Am J Health Syst Pharm*, 64 (2007) 1917-1921.
- [161] K.M. Giacomini, S.M. Huang, D.J. Tweedie, L.Z. Benet, K.L. Brouwer, X. Chu, A. Dahlin, R. Evers, V. Fischer, K.M. Hillgren, K.A. Hoffmaster, T. Ishikawa, D. Keppler, R.B. Kim, C.A. Lee, M. Niemi, J.W. Polli, Y. Sugiyama, P.W. Swaan, J.A. Ware, S.H. Wright, S.W. Yee, M.J. Zamek-Gliszczynski, L. Zhang, Membrane transporters in drug development, *Nat Rev Drug Discov*, 9 (2010) 215-236.
- [162] K. Sugano, M. Kansy, P. Artursson, A. Avdeef, S. Bendels, L. Di, G.F. Ecker, B. Faller, H. Fischer, G. Gerebtzoff, H. Lennernaes, F. Senner, Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport, *Nat Rev Drug Discov*, 9 (2010) 597-614.
- [163] J.A. Tolman, R.O. Williams, 3rd, Advances in the pulmonary delivery of poorly water-soluble drugs: influence of solubilization on pharmacokinetic properties, *Drug Dev Ind Pharm*, 36 (2010) 1-30.
- [164] E. Rytting, M. Bur, R. Cartier, T. Bouyssou, X. Wang, M. Kruger, C.M. Lehr, T. Kissel, In vitro and in vivo performance of biocompatible negatively-charged salbutamol-loaded nanoparticles, *J Control Release*, 141 (2010) 101-107.
- [165] J.F. Marier, J.L. Brazier, J. Lavigne, M.P. Ducharme, Liposomal tobramycin against pulmonary infections of *Pseudomonas aeruginosa*: a pharmacokinetic and efficacy study following single and multiple intratracheal administrations in rats, *J Antimicrob Chemother*, 52 (2003) 247-252.
- [166] X. Chen, W. Huang, B.C. Wong, L. Yin, Y.F. Wong, M. Xu, Z. Yang, Liposomes prolong the therapeutic effect of anti-asthmatic medication via pulmonary delivery, *Int J Nanomedicine*, 7 (2012) 1139-1148.
- [167] L. Willis, D. Hayes, Jr., H.M. Mansour, Therapeutic liposomal dry powder inhalation aerosols for targeted lung delivery, *Lung*, 190 (2012) 251-262.
- [168] Y. Tsutsumi, S. Tsunoda, H. Kamada, T. Kihira, Y. Kaneda, Y. Ohsugi, T. Mayumi, PEGylation of interleukin-6 effectively increases its thrombopoietic potency, *Thromb Haemost*, 77 (1997) 168-173.

- [169] C. Brindley, C. Falcoz, A.E. Mackie, A. Bye, Absorption kinetics after inhalation of fluticasone propionate via the Diskhaler, Diskus and metered-dose inhaler in healthy volunteers, *Clin Pharmacokinet*, 39 Suppl 1 (2000) 1-8.
- [170] N. Esmailpour, P. Hogger, K.F. Rabe, U. Heitmann, M. Nakashima, P. Rohdewald, Distribution of inhaled fluticasone propionate between human lung tissue and serum in vivo, *Eur Respir J*, 10 (1997) 1496-1499.
- [171] L. Thorsson, S. Edsbacker, A. Kallen, C.G. Lofdahl, Pharmacokinetics and systemic activity of fluticasone via Diskus and pMDI, and of budesonide via Turbuhaler, *Br J Clin Pharmacol*, 52 (2001) 529-538.
- [172] R. Amitani, T. Murayama, R. Nawada, W.J. Lee, A. Niimi, K. Suzuki, E. Tanaka, F. Kuze, Aspergillus culture filtrates and sputum sols from patients with pulmonary aspergillosis cause damage to human respiratory ciliated epithelium in vitro, *Eur Respir J*, 8 (1995) 1681-1687.
- [173] T. Madan, P. Eggleton, U. Kishore, P. Strong, S.S. Aggrawal, P.U. Sarma, K.B. Reid, Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to Aspergillus fumigatus conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages, *Infect Immun*, 65 (1997) 3171-3179.
- [174] M.J. Allen, D.R. Voelker, R.J. Mason, Interactions of surfactant proteins A and D with Saccharomyces cerevisiae and Aspergillus fumigatus, *Infect Immun*, 69 (2001) 2037-2044.
- [175] P. Gomez, T.L. Hackett, M.M. Moore, D.A. Knight, S.J. Tebbutt, Functional genomics of human bronchial epithelial cells directly interacting with conidia of Aspergillus fumigatus, *BMC Genomics*, 11 (2010) 358.
- [176] J.A. Wasylnka, M.M. Moore, Aspergillus fumigatus conidia survive and germinate in acidic organelles of A549 epithelial cells, *J Cell Sci*, 116 (2003) 1579-1587.
- [177] R. Amitani, R. Kawanami, Interaction of Aspergillus with human respiratory mucosa: a study with organ culture model, *Med Mycol*, 47 Suppl 1 (2009) S127-131.
- [178] N. Oshero, Interaction of the pathogenic mold Aspergillus fumigatus with lung epithelial cells, *Front Microbiol*, 3 (2012) 346.
- [179] D.I. Marks, A. Pagliuca, C.C. Kibbler, A. Glasmacher, C.P. Heussel, M. Kantecki, P.J. Miller, P. Ribaud, H.T. Schlamm, C. Solano, G. Cook, Voriconazole versus itraconazole for antifungal prophylaxis following allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation, *Br J Haematol*, 155 (2011) 318-327.
- [180] W. Yang, K.P. Johnston, R.O. Williams, 3rd, Comparison of bioavailability of amorphous versus crystalline itraconazole nanoparticles via pulmonary administration in rats, *Eur J Pharm Biopharm*, 75 (2010) 33-41.
- [181] N.R. Labiris, M.B. Dolovich, Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications, *Br J Clin Pharmacol*, 56 (2003) 600-612.
- [182] T. Osaki, T. Hanagiri, R. Nakanishi, I. Yoshino, S. Taga, K. Yasumoto, Bronchial arterial infusion is an effective therapeutic modality for centrally located early-stage lung cancer: results of a pilot study, *Chest*, 115 (1999) 1424-1428.
- [183] G. Pilcer, K. Amighi, Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery, *Int J Pharm*, 392 (2010) 1-19.
- [184] K. Six, G. Verreck, J. Peeters, M. Brewster, G. Van Den Mooter, Increased physical stability and improved dissolution properties of itraconazole, a class II drug, by solid dispersions that combine fast- and slow-dissolving polymers, *J Pharm Sci*, 93 (2004) 124-131.
- [185] A.T. Serajuddin, Solid dispersion of poorly water-soluble drugs: early promises, subsequent problems, and recent breakthroughs, *J Pharm Sci*, 88 (1999) 1058-1066.
- [186] B. Van Eerdenbrugh, G. Van den Mooter, P. Augustijns, Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products, *Int J Pharm*, 364 (2008) 64-75.
- [187] J. Hecq, M. Deleers, D. Fanara, H. Vranckx, K. Amighi, Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine, *Int J Pharm*, 299 (2005) 167-177.

- [188] C.M. Keck, R.H. Muller, Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation, *Eur J Pharm Biopharm*, 62 (2006) 3-16.
- [189] M. Miric, D. Plavec, Risk of acute bronchospasm and bronchial hyperreactivity from inhaled acid aerosol in healthy subjects: randomized, double-blind controlled trial, *Croat Med J*, 45 (2004) 709-714.
- [190] N. Wauthoz, P. Deleuze, A. Saumet, C. Duret, R. Kiss, K. Amighi, Temozolomide-based dry powder formulations for lung tumor-related inhalation treatment, *Pharm Res*, 28 (2011) 762-775.
- [191] T. Sebti, K. Amighi, Preparation and in vitro evaluation of lipidic carriers and fillers for inhalation, *Eur J Pharm Biopharm*, 63 (2006) 51-58.
- [192] G. Pilcer, T. Sebti, K. Amighi, Formulation and characterization of lipid-coated tobramycin particles for dry powder inhalation, *Pharm Res*, 23 (2006) 931-940.
- [193] F. Depreter, K. Amighi, Formulation and in vitro evaluation of highly dispersive insulin dry powder formulations for lung administration, *Eur J Pharm Biopharm*, 76 (2010) 454-463.
- [194] W. Yang, N.P. Wiederhold, R.O. Williams, 3rd, Drug delivery strategies for improved azole antifungal action, *Expert Opin Drug Deliv*, 5 (2008) 1199-1216.
- [195] E. Calvo, F.J. Pastor, V. Salas, E. Mayayo, J. Guarro, Combined therapy of voriconazole and anidulafungin in murine infections by *Aspergillus flavus*, *Mycopathologia*, 173 (2012) 251-257.
- [196] K. Takemoto, Y. Yamamoto, Y. Ueda, K. Kanazawa, K. Yoshida, Y. Niki, Comparative study on the efficacy of liposomal amphotericin B and voriconazole in a murine pulmonary aspergillosis model, *Chemotherapy*, 55 (2009) 105-113.
- [197] K. Hata, T. Horii, M. Miyazaki, N.A. Watanabe, M. Okubo, J. Sonoda, K. Nakamoto, K. Tanaka, S. Shirotori, N. Murai, S. Inoue, M. Matsukura, S. Abe, K. Yoshimatsu, M. Asada, Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis, *Antimicrob Agents Chemother*, 55 (2011) 4543-4551.
- [198] D.C. Sheppard, G. Rieg, L.Y. Chiang, S.G. Filler, J.E. Edwards, Jr., A.S. Ibrahim, Novel inhalational murine model of invasive pulmonary aspergillosis, *Antimicrob Agents Chemother*, 48 (2004) 1908-1911.