

Université de Montréal

Caractérisation et évaluation de textiles antifongiques

Par : Mirza Akram Hossain

Faculté de Pharmacie

**Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et post-doctorales
en vue de l'obtention du grade de M. Sc en sciences pharmaceutiques
option technologie pharmaceutique**

Décembre, 2014

©, Mirza Akram Hossain, 2014

Résumé en français

Hypothèse: L'impression sur textile d'une formulation de microparticules lipidiques avec un principe actif (éconazole nitrate) permet de conserver ou d'améliorer son activité pharmaceutique *ex vivo* et *in vitro*.

Méthode: Une formulation de microparticules d'éconazole nitrate (ECN) a été formulée par homogénéisation à haut cisaillement, puis imprimée sur un textile Laya™ par une méthode de sérigraphie. La taille des microparticules, la température de fusion des microparticules sur textile et la teneur en éconazole du tissu ont été déterminées. La stabilité de la formulation a été suivie pendant 4 mois à 25°C avec 65% humidité résiduelle (RH). L'activité *in vitro* des textiles pharmaceutiques a été mesurée et comparée à la formulation commerciale 1% éconazole nitrate (w/w) sur plusieurs espèces de champignons dont le *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. luminisita*, *T. mentagrophytes* et *T. rubrum*. La thermosensibilité des formulations a été étudiée par des tests de diffusion *in vitro* en cellules de Franz. L'absorption cutanée de l'éconazole a été évaluée *ex vivo* sur la peau de cochon.

Résultats: Les microparticules d'éconazole avaient des tailles de 3.5 ± 0.1 μm . La température de fusion était de 34.8°C. La thermosensibilité a été déterminée par un relargage deux fois supérieur à 32°C comparés à 22°C sur 6 heures.

Les textiles ont présenté une teneur stable pendant 4 mois. Les textiles d'ECN *in vitro* ont démontré une activité similaire à la formulation commerciale sur toutes

espèces de *Candida* testées, ainsi qu'une bonne activité contre les dermatophytes. La diffusion sur peau de cochon a démontré une accumulation supérieure dans le stratum corneum de la formulation textile par rapport à la formulation Pevaryl® à 1% ECN. La thermo-sensibilité de la formulation a permis un relargage sélectif au contact de la peau, tout en assurant une bonne conservation à température ambiante.

Mots-clés: éconazole nitrate, microparticules lipidiques, infection fongique, administration topique, formulation thermosensible

Résumé en anglais

Hypothesis: Textile imprinted with a formulation of microparticles of a drug (econazole nitrate) can maintain or improve its pharmaceutical activity *ex vivo* and *in vitro*.

Methods: A formulation of econazole nitrate microparticles was made by high shear homogenization then printed on a Laya™ textile by screen-printing. The size of microparticles, melting temperature of microparticles on textile and econazole nitrate content were determined. The stability of the formulation was followed for 4 months at 25°C with 65% residual humidity (RH). The *in vitro* activity of pharmaceutical textiles was measured and compared to the commercial formulation econazole nitrate 1% (w/w) in several species of fungi including *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. luminisitae*, *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*. Temperature sensitivity of the formulations was studied by *in vitro* tests in Franz diffusion cells. Dermal absorption of econazole nitrate was assessed *ex vivo* on pig skin.

Results: Econazole microparticles were 3.5 ± 0.1 μm in diameter. The melting temperature was 34.8°C. The thermosensitivity of the system was determined by a release test at 32°C compared to 22°C over 6 hours. Textiles showed stable levels for 4 months (97 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$). ECN textiles on *in vitro* tests showed similar activity to the commercial formulation on all *Candida* species tested, as well as good activity against dermatophytes. *Ex vivo* tests on pig skin showed a higher accumulation of ECN on the stratum corneum for textile formulation as compared to the Pevaryl®

formulation. The thermo-sensitivity of the formulation permits a selective release in contact with the skin, while ensuring good storage at room temperature.

Keywords: Econazole nitrate, fungal infection, topical administration, thermo-responsive formulation, lipid microparticles

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à mon père, ma mère, ma sœur, mes grands-parents et à toute ma famille qui ma supporté pendant mes études.

Comme vous l'avez toujours dit depuis que je suis petit :

“Ceux qui risquent rien, accomplissent rien”

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de maîtrise Jeanne Leblond Chain pour m'avoir pris dans son laboratoire de recherche. Je lui souhaite un bon rétablissement et un bon retour au travail après son bébé.

Je tiens à remercier l'équipe de Biomod Concepts, surtout Pierre Simard pour m'avoir accueilli dans la compagnie. Je tiens à remercier aussi Aicha Benhaddou, Mathieu Bélanger, Geneviève Nault et Marie-Hélène Dufresne pour toute l'aide au niveau de la formulation, l'impression et la caractérisation des formulations.

Je remercie également ma stagiaire Augustine Lalloz pour toute son aide et son effort en m'aidant sur ce projet. Je lui souhaite une bonne continuation pour son doctorat.

*J'aimerais remercier également Martine Raymond pour nous avoir permis de faire les tests *in vitro* sur *C. albicans* dans son laboratoire et nous avoir aidés dans le projet quand j'avais des questions.*

*Je tiens également à remercier Patrice Le Pape et Fabrice Pagniez pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire en Nantes pour faire des tests *in vitro* et *in vivo*.*

Je voudrais remercier la plateforme de biopharmacie pour leur expertise du LC-MSMS surtout Martin Jutras.

Je voudrais remercier tout le personnel de l'axe de formulation et analyse du médicament pour leurs commentaires, support et également leur bonne humeur. Ces deux années furent très agréables grâce à ma famille du "4^{ème}" étage.

J'aimerais finalement remercier mon père, ma mère et ma sœur pour le support moral tout au long de ce parcours.

Merci à tous !

Table des matières

Résumé en français	ii
Résumé en anglais	iv
Dédicaces	vi
Remerciements.....	vii
Table des matières	ix
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures.....	xiv
Liste des abréviations.....	xvi
L'avant-propos	xvii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Fabrication de micro- ou nano- particules.....	2
1.1.1 Micro- ou nano- particules lipidiques solides	2
1.1.2 Micro- ou nano- capsules	3
1.1.3 Nanocomposites et nanoparticules métalliques.....	3
1.2 Application de micro- ou nano- particules sur textile.....	4

1.2.1	Matériaux de changement de phase	4
1.2.2	Textiles cosmétiques.....	6
1.2.3	Textile avec agent conservateur.....	6
1.2.4	Textile avec activité pharmaceutique	7
1.3	Fixation des micro- ou nano- particules sur textile	8
1.3.1	Foulardage.....	8
1.3.2	Enduction	9
1.3.3	Impression par sérigraphie.....	10
1.4	Fonction et rôle de la peau.....	11
1.4.1	Épiderme viable	12
1.4.1.1	Stratum Corneum	12
1.4.1.2	Stratum basale	13
1.4.2	Derme	13
1.4.3	Hypoderme.....	14
1.5	Infections fongiques.....	14
1.5.1	Infections fongiques cutanées superficielles.....	15
1.5.1.1	Candidoses cutanées.....	15
1.5.1.2	Infections à dermatophytes	15
1.5.1.3	Infections à Malassezia	16
1.6	Antifongiques cutanés.....	16

1.6.1 Polyènes.....	17
1.6.2 Allylamines.....	18
1.6.3 Azoles.....	18
1.7 Textile de microparticules d'éconazole nitrate pour administration cutanée.....	20
1.8 Formulation des microparticules.....	21
1.8.1 Formulation des microparticules par homogénéisation à haut cisaillement.....	21
1.8.2 Fixation des microparticules sur un support textile.....	21
1.9 Caractérisation des textiles et microparticules d'ECN.....	22
1.9.1 Mesure de Taille.....	22
1.9.2 Mesure de la température de fusion.....	23
1.9.3 Mesure de la teneur.....	24
1.9.4 Test antifongique <i>in vitro</i>	26
1.9.5 Test de diffusion <i>in vitro</i>	27
1.9.6 Test de diffusion <i>ex vivo</i> sur la peau.....	28
1.10 Objectif de recherche.....	29
1.10.1 Hypothèse de Recherche.....	29
1.10.2 Objectif spécifique.....	29

Chapitre 2 : Article pour European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics	31
2.1 Résumé en français.....	31
2.2 Econazole Imprinted Textiles with Antifungal Activity	33
2.3 Abstract	34
2.4 Introduction.....	35
2.5 Experimental methods	38
2.6 Results and discussion	47
2.8 References	59
Chapitre 3: Modèle d'infection fongique cutanée in vivo	64
3.1 Modèle cochon d'inde	64
3.2 Modèle de souris.....	65
3.2.1 Méthode.....	65
3.2.2 Résultats et discussion.....	66
3.2.3 Conclusion	66
Chapitre 4 : Conclusion	68
Chapitre 5 : Perspective et Travaux futurs.....	70
Références.....	72

Liste des tableaux

Table 1 : Gradients of solvents in the HPLC-UV system.....	41
Table 2 : LC-MS/MS parameters.....	42
Table 3 : ECN content of pharmaceutical textiles upon storage at 25°C/65%RH. T0: After screen-printing. (n = 9)	48
Table 4: Inhibition zone diameter (IZD) of textile formulation on <i>C.</i> <i>albicans</i> strains after 18 hours at 32°C	53
Table 5 : IZD of textile formulation on <i>Candida</i> species after 18 hours at 32°C	54
Table 6: IZD of textile formulation on <i>Trichophyton</i> species after 4 (T. mentagrophytes) or 7 days (T. rubrum) at 25°C.....	55

Liste des figures

Figure 1.1 MLS, NLS et Micro- ou nano- capsules.....	3
Figure 1.2 Mécanisme des matériaux en changement de phase.....	5
Figure 1.3 Procédure de foulardage.....	9
Figure 1.4 Procédure d'enduction.....	10
Figure 1.5 Procédure d'impression par sérigraphie	11
Figure 1.6 Épiderme viable	13
Figure 1.7 Structure chimique de la nystatine	17
Figure 1.8 Structure principale des allylanime	18
Figure 1.9 Structures variées d'azole	19
Figure 1.10 MEB du LayaTM	22
Figure 1.11 Diffraction Laser	23
Figure 1.12 Schémas CLHP-UV.....	25
Figure 1.13 Schémas CLHP-MS/MS	26
Figure 1.14 Procédure d'extraction de l'ECN du textile.....	26
Figure 1.15 Objectif de recherche	30
Figure 2.1 Graphical Abstract	35
Figure 2.2 Measurement of ECN microparticules by LD	49
Figure 2.3 TA-HLM of ECN textile formulation.....	50
Figure 2.4 ECN release profile against time of ECN textiles.....	51

Figure 2.5 Antifungal disk diffusion test on *C. albicans*.....52
Figure 2.6 Textile vs Pevaryl on ex vivo pig skin diffusion.....56

Liste des abréviations

CLHP-MS/MS: Chromatographie Liquide couple à un détecteur de masse triple quad

CLHP-UV: Chromatographie liquide par haute performance couplé à un détecteur UV

ECN: Econazole Nitrate

MCP: Matériaux à changement de phase

MEB: Microscopie électronique à balayage

MLS: Microparticules lipidiques solides

MS: Spectrométrie de masse

NLS: Nanoparticules lipidiques solides

RH: Humidité résiduelle

SB: Sabouraud

SC: Stratum Corneum

TA-HLM: *“Thermal Analysis Based on Heat leak modulus”*

UV: Ultraviolet

YPB: Yeast Peptone Dextrose

L'avant-propos

Ce mémoire présente le projet de recherche dans le cadre du programme de maîtrise en science pharmaceutique option technologie pharmaceutique commencé en Septembre 2012. Ce projet a été réalisé dans le laboratoire de Jeanne Leblond Chain en collaboration avec Martine Raymond de l'institut de recherche en immunologie et oncologie, le Professeur Patrice Le Pape de l'université de Nantes et avec la compagnie Biomod Concepts Inc. Le projet est financé par le Conseil de recherche en science naturelles et en génie du Canada, Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies et Biomod Concepts Inc. L'objectif du projet est de développer un textile pharmaceutique contenant des microparticules d'éconazole nitrate qui sera utilisé comme modèle de médicament. Le projet était divisé en plusieurs parties : (i) Formulation de microparticules d'éconazole et impression sur textile par sérigraphie (ii) Caractérisation des formulations sur textiles en mesurant la taille des particules, teneur et la température de fusion des microparticules (iii) Étude de la diffusion sur une membrane de polycarbonate (iv) Évaluation de l'efficacité antifongique *in vitro* et (v) Étude la diffusion *ex vivo* sur peau de cochon. Le chapitre 1 va être dédié à une introduction, le chapitre 2 à l'article et le chapitre 3 à l'essai *in vivo*, le chapitre 4 à la conclusion et le chapitre 5 les perspectives.

Chapitre 1 : Introduction

Depuis longtemps, les textiles sont utilisés pour confectionner des vêtements, qui ont comme fonction de protéger notre peau des différents facteurs environnementaux (chaleur, humidité, lumière). Mais depuis les dernières décennies, l'industrie du textile connaît un essor et une multitude de nouvelles applications ont fait leur apparition, par exemple les textiles peuvent jouer un rôle antibactérien [1-6], thermorégulateur [7-9], protecteur-UV [1] et même dans l'hydratation de la peau [10, 11].

Si la technologie de fabrication de microparticules existe depuis un certain temps, elle n'est appliquée que récemment sur des produits textiles. Les microparticules peuvent être incorporées sur le textile par différentes méthodes de fixation et permettent de donner aux textiles des propriétés thermosensibles, cosmétiques, conservatrices ou pharmaceutiques [12-14].

Les micro- ou nano- particules généralement incorporées sur des textiles sont les suivantes: (i) des micro- ou nano- particules lipidiques solides [15, 16] (ii) micro- ou nano- capsules [17, 18] (iii) nanocomposites [19-21] ou (iv) nanoparticule métallique [22].

1.1 Fabrication de micro- ou nano- particules

Les micro- ou nano- particules peuvent être préparées par deux approches différentes : l'approche descendante ou l'approche ascendante. L'approche descendante implique la réduction de taille du composé actif par force mécanique pour réduire la taille des particules [23, 24]. Les méthodes incluent le broyage et l'homogénéisation à haute pression. L'approche ascendante implique l'association de molécules non miscible pour former des agrégats qui forment de micro- ou nano- particules [23]. Les techniques souvent utilisées sont la nanoprécipitation, l'homogénéisation à cisaillement et l'émulsification [24].

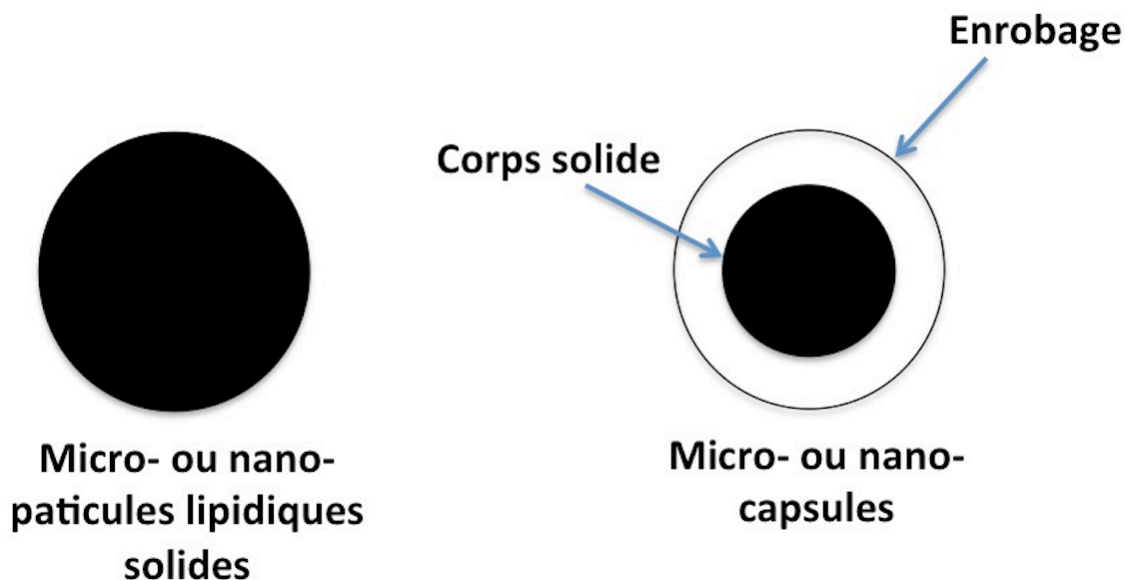
1.1.1 Micro- ou nano- particules lipidiques solides

Les microparticules lipidiques solides (MLS) sont des particules avec un cœur lipidique possédant des diamètres inférieurs à 1000 μm . Les nanoparticules lipidiques solides (NLS) sont des particules avec un cœur lipidique possédant des diamètres de 10 à 1000 nm [15, 16]. Les MLS et NLS permettent l'incorporation de composés hydrophobes (Figure 1.1). Elles sont fabriquées avec des lipides (solides à température pièce), des surfactants et de l'eau [15]. Les méthodes de fabrications regroupent l'homogénéisation à haut cisaillement, l'évaporation du solvant et le séchage par pulvérisation [15, 16].

1.1.2 Micro- ou nano- capsules

Les micro- ou nano- capsules sont des particules sphériques de tailles en 2 à 2000 μm de diamètre qui contiennent une substance dans un corps central de la sphère et un enrobage autour qui est différent de la composition du corps central (Figure 1.1) [17]. Cette technique permet l'encapsulation de substance solide, liquide et gazeuse [17]. Les microcapsules sont préparées par séchage par pulvérisation et émulsification [17]. Les nanocapsules sont formulées par méthodes de nanoprecipitation, double émulsification et revêtement polymérique [18].

Figure 1.1 MLS, NLS et Micro- ou nano- capsules



1.1.3 Nanocomposites et nanoparticules métalliques

Les nanocomposites sont des nanoparticules solides avec plusieurs phases dont au moins une des phases est inférieure à 100 nm [19]. La phase nanométrique est de

composition différente de la matrice. Les nanocomposites peuvent avoir une matrice polymérique ou non polymérique (par exemple, métallique ou céramique) [20, 21].

Les nanoparticules métalliques comme les nanoparticules d'argent sont préparées par l'approche physique ou l'approche chimique [22]. L'approche physique consiste en une méthode d'évaporation-condensation. L'approche par réduction chimique consiste à réduire l'argent en ions qui va favoriser la formation d'agrégats. C'est la méthode la plus utilisée pour formuler des microparticules métalliques [22].

1.2 Application de micro- ou nano- particules sur textile

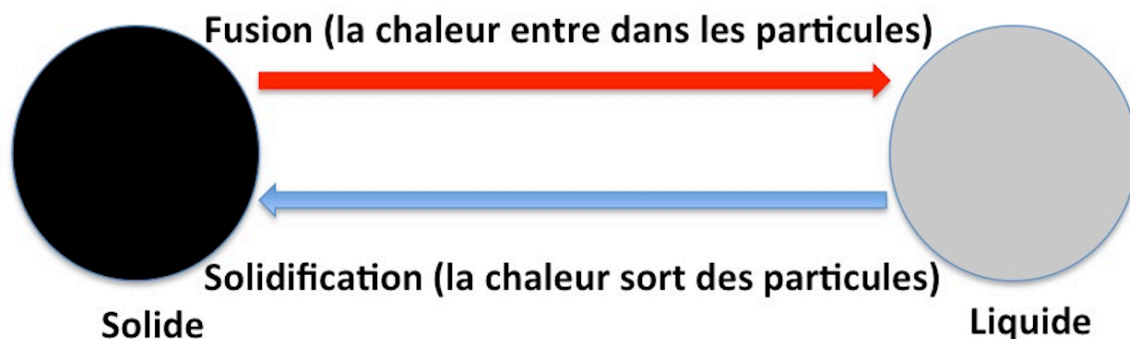
Formuler un actif dans un micro- ou nano- particules avant de l'appliquer sur un textile permet de protéger la molécule active et permet aussi de modifier le relargage de l'actif [17]. Les applications les plus souvent utilisées incluent les matériaux de changement de phase, les produits cosmétiques, les produits avec agent conservateur et les produits pharmaceutiques.

1.2.1 Matériaux de changement de phase

Une des premières applications pour les textiles intelligents était les matériaux à changement de phase (MCP) comme les hydrocarbures paraffiniques. Les MCP peuvent absorber ou relâcher la chaleur pendant un changement de phase (solide-liquide) sur des plages de température très étroites (Figure 1.2) [7].

Ces matériaux n'avaient pas beaucoup d'applications pratiques avant les années 1980. Durant ces années, le développement de microcapsules de MCP a commencé à intéresser la NASA pour la fabrication de vêtements d'astronautes pour les protéger des températures extrêmes de l'espace [7, 8]. Ce fut le commencement des applications de microcapsules de MCP sur des produits textiles. La fonction primaire d'un vêtement est de protéger la surface de notre peau et permettre une isolation de l'environnement. Le matériel textile accorde une protection passive des facteurs environnementaux, mais en utilisant la technologie des MCP, les textiles peuvent jouer un rôle additionnel sur la protection. L'incorporation des microcapsules de MCP sur un support textile a permis la création de textiles thermorégulateurs qui réagissent soit au changement de température externe soit au changement de température du corps [8, 9].

Figure 1.2 Mécanisme des matériaux en changement de phase



1.2.2 Textiles cosmétiques

Le textile est un matériel très intéressant pour les produits cosmétiques, surtout pour les produits pour la peau. La peau étant majoritairement couverte par des vêtements pendant la journée, l'industrie cosmétique a décidé de développer des textiles incorporant des produits cosmétiques. Il existe déjà plusieurs produits sur le marché qui combinent ces applications. Biomod Concepts Inc. possède des produits qui incorporent des microparticules sur un support textile pour hydrater la peau ou la rendre plus blanche [10, 11]. D'autres applications sont possibles avec l'utilisation de microcapsules d'antioxydants et de vitamine C pour la protection de la peau [25, 26] . Il est aussi possible de faire des textiles parfumés avec des microcapsules [12] ou des nanocapsules [27].

1.2.3 Textile avec agent conservateur

Les textiles peuvent être utilisés pour d'autres fonctions que pour traiter une condition de la peau, comme pour garder propres les fibres du textile, sans odeur, sans dommage et sans contamination. Ibanescu et *al.* étudie des nanocomposites d'argent avec de l'oxyde de zinc qui protège des infections bactériennes et des ondes ultraviolets (UV) [1]. Cette double action permettrait au textile d'être moins apte à la contamination et aux dommages environnementaux sur les fibres de textile. Le sélénium est un autre élément utilisé pour conserver le textile en prévenant la propagation de microorganismes et en évitant des dommages aux fibres de textile

[2]. Les nanoparticules d'argent sont utilisées en abondance sur le textile dans la littérature pour empêcher la propagation de microorganismes [3-5].

1.2.4 Textile avec activité pharmaceutique

Depuis quelques années, il y a de plus en plus d'applications tournées vers les médicaments ou même des agents anti-infectieux.

Une étude sur l'utilisation de triclosan sur un support textile pour le traitement d'infection bactérienne topique a montré une efficacité *in vitro* sur du *Staphylococcus aureus* et à haute concentration sur du *Escherichia coli* [6]. Les textiles peuvent être utilisés pour libérer localement des médicaments avec des effets secondaires importants s'ils sont administrés systématiquement. Un exemple est l'utilisation d'agent anticancéreux. Le tamoxifène, un agent anticancéreux, a été déposé sur du coton sous forme de microcapsules pour le traitement du cancer du sein [13]. L'étude a démontré la possibilité d'utiliser un anticancéreux topique sur textile avec un profil de relargage modifié pour traiter le cancer du sein [13]. Jusqu'à récemment, l'utilisation d'antifongiques pour le traitement d'infections fongiques cutanées a été peu rapportée. Récemment, des bas antifongiques ont été développés pour tester l'efficacité de microparticules de clotrimazole sur des patients qui souffraient de *tinea pedis* interdigitale [28]. Les patients étaient divisés en deux groupes : l'un recevant des bas avec les microcapsules de chitosan/clotrimazole (groupe actif) et l'autre groupe recevait des bas avec microcapsules de chitosan/huile (groupe contrôle). Après 2 semaines de traitement, 20 des 26

patients dans le groupe actif étaient guéris contre seulement 5 sur 14 patients du groupe contrôle. Ceci démontrait un résultat statistiquement significatif ($p = 0.017$) [28]. Donc l'application des microcapsules de clotrimazole démontrait une bonne efficacité antifongique, mais l'étude le comparait uniquement à un placebo. Il faudrait être capable de le comparer avec un produit commercialisé pour savoir s'il est plus efficace.

1.3 Fixation des micro- ou nano- particules sur textile

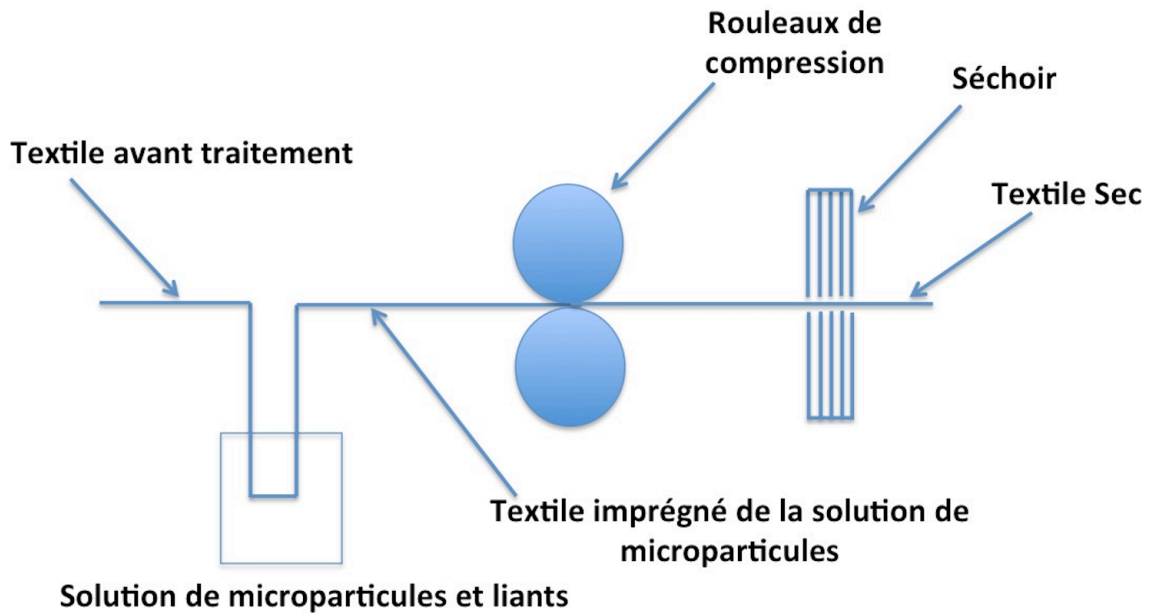
Il y a plusieurs techniques qui permettent la fixation de microparticules sur un support textile. Elles peuvent être fixées simplement avec un dépôt physique ou en utilisant des liants chimiques pour obtenir des textiles qui retiennent avec une grande affinité les microparticules. Les techniques de fixation sont très variées. Les techniques de foulardage, d'enduction et impression par sérigraphie sont les plus utilisés.

1.3.1 Foulardage

Le foulardage est une technique couramment utilisée pour la fixation de microcapsules sur un textile. Le textile passe dans une solution contenant les ingrédients du mélange à fixer contenant les microcapsules, un agent liant et un adoucissant. Le textile, une fois sorti de la solution, passe entre deux rouleaux qui le compressent (Figure 1.3). La quantité absorbée par le textile est déterminée par la

vitesse du passage du textile dans la solution, la concentration de la solution et la force de compression appliquée par les rouleaux. L'étape finale est le séchage. Cette technique était utilisée par Rodrigues *et al.* pour leurs microcapsules contenant des extraits de parfum [12].

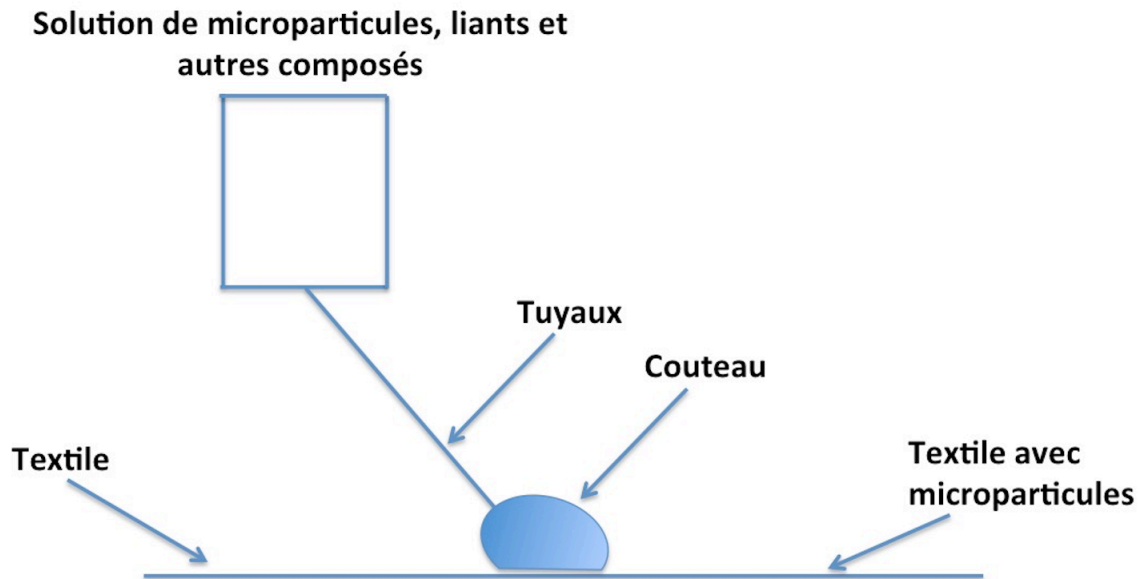
Figure 1.3 Procédure de foulardage



1.3.2 Enduction

L'enduction est une technique pour revêtir le textile en utilisant une procédure simple. Le mélange de microparticules, le liant et des composés aidant à l'enduction sont appliqués directement sur le textile par un couteau. Les textiles sont séchés à la fin (Figure 1.4). Cette technique est utilisée par Ma *et al.* pour le développement de textile contenant du tamoxifène pour traiter le cancer du sein [13].

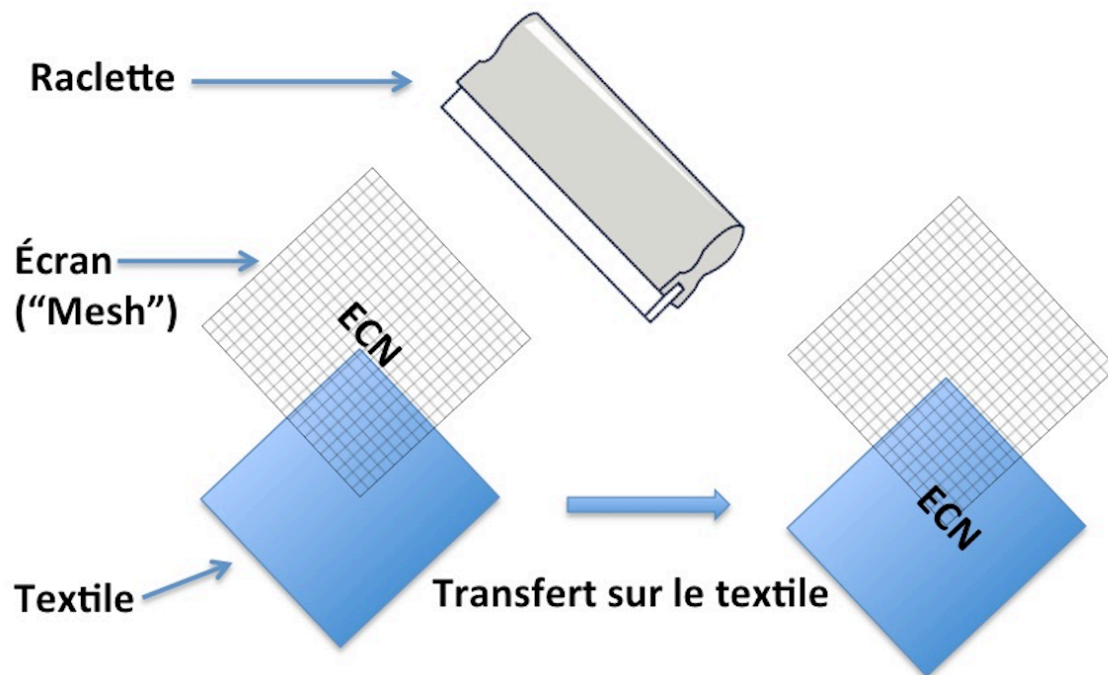
Figure 1.4 Procédure d'enduction



1.3.3 Impression par sérigraphie

L'impression par sérigraphie est aussi une technique qui peut être utilisée couramment pour déposer des microparticules. La solution de microparticules passe par un écran avec des ouvertures régulières dont la taille peut être choisie selon le besoin et qui détermine la quantité de microparticules déposées sur le textile. Les microparticules traversent l'écran avec l'aide d'une raclette (Figure 1.5). L'étape finale est de sécher le textile. Cette technique permet de mieux contrôler la disposition spatiale et la quantité de microparticules déposées. Ceci permettrait, par exemple, de faire des motifs ou des dépôts sélectifs sur certaines régions. Cette technique est l'une des méthodes utilisée par Biomod Concepts pour formuler leurs produits qui sont brevetés sous le nom de ON2™[14].

Figure 1.5 Procédure d'impression par sérigraphie



1.4 Fonction et rôle de la peau

La peau est un des organes les plus importants de notre corps, puisqu'elle s'agit d'une barrière protectrice pour le corps. Elle nous protège des dommages physiques, infections bactériennes et des radiations UV. La peau constitue aussi une bonne voie d'administration pour la libération locale de médicament, car les composés évitent le passage hépatique qui favorise le métabolisme. Par ailleurs, si les composés restent dans la peau, les effets secondaires reliés à l'administration systémique sont limités [29]. La peau est divisée en sous-couches : l'épiderme viable, le derme et l'hypoderme.

1.4.1 Épiderme viable

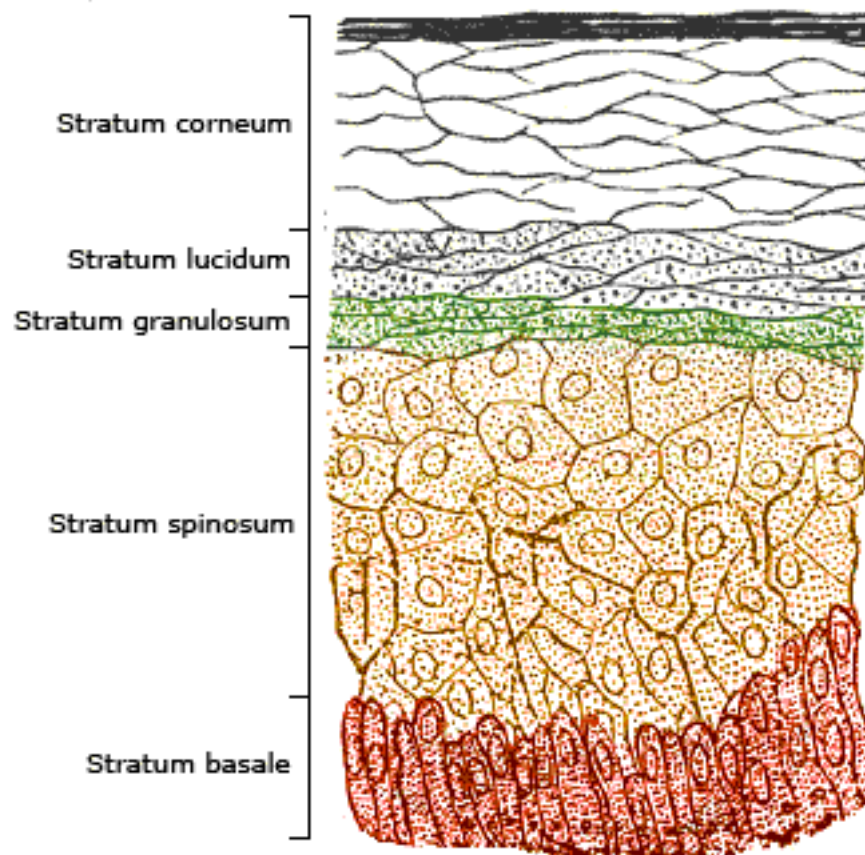
L'épiderme viable a une épaisseur de 50-100 μm [29]. L'épiderme peut être divisé en plusieurs sous couches : le Stratum Corneum (SC), le Stratum Lucidum, le Stratum Granulosum, le Stratum Spinosum et la couche basale. (Figure 1.6). Les plus importants sont le SC et la couche basale.

1.4.1.1 Stratum Corneum

Le SC est la barrière principale de la peau et elle est responsable du transport de l'eau à l'extérieur de la peau. Il a une épaisseur de 10 à 20 μm [29]. Il est formé de corneocytes qui sont retenus par les cornéodesmosomes [30]. Le transport des substances actives se fait par diffusion passive par trois routes possibles : intercellulaire, extra-cellulaire ou la voie folliculaire [30].

Le passage intercellulaire dépend de la taille et de la lipophilicité de la molécule. Les plus petites molécules empreintes plus souvent ce passage [30]. La route extra-cellulaire est souvent associée avec les molécules hydrophiles [30]. La troisième route empreinte la voie folliculaire qui est souvent visée pour l'administration systémique [30].

Figure 1.6 Épiderme viable [31]



1.4.1.2 Stratum basale

Les keratinocytes vont se kératiniser à partir de la couche basale et montent dans les couches du stratum jusqu'au stratum corneum pour donner la couche cornée [30].

1.4.2 Derme

Le derme a une épaisseur de 1 à 2 mm [29]. C'est la partie de la peau qui est irriguée par le sang. Elle est responsable de la nutrition de la peau. Le derme joue un rôle thermorégulateur et permet d'évacuer les toxines grâce à la sueur. De ce fait, les

formulations visant cette partie de la peau peuvent être absorbées systématiquement [29, 30].

1.4.3 Hypoderme

L'hypoderme est principalement composé de tissus adipeux. Elle contient également les vaisseaux sanguins et les terminaisons nerveuses. Puisqu'elle contient majoritairement des adipocytes, celle-ci sert de réserve énergétique et d'isolation thermique [32].

1.5 Infections fongiques

Les infections fongiques peuvent être classifiées en plusieurs sous-catégories. L'infection par les microorganismes peut être superficielle ou peut mener à une infection systémique, ce qui dépend grandement du genre et même de l'espèce de champignons [33]. Les infections fongiques sont généralement divisées en trois catégories : (i) l'infection fongique cutanée superficielle qui infecte la surface de la peau comme le stratum corneum et l'épiderme viable (ii) l'infection fongique sous-cutanée qui implique les infections profondes au niveau du derme et (iii) l'infection fongique systémique qui peut se disséminer aux autres organes comme le cerveau, les poumons et les reins [33]. Les infections fongiques sont très courantes et la plus répandue est l'infection fongique cutanée superficielle.

1.5.1 Infections fongiques cutanées superficielles

Les infections fongiques cutanées superficielles affecteraient plus de 948 millions de la population mondiale selon une étude en 2010 [34]. Elles représentent la 4ème maladie la plus diagnostiquée dans le monde [34] et infecteraient 20 à 25% de la population mondiale [34, 35]. C'est une maladie causée par divers genres et espèces de champignons, mais les plus prévalents sont les genres de *Candida*, *Malassezia* et les dermatophytes.

1.5.1.1 Candidoses cutanées

Les infections cutanées causées par le genre *Candida* sont communes. Ce sont des champignons de genre levure. L'espèce la plus fréquente du *candida* est le *Candida albicans*. Les *Candida* sont souvent des infections opportunistes qui affectent les personnes immunodéprimées ou ceux qui ont des facteurs locaux propices à l'infection comme une transpiration accrue. Les infections à candidose qui affectent les personnes saines sont souvent les intertrigos, c'est-à-dire les infections entre les articulations des pieds, et l'onyxis, c'est à dire entre les ongles [35].

1.5.1.2 Infections à dermatophytes

Les dermatophytes sont un genre de champignon qui cause des infections cutanées. Les principaux genres sont les suivantes : *Trichophyton*, *Microsporum*, et *Epidermophyton*. Ce sont des champignons filamenteux qui s'attachent préférentiellement au tissu kératiné, le cuir chevelu, les poils et les ongles [36]. Leur

mode de transmission peut être par contact direct ou par la desquamation de la peau [36].

1.5.1.3 Infections à *Malassezia*

Le genre *Malassezia* est une levure qui infecte surtout les régions du corps chaudes et humides. Elles ont un caractère lipophile donc des milieux contenant beaucoup de sébum favorise leur croissance comme le visage, le cou et le dos [37]. Les infections à *Malassezia* peuvent causer le pityriasis versicolore, la dermatite séborrhéique et la folliculite [37].

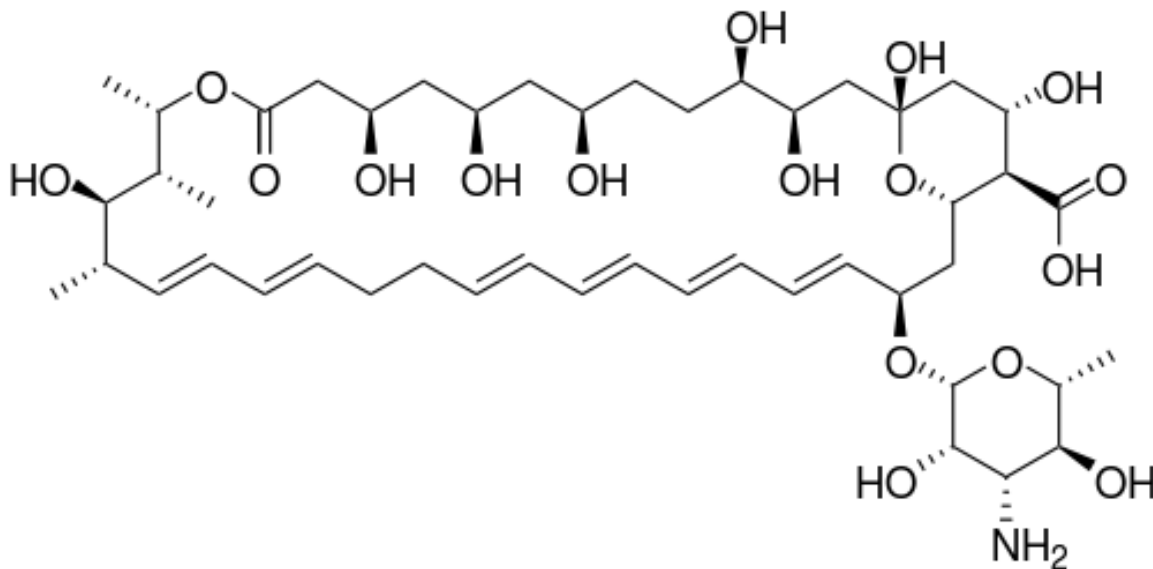
1.6 Antifongiques cutanés

Les polyènes, les azoles et les allylamines sont les principales classes d'antifongiques utilisées pour le traitement de candidose cutanée, des dermatophytoses et les infections à *Malassezia*. Les molécules peuvent être fongicides, c'est-à-dire qu'elles entraînent la mort des cellules de champignons. Les molécules peuvent aussi être fongistatiques, c'est-à-dire qu'elles inhibent la croissance et la possibilité aux cellules des champignons de se reproduire, mais ne tuent pas les cellules fongiques. L'activité de la molécule dépend souvent du genre (par exemple *Candida*, *Trichophyton*) et l'espèce (par exemple *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*) de champignons à traiter.

1.6.1 Polyènes

Les polyènes sont des molécules présentant des esters cycliques composés de chaînes aliphatiques insaturées conjuguées d'un côté et des groupements OH de l'autre côté du cycle. Les polyènes sont actifs sur les infections topiques cutanées causées par les *Candida*, mais n'ont pas d'activité sur les dermatophytes. Le mécanisme d'action des polyènes consiste à se lier irréversiblement sur l'ergostérol, une composante essentielle à la membrane cellulaire du champignon [38]. La nystatine est le seul composé de cette classe qui est utilisé topiquement (Figure 1.7).

Figure 1.7 Structure chimique de la nystatine



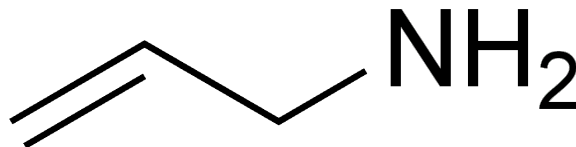
1.6.2 Allylamines

Les allylamines sont des molécules comportant le groupement $C_3H_5NH_2$ (Figure 1.8).

Les allylamines sont fongicides sur les dermatophytes, mais fongistatiques sur *C.albicans* [38].

Leur mécanisme d'action consiste à bloquer la synthèse de l'ergostérol en inhibant l'activité de l'enzyme squalène epoxidase qui est présent dans les premières étapes de la synthèse de l'ergostérol. En plus d'inhiber la synthèse, la squalène s'accumule dans les cellules et induit une toxicité dans les cellules des champignons causant la mort cellulaire [38]. Quelques exemples de cette classe incluent la naftifine et la terbinafine.

Figure 1.8 Structure principale des allylanime

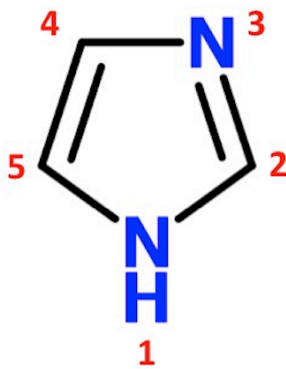


1.6.3 Azoles

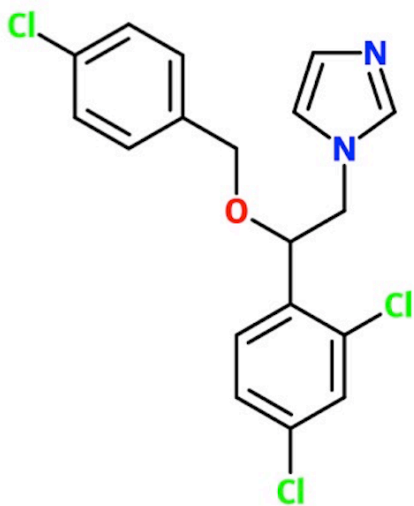
Les azoles sont très souvent utilisés en premier recours pour les infections fongiques superficielles. Les imidazoles sont une sous-catégorie des azoles. Les imidazoles ont tous une formule chimique contenant le groupement $(CH)_2N(NH)CH$ avec les azotes aux positions 1 et 3 (Figure 1.9 A). Les imidazoles présentent une activité fongistatique. Ils inhibent la synthèse de l'ergostérol en empêchant l'enzyme lanostérol 14- α -demethylase de catalyser la conversion du lanostérol en ergostérol

[38]. L'éconazole est un imidazole souvent utilisé pour le traitement de champignons topiques. L'éconazole est disponible en crème à 1% ECN et est appliqué deux fois par jour pendant 4-6 semaines selon le type d'infection [39]. On observe le groupement imidazole sur la molécule (Figure 1.9 B). Les azotes de la fonction imidazole permettent de formuler des sels d'imidazole (Figure 1.9 C).

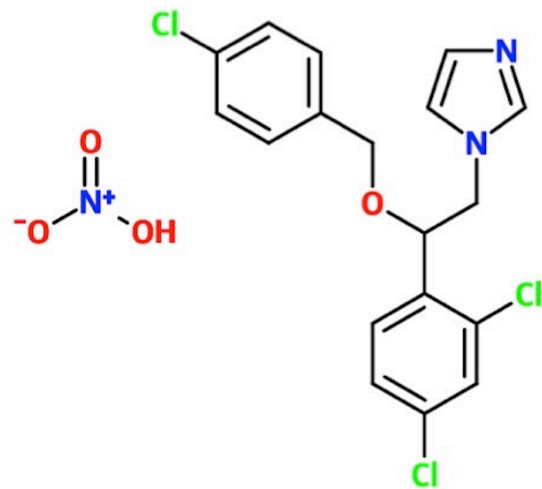
Figure 1.9 Structures variées d'azole



A: Structure primaire d'un imidazole



B: Structure chimique de l'éconazole



C: Structure de l'éconazole nitrate

1.7 Textile de microparticules d'éconazole nitrate pour administration cutanée

Le textile peut être un très bon vecteur pour libérer un médicament. Comme discuté dans le chapitre des textiles pharmaceutiques, il n'existe pas beaucoup d'exemples de textiles pharmaceutiques pour le traitement d'infections fongiques cutanées. Le potentiel est très grand pour l'application d'antifongique pour le traitement d'infections fongiques cutanées, car elles affectent un grand nombre d'individus. Parmi les classes d'antifongiques, les azoles sont souvent les plus utilisées pour le traitement de ces mycoses cutanées superficielles. L'éconazole nitrate (ECN) est disponible depuis longtemps, mais son utilisation est encore importante, car il est actif contre plusieurs genres de champignons topiques [40]. L'ECN est un imidazole qui est formulé de plusieurs manières dans la littérature : (i) dans des micelles [41] (ii) des SLM ou SLN [42-44] et (iii) même des lipides nanostructurés [45]. L'éconazole est très lipophile ($\log P = 5.5$), ce qui favoriserait la formulation de microparticules lipidiques. C'est une molécule stable qui n'est pas dégradée facilement à la chaleur, mais elle est sensible à la lumière [46]. Selon une étude de Passerini *et al.* qui comparaient les SLM et SLN d'éconazole, les SLM pénètrent plus rapidement dues à un effet d'occlusion moins prononcé que les SLN et permettrait de pénétrer plus rapidement la couche superficielle [42]. Ceci favoriserait l'utilisation de microparticules pour le traitement superficiel de mycoses. L'éconazole a été choisi comme modèle de médicament pour ce projet de recherche.

1.8 Formulation des microparticules

La molécule active est incorporée dans des microparticules pour permettre la protection de la molécule active ou pour contrôler la libération de l'actif [17].

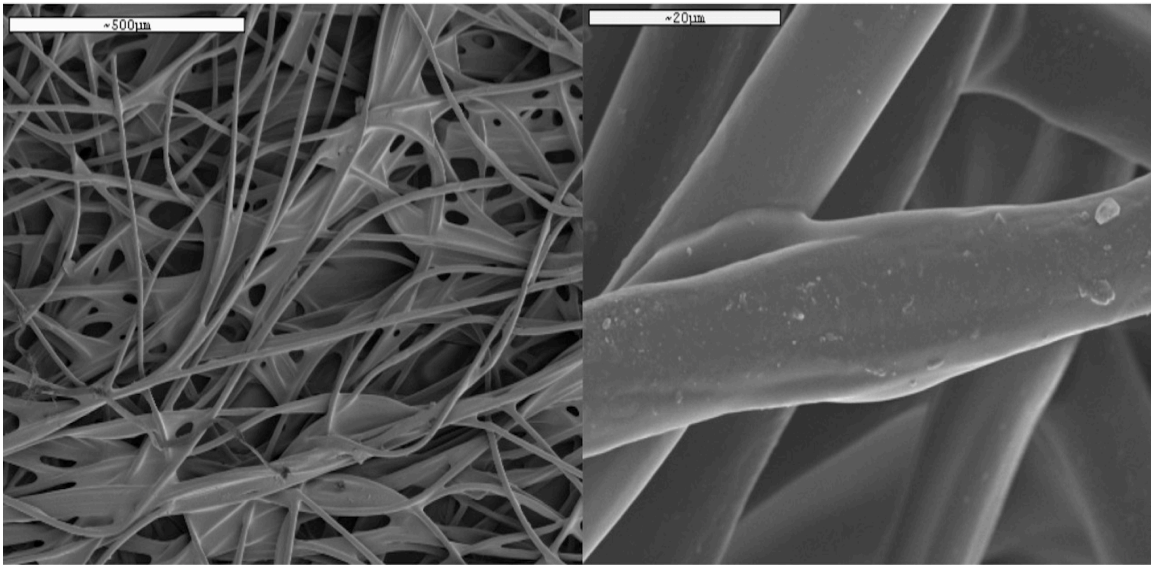
1.8.1 Formulation des microparticules par homogénéisation à haut cisaillement

L'homogénéisation à haut cisaillement est une méthode fréquemment utilisée pour la production de microparticules. Elle consiste à mélanger deux phases (aqueuse et huileuse) à haute vitesse. Plus la vitesse de mélange est élevée plus la taille des particules est petite [24]. La formulation et les compositions utilisées dans cette étude sont celles indiquées par le Brevet de Biomod Concepts Inc [14].

1.8.2 Fixation des microparticules sur un support textile

La méthode de sérigraphie a été utilisée spécifiquement pour ce projet afin de fixer des microparticules sur le textile comme décrit au chapitre 1.3.3. Les microparticules ont été fixées sur du Laya™ (Figure 1.10 par microscopie électronique à balayage (MEB)) qui est un textile non-tissé développé par Biomod Concepts.

Figure 1.10 MEB du Laya™



1.9 Caractérisation des textiles et microparticules d'ECN

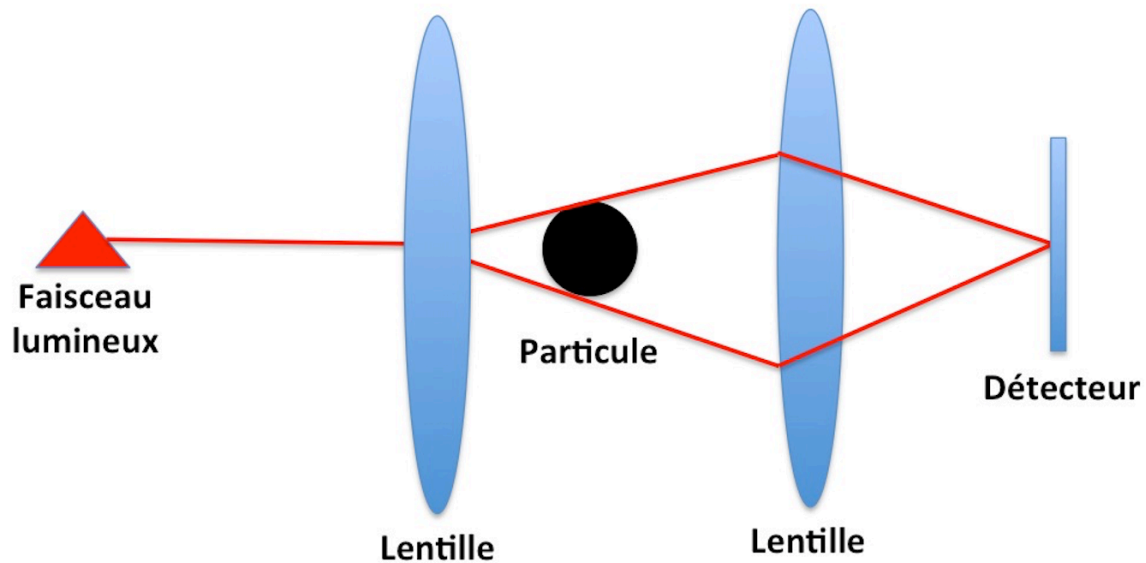
Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser la formulation de microparticules et la formulation sur textile. En effet, la taille des particules, la teneur et la température de fusion ont été déterminées.

1.9.1 Mesure de Taille

La taille des particules a été déterminée par diffraction laser grâce au Coulter LS 13 320. L'appareil fonctionne en émettant un faisceau lumineux qui est diffracté par les particules dans la solution à analyser. Une particule plus petite va faire diffracter la lumière avec un plus grand angle et l'inverse pour une grosse particule. Le signal est ensuite retransmis au détecteur via les lentilles de Fourier (Figure 1.11). Ensuite, un logiciel va analyser les données de manière mathématique (modèle Fraunhofer).

L'étendue de l'appareil permet de mesurer des particules de 40 nm jusqu'à des particules de taille de 2000 nm. Les mesures sont faites dans l'eau distillée.

Figure 1.11 Diffraction Laser



1.9.2 Mesure de la température de fusion

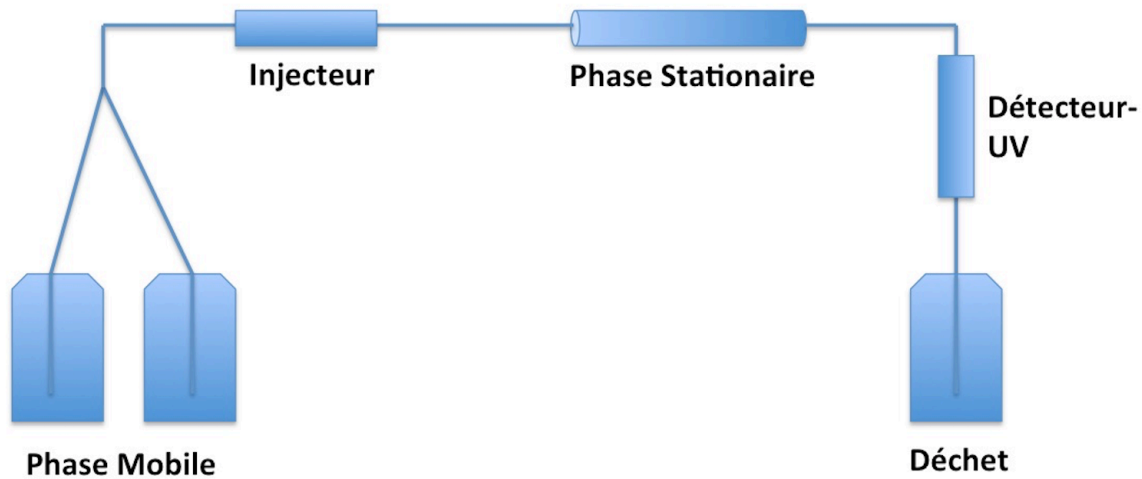
La température de fusion est mesurée par un "thermal analysis based on heat-leak-modulus (TA-HLM) [47]. C'est une méthode similaire à la calorimétrie différentielle à balayage, mais elle est adaptée pour prendre la température de fusion sur des supports textiles. Une électrode est enroulée autour du textile et mise dans l'appareil qui chauffe à 0.8°C par seconde. On enregistre jusqu'à 70°C et le logiciel permet d'identifier la température de fusion.

1.9.3 Mesure de la teneur

L'ECN est une molécule qui peut être analysée avec des méthodes de quantification par chromatographie liquide de haute performance (CLHP). Elle peut être détectée en UV ou par spectrométrie de masse (MS).

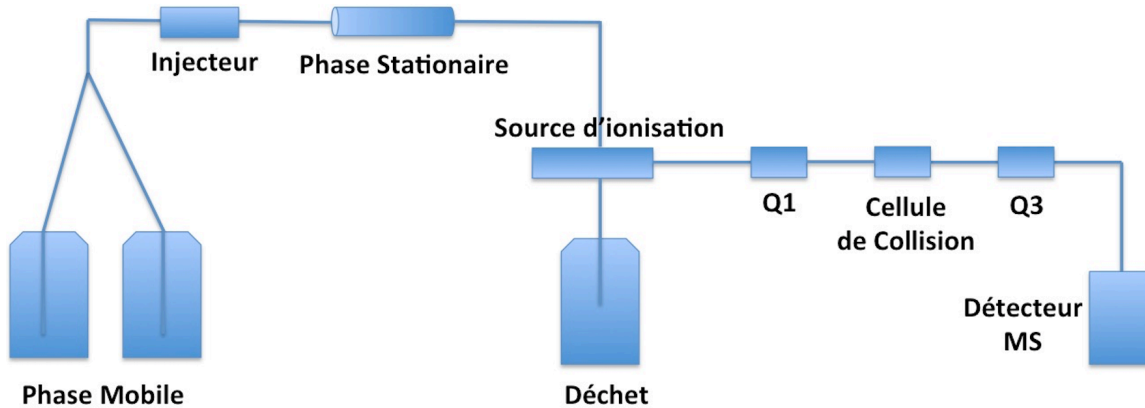
Le principe de la CLHP est l'affinité de la molécule entre la phase mobile et la phase stationnaire. Le système CLHP est le plus souvent utilisé en phase inverse, c'est-à-dire une phase stationnaire apolaire avec une phase mobile polaire. La phase stationnaire est souvent composée de silices greffées de chaînes carbonées (C₄ à C₁₈). Le fonctionnement est simple : (i) la phase mobile est pompée (ii) un échantillon est injecté (iii) l'échantillon est entraîné par la phase mobile (iv) les composés traversent la colonne (phase stationnaire) plus ou moins rapidement selon leur affinité et (v) les composés sont analysés par un détecteur UV (Figure 1.12). Une molécule lipophile comme l'ECN est retenue plus longtemps sur la colonne (par exemple C₁₈) qu'une molécule moins lipophile et ceci aide à séparer plusieurs molécules selon leur affinité avec la colonne et la phase mobile. Plusieurs méthodes de quantification sont déjà disponibles pour ECN [48-50].

Figure 1.12 Schémas CLHP-UV



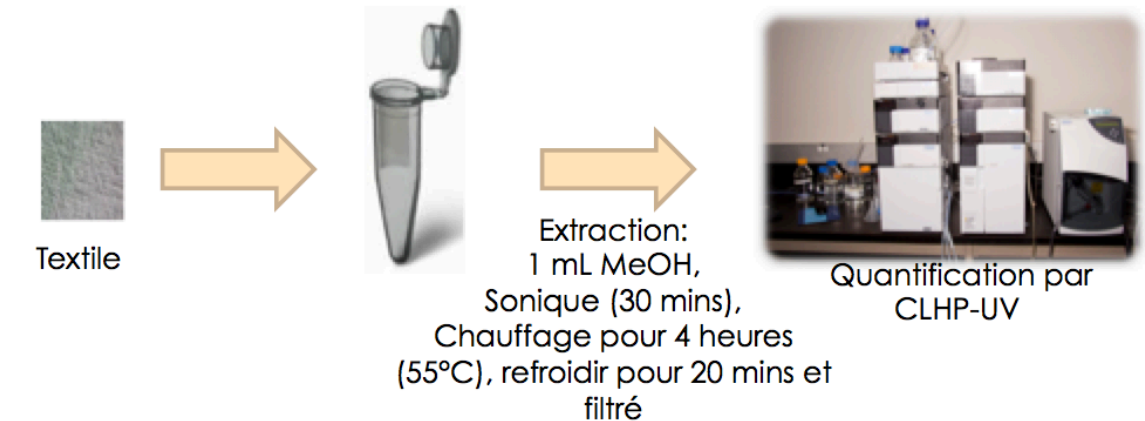
Le CLHP-MS/MS fonctionne en premier lieu comme une CLHP-UV, mais le ratio masse sur charge d'une molécule est analysé par le détecteur de masse. On peut aller plus loin en fragmentant l'ion précurseur dans une cellule de collision pour obtenir des fragments spécifiques à la molécule d'intérêt. Ensuite, le fragment à analyser est sélectionné et quantifié (Figure 1.13). Le CLHP-MS/MS permet de quantifier des plus petites quantités que la CLHP-UV qui présente généralement des limites de détection de l'ordre des micromolaires alors que le CLHP peut quantifier des concentrations en nanomolaires.

Figure 1.13 Schémas CLHP-MS/MS



Dans notre étude, le principe actif a été extrait du textile de la même façon pour les deux méthodes de quantification (figure 1.14).

Figure 1.14 Procédure d'extraction de l'ECN du textile



1.9.4 Test antifongique *in vitro*

Les tests antifongiques *in vitro* permettent d'évaluer l'efficacité de différentes formulations à inhiber la croissance des espèces fongiques. La formulation de notre étude étant déposée sur un textile, la méthode de diffusion sur disque inspiré de la

méthode de Kirby-Bauer pour les antimicrobiens a été sélectionnée pour mesurer l'efficacité antifongique [51]. Deux types de milieux ont été utilisés, du Yeast Peptone Dextrose (YPD) ou un milieu Sabouraud (SB). Le YPD pour la majorité des espèces de *Candida albicans*, alors que le SB a été utilisé pour les autres souches de *Candida* et les dermatophytes. Les plaques ont été inoculées et les textiles, une fois découpés en disques, ont été placés sur les plaques. Le diamètre d'inhibition est mesuré après 18 heures. Les essais *in vitro* ont permis d'évaluer l'efficacité de la formulation sur textile sur différentes souches de *Candida albicans* (SC5314, CAAL 93, CAAL 121, CAAL 123, CAAL 124), *C. kefyr* (CAKE 3, CAKE4), *C. glabrata* (CAGL1, CAGL5), *C. Lusitania* (CALU1, CALU2) en mesurant le diamètre d'inhibition après 18 heures à 32°C. Ces tests ont également évalué l'efficacité des textiles sur les dermatophytes (*Trichophyton rubrum* et *T. mentagrophytes*) en mesurant le diamètre d'inhibition après 18 heures à 25°C.

1.9.5 Test de diffusion *in vitro*

Ce test a pour but d'étudier la libération de la formulation *in vitro*, avant de passer au test *ex vivo* sur peau de cochon. Les tests de diffusion utilisent les cellules de Franz avec un manteau thermorégulé pour contrôler la température du milieu récepteur. Les tests de diffusions ont été réalisés sur 6 heures avec une température du milieu récepteur de 22°C ou 32°C, qui miment la température ambiante et la température sur la surface de la peau, respectivement. Le milieu récepteur contenait

un tampon phosphate salin (PBS) avec du PEG-400 (70/30). Ce milieu était choisi pour aider à solubiliser l'ECN qui n'est pas très soluble dans le PBS seul [52].

1.9.6 Test de diffusion *ex vivo* sur la peau

Il est nécessaire d'identifier la pénétration d'une formulation topique au niveau de la peau afin de savoir sa distribution topique. La peau de cochon est montée sur des cellules de Franz et les formulations sont appliquées sur la peau pendant 24 heures. Ensuite, la peau est séparée en plusieurs couches (Stratum corneum (SC), Épiderme et Derme). Le SC est séparé par la technique de « tape stripping » qui consiste à enlever la première couche en appliquant des rubans adhésifs pour enlever la couche cornée. Une formulation qui pénètre trop profondément et pourra se retrouver dans le sang est problématique, donc il est nécessaire d'évaluer la pénétration d'un composé à travers la peau, dans le compartiment récepteur.

1.10 Objectif de recherche

L'objectif de ce projet est de développer des textiles contenant des microparticules de nitrate d'éconazole (ECN), notre modèle de médicament aux propriétés antifongiques (Figure 1.9 C).

1.10.1 Hypothèse de Recherche

L'hypothèse de recherche est que la formulation de microparticules sur un support textile peut être utilisée avec un produit pharmaceutique (éconazole nitrate) tout en conservant ou améliorant son activité pharmaceutique.

1.10.2 Objectif spécifique

Les objectifs spécifiques de cette étude sont :

- 1- Préparer des formulations de microparticules d'ECN et les déposer sur textile.
- 2- Caractériser des formulations d'ECN (Taille des particules, teneur, température de fusion, stabilité chimique).
- 3- Mesurer l'activité antifongique *in vitro* de la formulation de microparticule d'ECN sur textile.
- 4- Déterminer la cinétique de diffusion à 22°C et à 32°C de la formulation d'ECN sur textile.
- 5- Déterminer la pénétration cutanée *ex vivo* des formulations textiles.

Figure 1.15 Objectif de recherche



Chapitre 2 : Article pour European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics

2.1 Résumé en français

Dans ce travail, nous proposons des textiles pharmaceutiques imprimés avec des microparticules lipidiques solides d'éconazole nitrate (ECN) afin d'améliorer la complaisance du patient tout en maintenant l'activité du médicament. L'activité antifongique et l'absorption percutanée des textiles d'ECN ont été mesurées et comparées à la formulation commerciale à 1% d'ECN (poids/poids), la crème Pevaryl®. Les microparticules lipidiques ont été imprimées sur des textiles en utilisant un procédé par sérigraphie. La taille des microparticules a été confirmée comme étant de $3.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ par diffraction laser. Les textiles pharmaceutiques ont été examinés en termes de contenu de drogue et de la stabilité de stockage. La formulation a démontré une stabilité de plus de 4 mois avec $97 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ restant (108 % de T0) dans des étuves de stabilité à $25^\circ\text{C}/65\%RH$. La libération du médicament est déclenchée par la température, étant donné que les microparticules ont présenté une température de fusion de $34,8^\circ\text{C}$ (déterminé par TA-HLM), qui est très proche des conditions superficielles de la peau. Les tests antifongiques *in vitro* ont montré une activité comparable à la formulation commerciale sur toutes les espèces de *Candida* (plus de 90 % sur toutes les espèces, sauf *C. albicans* SC 5314 (81%) et *C. kefyr* (84 %)) et les espèces de dermatophytes (62 %), principalement en raison des conditions des tests effectués. Les études *ex vivo* d'absorption

percutanée ont démontré que l'ECN est libéré du textile pharmaceutique se concentre sur les couches supérieures de la peau où les infections fongiques se développent. Globalement, ces résultats ont montré que cette technologie est prometteuse pour développer des textiles pharmaceutiques pour le traitement des infections superficielles.

2.2 Econazole Imprinted Textiles with Antifungal Activity

Mirza Akram Hossain^a, Augustine Lalloz^a, Aicha Benhaddou^b, Fabrice Pagniez^d,
Martine Raymond^c, Patrice Le Pape^d, Pierre Simard^b, Karine Théberge^b, and Jeanne
Leblond^a

^a Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, PO Box 6128 Station Centre-Ville,
Montreal, QC, H3C 3J7, Canada.

^b Biomod Concepts Inc, Sainte-Julie, QC, J3E 1Y6, Canada.

^c Institution for research in immunology and cancer, Université de Montréal,
Montreal, QC, H3C 3J7, Canada

^d Département de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Université de Nantes,
Nantes Atlantique Universités, EA 1155 - IICiMed, Faculté de Pharmacie, Nantes,
France ; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nantes, Nantes, France

Keywords

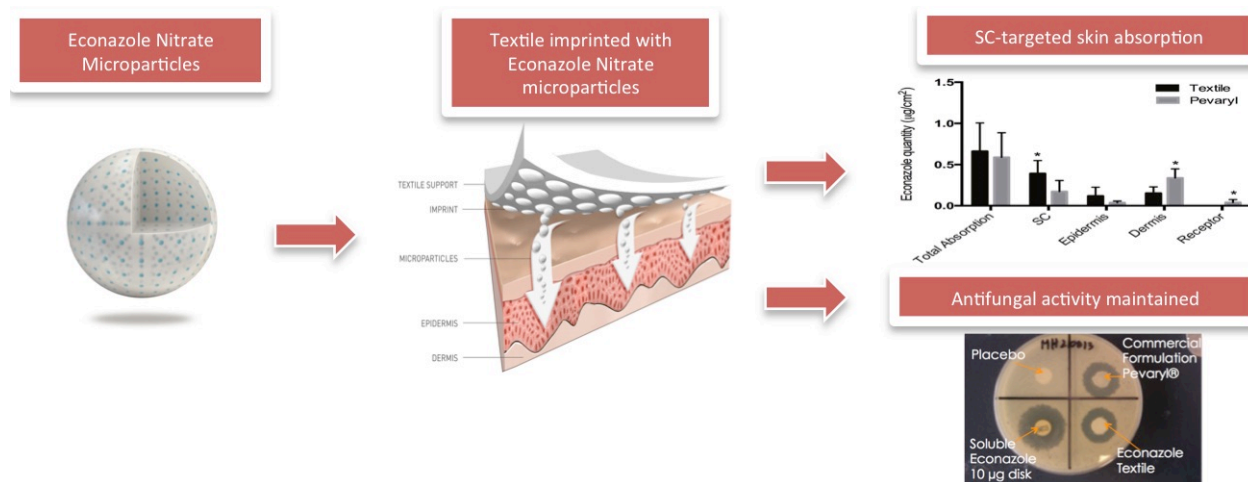
Econazole nitrate; fungal infection, topical administration; thermo-responsive formulation; lipid microparticles; candida.

2.3 Abstract

In this work, we propose pharmaceutical textiles imprinted with lipid microparticles of Econazole nitrate (ECN) in order to improve patient compliance while maintaining drug activity. Both antifungal activity and percutaneous absorption of ECN textiles were measured and compared to commercial 1% (w/w) ECN cream Pevaryl[®]. Lipid microparticles were imprinted on textiles using an adapted screen-printing method. Microparticle size was confirmed to be $3.5 \pm 0.1 \mu\text{m}$ by laser diffraction. The pharmaceutical textiles were examined in terms of drug content and demonstrated storage stability at 25°C/65%RH over 4 months with $97 \pm 3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ content remaining (108% of T₀). Drug release was triggered by temperature, since imprinted microparticles exhibited a fusion temperature of 34.8°C (determined by TA- HLM), which is very close to superficial skin conditions. *In vitro* antifungal disk diffusion tests showed a comparable activity to commercial formulation against all *Candida* species and a good activity against dermatophytes species (62%), mainly due to test conditions. *Ex vivo* percutaneous absorption studies demonstrated that ECN released from pharmaceutical textile concentrated on the upper skin layers, where the fungal infections develop. Overall, these results showed that this technology is promising to develop pharmaceutical textiles for the

treatment of superficial infections.

Figure 2.1 Graphical Abstract



2.4 Introduction

Textile is a material dedicated to clothing for centuries. Since one is wearing cloths more than 15 hours a day, fabrics are in close contact with the skin and could bring additional functions than simple warmth and body protection. In recent years, the combined efforts of chemists, textile engineers and cosmetologists, resulted in the development of cosmeto-textiles, defined as textile items containing substance or mixture that release their active compounds when in contact with the human body [1]. Firstly focused on improved comfort, cosmeto-textiles have since then been developed for slimming, moisturizing, and perfuming [2]. Innovative technologies have been incorporated into such fabrics, such as microencapsulation of substances [1, 3] and phase change materials to help the thermoregulation of the body [4]. Rapidly, such textiles have been envisioned for the delivery of topical bioactive

molecules, since the close and prolonged contact of fabric with the skin could make cloth an easy drug delivery system. Silver nanoparticles [5] and chitosan [6] were used as preservatives for antibacterial clothing. Also fabrics with antioxidant properties were developed by incorporation of Vitamin E [7] or gallic acid [8]. Some clinical indications have also been examined, such as venous insufficiency using aescin supported textiles [9] and atopic dermatitis with zinc oxide functionalized textiles [10]. Such examples show the evolution of textiles as every day clothing to pharmaceutical textiles, offering more than an improved comfort, but also a treatment for various skin diseases.

In particular, superficial fungal diseases are common worldwide and their incidence continues to increase. In 2010, they were the 4th most prevalent disease in the world, affecting more than 948 million people worldwide [11]. As compared to bacteria, fungal topical infections are longer in duration and require weeks and even months of fastidious treatment. Patient compliance would be greatly improved if a regular piece of textile (bandage, socks) could be used instead of applying cream daily. Antifungal textiles have been prepared by soaking the fabric into solution of antifungals [12, 13], and promising clinical results have been obtained from a sock prototype to treat tinea pedis [14]. However, fabrication technology and controlled release of antifungal agents still need to be improved.

Econazole Nitrate (ECN) is currently marketed for the treatment of vaginal

candidiasis and topical fungal infections as a cream formulation [15, 16]. It has demonstrated antifungal activity against *Candida* and dermatophytes species [15-17]. Encapsulation of ECN in lipid particles [18], microspheres [19], and micelles [20] has been reported to improve cutaneous efficacy of ECN. More precisely, comparing micro- and nano- solid lipid particles, nanoparticles were shown to improve transdermal administration whereas microparticles enhanced skin deposition [21]. Moreover, the lipid composition favored a good biocompatibility and skin penetration of the particles [22].

In this work, a novel ECN formulation on textile support was tested as a proof of concept for the treatment of topical fungal infections. The formulation is based on lipid microparticles exhibiting thermosensitivity in order to release the drug on contact with the skin [23]. Deposition of the microparticles on textile is achieved using screen-printing technique. The latter is a simple method where the microparticles are passed through a mesh with predefined openings to control the amount and the topology of the deposit [24, 25]. This method allows for a physical uniform deposit of the microparticles at desired area on textiles without addition of chemical binders. The solid microparticles (Dermotex®) and deposition method including printing (ON2™) technologies are proprietary to Biomod Concept Inc., and are used by the company to produce intelligent textiles [23]. The objective of this paper is to evaluate the potential of a pharmaceutical textile, namely a microparticle formulation of ECN deposited on textile, and to compare both its *in*

vitro antifungal activity and percutaneous absorption to the commercial 1% (w/w) ECN cream Pevaryl®.

2.5 Experimental methods

Materials

ECN-loaded microparticles on textile and all placebo textile formulations were provided by Biomod Concepts Inc. and prepared according to their patented technology [23]. Laya™ textiles were provided by Biomod Concepts (Saint Julie, QC, Canada) ECN was purchased from AK Scientific (Union City, CA, USA, Lot# TC24717). Pevaryl® 1% (w/w) ECN formulation was purchased from Johnson & Johnson (France, Lot # DDB3400). Miconazole Nitrate was purchased from AK Scientific (Union City, CA, USA, Lot# TC25782). ECN standard disks were purchased from Rosco (Neo-sensitabs 10 µg disks, Denmark, Lot #1201-1). Polyethylene Glycol 400 (PEG-400) was purchased from Medisca Inc. (Montreal, QC, Canada). Sodium Dodecyl Sulfate and semi-permeable polycarbonate membranes (Nucleopore Track-Etch Membrane, pores of 0.6 µm, 25 mm in diameter) were purchased from Sigma Aldrich (Oakville, ON, Canada). Tapes used for tape stripping was purchased from 3M (St-Paul, MN, USA). All samples were filtered using PTFE filters purchased from Fisher Scientific (EMD Millipore Millex, pores 0.45 µm, 13 mm in diameter, Ottawa, ON, Canada). All solvents (HPLC grade) were bought from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada).

Organisms

Candida albicans strain SC5314 was originally isolated from a patient with disseminated candidiasis, and served as reference for the *C. albicans* genome sequencing project [26, 27]. Twelve *Candida spp.* clinical isolates, *C. albicans* (CAAL 93, CAAL121, CAAL123, CAAL124), *C. kefyr* (CAKE3, CAKE4), *C. glabrata* (CAGL1, CAGL5), *C. lusitaniae* (CALU1, CALU2) were obtained from the Department of Parasitology and Medical Mycology, EA1155, at the University of Nantes, France. *Trichophyton rubrum* (n=2) and *T. mentagrophytes* (n=2) were obtained from the Laboratory of Parasitology and Medical Mycology at the Centre Hospitalier Universitaire de Nantes (CHUN).

Preparation of Econazole nitrate textile

Intelligent textiles imprinted with ECN-loaded- microparticles were prepared by Biomod Concepts using their patented technology [23]. Briefly, ECN solid lipid microparticles (1% w/w) were prepared under high shear with FDA- approved ingredients. The microparticles formulation was then applied onto textile surface using an adapted screen-printing method optimized for the microparticles deposition of pharmaceutical ingredients. A stencil with openings of more than 400 µm was used to apply the microsystem on 21.6 x 27.9 cm of Laya™, a non-woven textile provided by Biomod Concepts. ECN-loaded textiles were kept 22°C in a coated Aluminum/Acrylonitrile packaging until analysis.

Characterization of microparticles

Microparticle size was analyzed by laser diffraction before screen-printing. 100 mg of microparticles or Pevaryl® cream was diluted in 5 mL of distilled water. Particle size distribution was analyzed in 5 mL milliQ water at 22°C by laser diffraction (LS 13 320, Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Measurements were recorded 3 times for each formulation. Pevaryl® particle size was measured by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Worcestershire, UK) using the automatic algorithm mode. Size measurements were performed in MilliQ water. 100 mg of Pevaryl® was diluted in 5 mL of MilliQ water, at an angle of 4,65° and attenuator at 8 and done with 3 measures. Fusion temperature of the microparticles imprinted on textile was measured using thermal analysis based on heat-leak-modulus (TA-HLM). The TA-HLM [28] is a method similar to differential scanning calorimetry (DSC) able to analyze samples deposited on a textile support. With TA-HLM, the textile sample is wrapped around a sensor probe. The samples of ECN-loaded textile (1 cm x 1 cm) were analyzed at a heating rate of 0.8°C per second and heated from 5°C to 60°C. Measurement was repeated 3 times.

HPLC-UV analysis

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV)- analysis was used for stability and quantification of samples. The HPLC-UV system (Agilent 1100 Series, Mississauga, ON, Canada) consisted in a degasser, dual pumps, auto-

sampler, column heater and photo- diode array detector. A C18 column (25 x 4.6 mm, 5µm packing, Zorbax-C18, Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used with a matching pre-column (Agilent Zorbax C18). Mobile phase was composed of methanol and water using the following gradient in Table 1.

The flow rate was 1.4 mL per minute. The column temperature was set to 35°C. The injection volume was 20 µL. ECN was analyzed at 220 nm. ECN retention time was 8.7 minutes. The limit of quantification with this method is 9 µg/mL.

Table 1 : Gradients of solvents in the HPLC-UV system

Time (min)	Water (%)	Methanol (%)
0	43	57
3	28	72
6	2	98
10	2	98
13	43	57
15	43	57

HPLC-MS/MS method

HPLC-Mass spectrometry (MS)/MS was used for *in vitro* release and *ex vivo* experiments on pig skin, which presented lower concentrations of ECN than the limit of quantification (LOQ) of HPLC-UV method. An Agilent 1100 series HPLC (Mississauga, ON, Canada) was coupled with a 4000Q TRAP™ (AB Sciex, Concord, ON, Canada) hybrid triple-quadrupole/linear ion trap MS. All parameters can be

found on Table 2. Each sample was injected twice. HPLC-MS/MS method was developed and validated for ECN. No matrix effect was found with any components of the skin.

Table 2 : LC-MS/MS parameters

HPLC	Agilent 1100 series			
MS/MS	MDS Sciex 4000 Qtrap			
Software	Analyst® (version 1.6.2)			
Ionisation source, mode	Turbo electrospray, positive ionization (ESI)			
Scan mode	Multiple reaction monitoring (MRM)			
Analytes parameters	Compounds	DP (V)	MRM	CE (eV)
	Econazole	90	381 > 125	40
Internal Standard	Miconazole	90	417 > 161	40
Source parameters	Gas temp (°C)		650	
	Gas flow (L/min)		50	
	Curtain gas (psi)		25	
	Capillary (V)		5500	
Mobile phase	Composition		A: 0.1 % FA+ H ₂ O B: 0.1 % FA + Acetonitrile: Isopropanol (80/20)	
	Gradient		15 to 97 % of phase B in 1.5 min, then stay at 97% until 2.2 min, decrease to 15% at 2.3 min and stay at 15% of phase B until 3.5 min	
Flow rate	0.7 mL·min ⁻¹			
Column temperature	45°C			
Injection volume	2 µL			
Injection temperature	5°C			
Column	Luna C8 column (30 x 2.0 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)			

Quantification of Econazole nitrate Textile

One cm² pieces of ECN imprinted textiles were sampled into and randomly selected from the center region of the textile for a good statistical analysis. 10 out of 30 imprinted sheets for this study were sampled and analyzed. To extract ECN from the fabric, textiles samples were suspended in 1 mL of methanol, sonicated for 30 minutes and heated at 55°C for 4 hours. After cooling down, 500 µL of the extraction solution was sampled, filtered and quantified by HPLC-UV.

Stability

Three sheets of 15 by 15 cm imprinted ECN textiles were placed in stability chambers (25°C/65% Residual humidity (RH)). At each time point, 3 pieces of 1 cm² per sheet were taken for analysis from the center area of the textile. The quantification and sample preparation method was identical to the one described above and analyzed by HPLC-UV. The stability was followed up to 4 months.

***In vitro* release**

Disks of 0.79 cm² (1 mm diameter, containing 71 µg of ECN) were cut out of the imprinted textile. *In vitro* release was performed using Franz cells from PermGear Inc. (Hellertown, PA, USA) with an opening of 0.9 mm in diameter, 5 mL receptor size and a thermostated jacket. Diffusion tests were carried on semi-permeable polycarbonate membranes of 0.6 µm in pore sizes. The receptor fluid contained 10

mM phosphate buffer solution (PBS) with 1.37 mM of NaCl at pH 4.5 with PEG-400 (70:30 v/v). PEG-400 was used to improve ECN solubility in PBS [29]. The receptor fluid was thermostated at 22°C or 32°C and was constantly stirred at 100 rpm. Samples of 400 µL were withdrawn at 30 minutes, 1, 2, 3, 4 and 6 hours, filtered and replaced with the same volume of receptor fluid. Samples were diluted 1:50 in a mixture of 20% acetonitrile: 80% H₂O with 0.1% formic acid before quantification by HPLC- MS/MS.

Antifungal Disk Diffusion tests

C. albicans SC5314 and *Candida* strains from Nantes were routinely grown at 30°C in yeast peptone dextrose (YPD; 1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% dextrose plus 2% agar for solid medium) and Sabouraud culture medium (SB) respectively. *C. albicans* SC5314 were suspended in liquid YPD medium to an OD₆₀₀ of 0.1, and 150 µL of the cell suspension were spread on YPD Petri dishes (10 cm diameter). Disks of 0.79 cm² (1 mm diameter, containing 71 µg of ECN) were cut out of the imprinted textile, and equivalent quantity of Pevaryl® (7.1 mg Pevaryl®, 71 µg ECN) was weighted on a filter paper disk (1 mm in diameter). Placebo textile composed of microparticles without ECN and a standard 10 µg ECN disks were used as controls. All these disks were placed on the YPD Petri plates. The plates were incubated at 32°C, and growth inhibition diameters were measured at 18h. This was replicated 9 times for each formulation and repeated 3 times independently. Other *Candida spp*

isolates were suspended in sterile saline (0.85% NaCl) to achieve 1×10^6 of cells per mL, which were deposited on to SB Petri dishes (10 cm in diameter). Disks of 0.50 cm² (0.8 mm in diameter, containing 50 µg of ECN) were cut out of the imprinted textile, and equivalent quantity of Pevaryl® (5.0 mg Pevaryl®, 50 µg ECN) was weighted on a filter paper disk (0.8 mm in diameter). Placebo textile and standard 10 µg ECN disks were used as controls. All these disks were placed on the SB Petri plates. The plates were incubated at 32°C, and growth inhibition diameters were measured at 18h. This was replicated 4 times for each formulation and repeated 2 times independently.

Trichophyton rubrum and *T. mentagrophytes* were grown on SB culture medium. *Trichophyton* species were suspended in sterile saline (0.85% NaCl) with 0.1% Sodium dodecyl sulfate (SDS) to achieve 1×10^6 of fungal cells per mL, which were deposited on to SB petri dishes (10 cm in diameter). The plates were incubated at 25°C, and growth inhibition diameters were measured after 4 days for *T. mentagrophytes* and after 7 days for *T. rubrum*. This was replicated 3 times for each formulation and species. This was repeated 3 times independently for *T. mentagrophytes* and once for *T. rubrum*.

Ex vivo diffusion test on pig ear skin

Pig ears were kindly provided by Dr. Fairbrother from the Veterinary Department of Université de Montréal (Sainte Hyacinthe, Qc, Canada). Ears were washed with

water and 1% SDS and shaved using a razor. The skin was gently peeled off on the dorsal region of the ears, washed again with 1% SDS and water and stored at -20°C until the next day. Skin diffusion tests were performed using Franz cells as described above. The receptor fluid contained 10 mM PBS at pH 4.5 with 30% PEG-400 and was stirred at 100 rpm. The receptor compartments were heated to 37°C to help maintain the surface of the skin at 32°C. Disks of 0.79 cm² (1 mm in diameter, containing 71 µg of ECN) were cut out of the imprinted textile, and equivalent quantity of Pevaryl® (7.1 mg, 71 µg ECN) was weighted on a filter paper disk (1 mm in diameter). These disks were applied on the surface of the skin. A small weight (5 g) was applied for the textile formulation on skin surface to ensure contact between the formulation and the skin. The system was dismantled after 24 hours and all the receptor fluid was collected. Residual textiles or filters were collected for ECN quantification. The skin surface was washed with 8 mL of ethanol/water (50:50). The skin was separated in 3 layers: stratum corneum (SC), epidermis and dermis. The SC was removed using 20 strips of 1 cm² 3M tape, which was extracted by 20 mL of acetonitrile. Epidermis was peeled off from the dermis after heating at 80°C for 10 seconds. Both epidermis and dermis were cut into pieces and was suspended in 1 mL acetonitrile.

All samples were sonicated for 30 min then heated at 55°C for 4 hours. Liquid layers were filtered and diluted in 20% acetonitrile with 0.1% formic acid. Samples were diluted (1:20 for epidermis, 1:200 for residual formulations on filter and 1:10 for all

other samples (washing, SC, dermis, and receptor)) and quantified by HPLC-MS/MS. Each test was repeated 3 times independently with skins from 3 different pig ears.

Statistical Analysis

The statistical analysis was executed by means of Graph Pad® 6.0c (Prism Software, San Diego, CA, USA). Multiple t-test was used with corrected p-value using the sidak-bonferroni assuming unequal variance method for *ex vivo* pig skin diffusion tests. All *p*-values ≤ 0.05 were considered to be significant.

2.6 Results and discussion

Physical properties of pharmaceutical textiles

ECN-loaded solid lipid microparticles (1% *w/w*) were prepared under high shear and deposited on textile using an adapted screen-printing method as previously described [23]. The pharmaceutical textiles was first characterized by their ECN content. ECN was extracted from textile samples and analyzed by HPLC. After microparticle deposition, ECN content was measured to be $90 \pm 19 \mu\text{g per cm}^2$. The uniformity and the homogeneity of deposition of ECN-loaded microparticles were assessed over 10 different sheets of textile on 3 different areas per sheet, concluding that ECN content varied less than 10% of the mean value during the printing process (data not shown). Moreover, the ECN content was further monitored as indicator of the chemical stability of the pharmaceutical textiles. Stability was

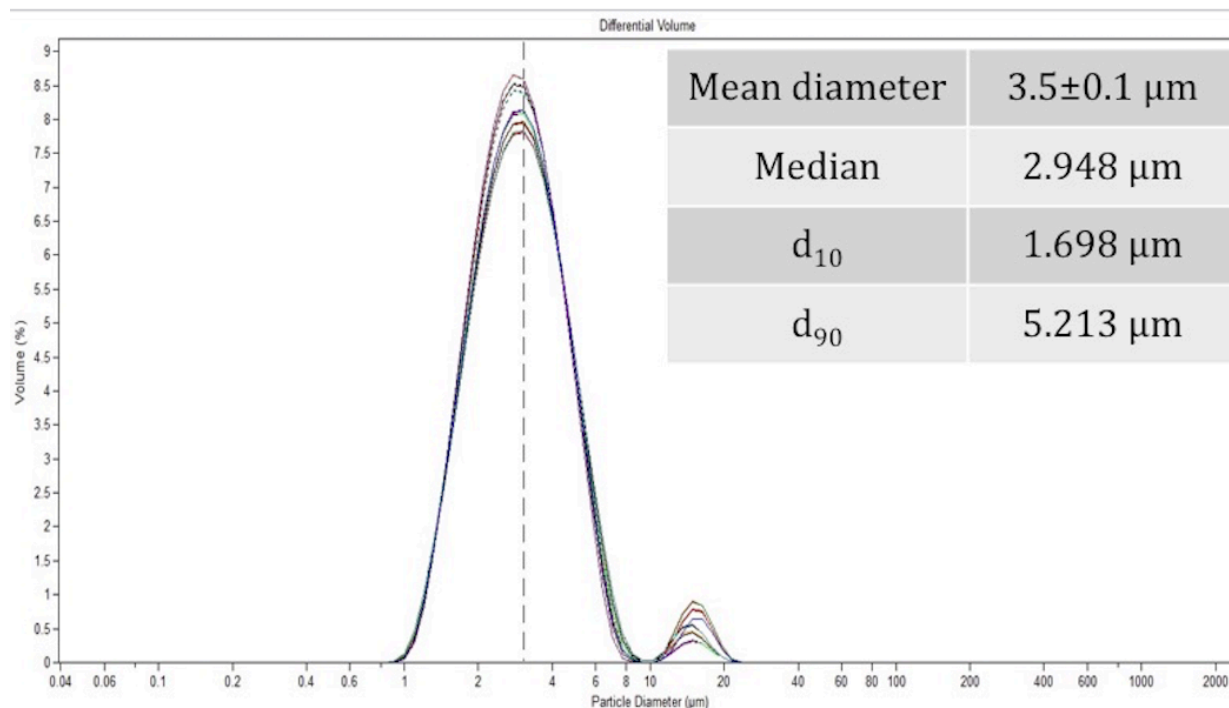
monitored each week during 6 weeks using stability chambers (25°C/65% residual humidity (RH)) (Table 4). After 4 months, ECN content was still 97 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, which represents 108% of the initial content. Altogether, the reproducibility of the production process and the stability over several weeks demonstrated the feasibility of the pharmaceutical textiles as new pharmaceutical products.

Table 3 : ECN content of pharmaceutical textiles upon storage at 25°C/65%RH. T0: After screen-printing. (n = 9)

Time in weeks	T0	T1	T2	T3	T4	T6	T16
ECN Textile content ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	90±19	99±10	105±11	100±20	96±9	84±2	97±3

In a second step, microparticle size was evaluated before deposition on textile using laser diffraction (Figure 2.2). Particles exhibited micro-range diameter ($3.5\pm 0.1 \mu\text{m}$). Pevaryl® particle size was also measured by dynamic light scattering and indicated a mean particle size of 348 nm with a polydispersity of 0.3.

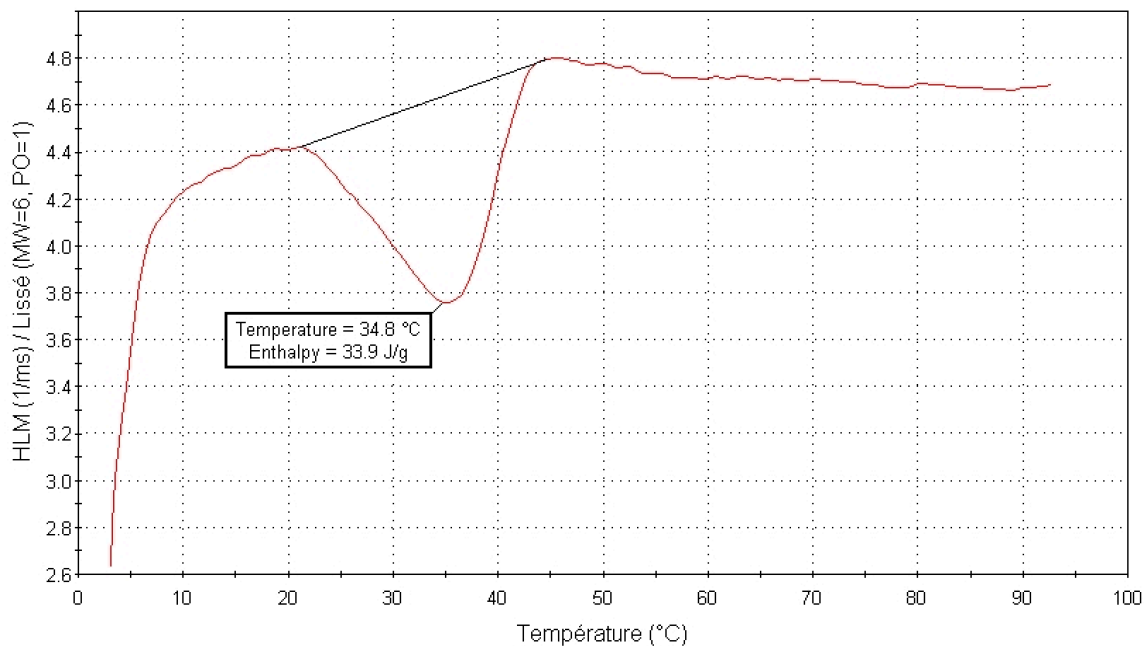
Figure 2.2 Measurement of ECN microparticles by LD



Measurement of ECN microparticles by LD (d₁₀: 1.70 µm, d₅₀: 2.95 µm, d₉₀: 5.20 µm)

The solid character of microparticles at room temperature was confirmed by a fusion temperature of 34.8°C, as determined by TA-HLM (Figure 2.3). The latter is a method similar to differential scanning calorimetry, which allows for the measurement of fusion temperature of microparticles deposited on a textile surface [28]. This fusion temperature is crucial to allow the selective release upon contact of the skin, which is approximately 32°C, while maintaining a good stability upon storage at room temperature.

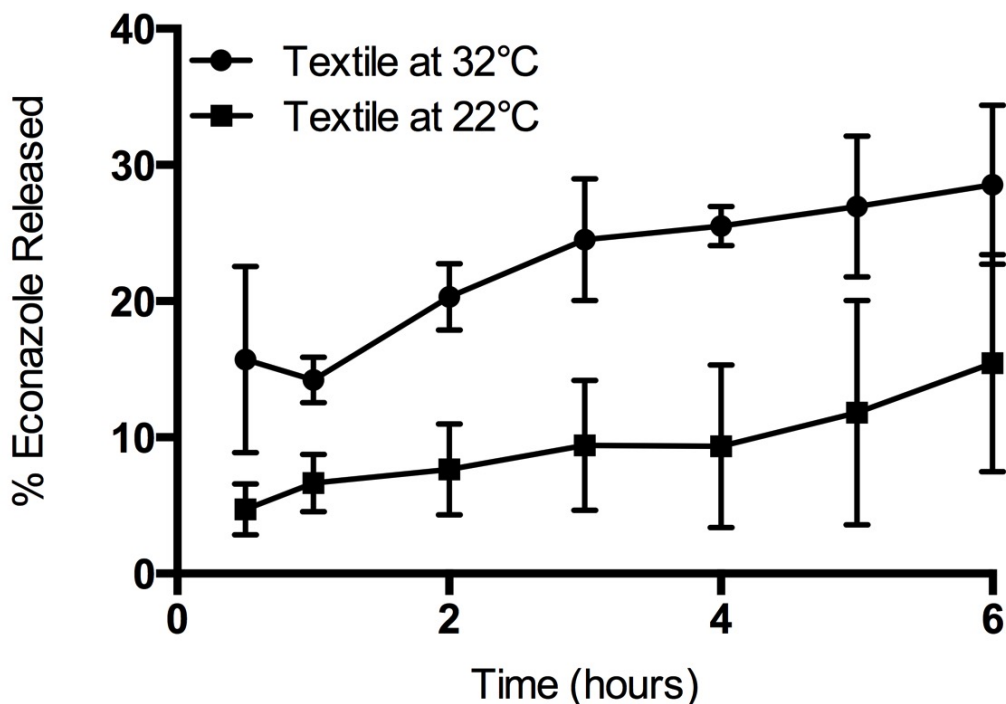
Figure 2.3 TA-HLM of ECN textile formulation



Microparticle fusion temperature is at 34.8°C.

The thermo-sensitive behavior of the pharmaceutical textiles was further confirmed by the drug release profile either at room temperature or at 32°C in Franz diffusion cells (Figure 2.4). As expected, release at 32°C was higher and faster than at room temperature. Indeed, the textile released twice the amount of ECN at about all time points except at 6 hours due to larger error bars. Raising the temperature to 32°C, close to the fusion temperature of the lipids, initiated the fusion of the microparticles and allowed ECN diffusion from the textile. It can be noted that no increase in ECN concentration in receptor fluid was observed after 24h, indicating that the maximum release was reached within 6 hours. This suggested the textile served as a reservoir for ECN delivery, since less than 30% of the total ECN was released.

Figure 2.4 ECN release profile against time of ECN textiles

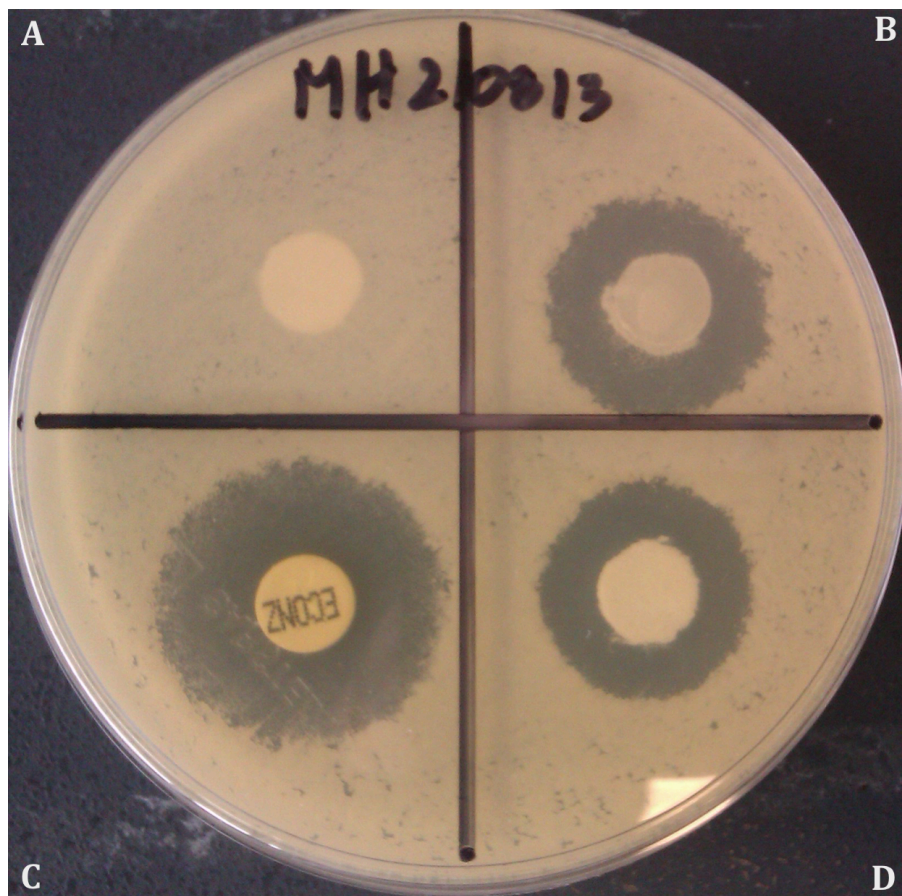


ECN release profile against time of pharmaceutical textile at 22°C (black squares) and 32°C (black round dots) on Franz diffusion cells through polycarbonate membranes (n=4) with respective standard error bars.

Antifungal activity of pharmaceutical textiles

Once the thermo-sensitivity was verified, the intelligent textiles were examined regarding their pharmaceutical properties, to ensure that the developed technology was able to preserve the pharmaceutical activity of the drug. Antifungal activity of textiles was compared to a commercial formulation of ECN, Pevaryl®. Pevaryl® is a 1% (w/w) ECN cream indicated to treat *Candida*, dermatophytes and *Malassezia* superficial infections [15, 16].

Figure 2.5 Antifungal disk diffusion test on *C. albicans*



Antifungal disk diffusion test on *C. albicans* SC5314 containing Textile placebo (A) (imprinted with blank formulation), soluble ECN 10 µg standard disks (C), Pevaryl® formulation (71 µg ECN) on a filter (B) and ECN textile formulation (71 µg ECN) (D).

Experimental conditions were first optimized on the *C. albicans* SC5314 strain using the antifungal disk diffusion test [30]. Figure 2.5 shows a representative setup for the experiment; ECN imprinted textiles were compared to ECN standard disks, Pevaryl® deposited on paper filter and placebo composed of imprinted textile with a blank formulation (*i.e.* same composition, without drug), which were used as controls. The textile formulation demonstrated an inhibition zone corresponding to

81% of the commercial formulation on SC5314. The same experiment was repeated for other *C. albicans* strains and the ECN textile exhibited an inhibition of 93% on 4 other *C. albicans* strains (Table 3). These results showed that, ECN maintained a comparable activity on textile as compared to the cream formulation. The slightly lower activity may be due to the diffusion of ECN from the textile support. Pevaryl might also exhibit a slightly better efficacy because of its reduced particle size, facilitating diffusion and increasing surface area which results in increased drug activity [30]. *In vitro* disk diffusion tests are not designed to test the long-term efficacy of controlled release products like the ECN textiles but rather immediate release. ECN activity loaded on textiles reached 91%, 84% and 91% of the activity of commercial formulation on *C. lusitaniae*, *C. kefyr* and *C. glabrata* respectively (Table 5).

Table 4: Inhibition zone diameter (IZD) of textile formulation on *C. albicans* strains after 18 hours at 32°C

Strain	IZD of Textile Formulation (mm)	IZD of Pevaryl® formulation (mm)	Ratio Textile/Pevaryl® (%)
SC5314 (n=27)	18.8±0.9	23.1±2.5	81
4 Nantes Isolates (n=8)	21.7±1.0	23.4±1.9	93

Table 5 : IZD of textile formulation on *Candida* species after 18 hours at 32°C

Species	IZD of Textile Formulation (mm)	IZD of Pevaryl® formulation (mm)	Ratio Textile/Pevaryl® (%)
<i>C. lusitaniae</i> (n=4)	18.5±0.7	20.3±0.4	91
<i>C. kefyr</i> (n=8)	23.6±3.2	28.1±2.4	84
<i>C. glabrata</i> (n=8)	18.3±5.9	19.5±4.2	92

Finally, inhibition of dermatophytes growth was examined on the two most prevalent species in fungal skin infections namely *T. Rubrum* and *T. mentagrophytes* [12, 13] (Table 6). In these latter tests, the activity of ECN reached 62% of the commercial formulation activity. This lower result could be explained because dermatophytes *in vitro* require to grow several days at 25°C, corresponding to the temperature at which the *in vitro* study was conducted. At this temperature, ECN has a limited release, as shown in figure 2.4, so that the effective concentration of ECN might have been lower than the commercial formulation, which is not temperature-sensitive. Although the experimental conditions were not adapted for pharmaceutical textiles, similar results obtained by Hammer *et al.* concluded that *T. mentagrophytes* and *T. rubrum* were less susceptible than *C. albicans* when exposed to antifungal textiles [13].

Table 6: IZD of textile formulation on Trichophyton species after 4 (T. mentagrophytes) or 7 days (T. rubrum) at 25°C

Species	IZD of Textile Formulation (mm)	IZD of Pevaryl® formulation (mm)	Ratio Textile/Pevaryl® (%)
<i>T. mentagrophytes</i> (n=14)	24.8±0.7	39.8±3.2	62
<i>T. rubrum</i> (n=3)	29±1.7	47±4.2	62

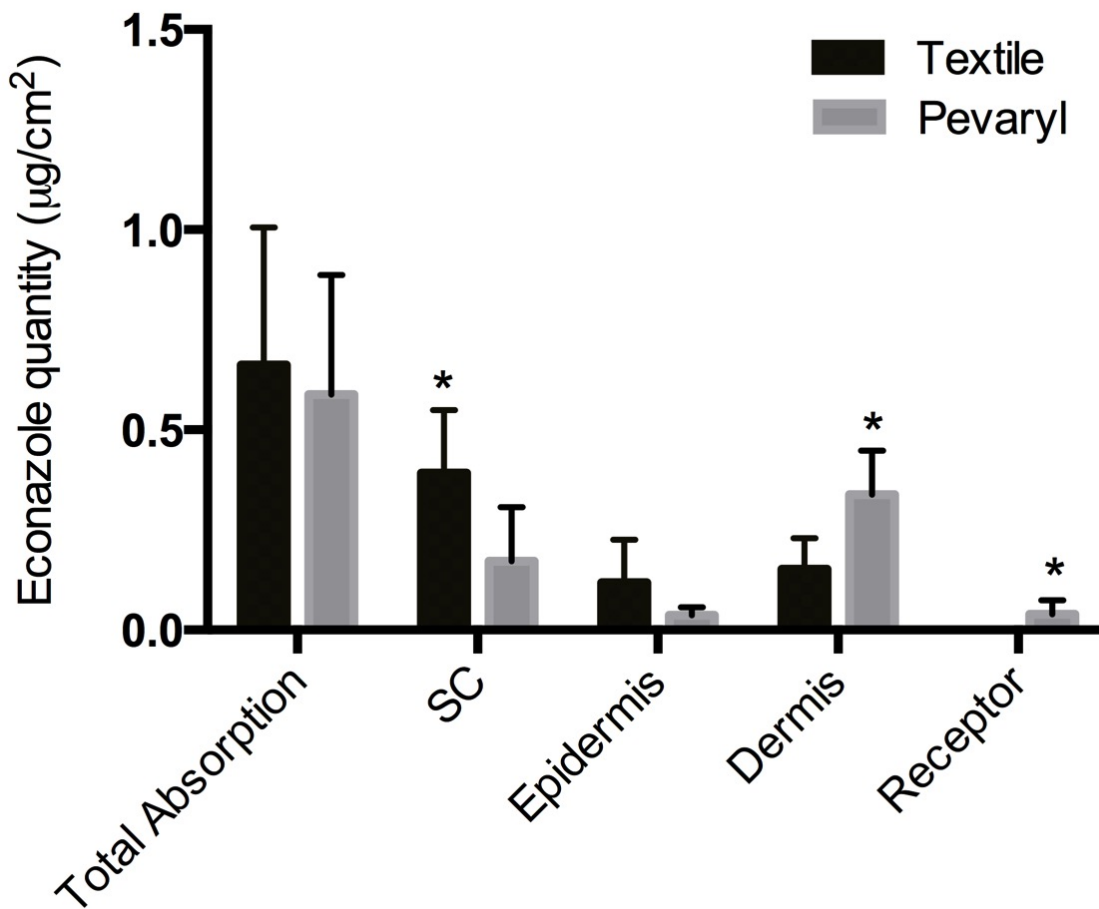
Overall, these results demonstrate that ECN maintains its antifungal activity on all *Candida* species tested *in vitro*, proving that this newly developed technology of imprinted textiles is able to preserve the pharmaceutical activity of a drug.

Percutaneous absorption of ECN

The impact of the lipid microparticle formulation was examined by the percutaneous absorption of imprinted textiles and compared to the commercial formulation. Pig skin has been reported as a good model for skin percutaneous absorption [31]. Both ECN formulations were applied on pig skin for 24h with the receptor temperature at 37°C in Franz diffusion cells, and ECN was quantified by HPLC-MS/MS in the different layers of the skin: stratum corneum (SC), epidermis, dermis, and receptor compartment (Figure 2.6). Overall percutaneous absorption was similar for both formulations, showing that both systems diffused similar quantities ECN. This was in agreement with the comparable antifungal activity on

Candida species (Table 5). It should be noted that the ECN total release was less than 1% of the ECN loading, which confirmed the reservoir effect of the textile, already observed for other cosmeto-textiles [8].

Figure 2.6 Textile vs Pevaryl on *ex vivo* pig skin diffusion



ECN content after 24 hours in Franz cells diffusion test on pig skin using ECN textile formulation (black bars) and Pevaryl® (grey bars) Receptor compartment was set at 32°C. ECN quantification by LC-MS/MS Error bars are in standard error and asterisk for statistically significant values ($p < 0.05$)

Within the released drug, skin distribution was slightly different for textile and the commercial cream. ECN from textile was mainly distributed in the SC, and penetrated less in the epidermis and dermis, whereas the commercial formulation was mainly found in the dermis, and was even quantifiable in the receptor compartment (Figure 2.6). This difference might be attributed to the particle size of both formulations. Indeed, Pevaryl® formulation was measured to be a nanometric suspension where as the textiles exhibited micrometric particles (Figure 2.2). Nanometric formulations have been reported to penetrate deeply into the dermis, and have also been used for transcutaneous absorption of drugs [21]. In our case, the micrometric particles were designed to concentrate into the upper layer of the skin, where the fungal infections develop. Moreover, their lipid composition might improve their affinity for the skin tissues, resulting in a higher concentration of ECN in the SC than the commercial formulation. This suggests that the ECN pharmaceutical textiles allowed for the targeted delivery of active drug in the upper skin layers, as observed for textiles using microspheres [8, 21]. No ECN was measured in the receptor compartment, indicating the systemic exposure was

limited by microparticle formulation as compared to Pevaryl®, which helps limiting undesirable effects.

2.7 Conclusion

This study was aimed at assessing pharmaceutical textiles using ECN as a model drug for skin diseases. The technology of pharmaceutical textiles lies in a dual innovation: first, the lipid microparticle formulation, which helped (i) storage stability combined with thermo-sensitive release upon contact with the skin; (ii) skin diffusion and drug distribution within the upper layers of the skin, optimized to treat superficial fungal infections, without systemic absorption. Secondly, the screen-printing method was particularly well adapted to the drug formulation of microparticles since it preserved the pharmaceutical activity of the drug, as tested on various fungi species. Overall, these results showed that this technology is promising to develop pharmaceutical textiles for the treatment of superficial infections. Such textiles could be developed in bandages or socks, which would improve patient compliance and easy to use application.

Acknowledgements

The authors thank the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Fonds de Recherche du Québec - Nature et technologies and Biomod Concepts for their financial support. We thank Dr Fairbrother for providing pig ears

and Martin Jutras for developing HPLC-MS/MS method.

Conflict of interest.

This work has been partially funded by Biomod Concepts Inc. The patented technology belongs to Karine Th  berge and Biomod Concepts Inc. All the analyses and characterization have been performed at the University of Montreal, independently from the company.

2.8 References

- [1] L. Ripoll, C. Bordes, S. Etheve, A. Elaissari, H. Fessi, Cosmeto-textile from formulation to characterization: an overview, *E-Polymers*, (2010).
- [2] M.K. Singh, V.K. Varun, B.K. Behera, Cosmetotextiles: State of Art, *Fibres Text East Eur*, 19 (2011) 27-33.
- [3] G. Nelson, Application of microencapsulation in textiles, *Int J Pharm*, 242 (2002) 55-62.
- [4] M. Karthikeyan, T. Ramachandran, O.L.S. Sundaram, Nanoencapsulated phase change materials based on polyethylene glycol for creating thermoregulating cotton, *J Ind Text*, 44 (2014) 130-146.
- [5] M. Ibanescu, V. Musat, T. Textor, V. Badilita, B. Mahltig, Photocatalytic and antimicrobial Ag/ZnO nanocomposites for functionalization of textile fabrics, *J Alloy*

Compd, 610 (2014) 244-249.

[6] J. Liu, C. Liu, Y. Liu, M. Chen, Y. Hu, Z. Yang, Study on the grafting of chitosan-gelatin microcapsules onto cotton fabrics and its antibacterial effect, *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 109 (2013) 103-108.

[7] C. Alonso, M. Marti, V. Martinez, L. Rubio, J.L. Parra, L. Coderch, Antioxidant cosmeto-textiles: Skin assessment, *Eur J Pharm Biopharm*, 84 (2013) 192-199.

[8] M. Marti, V. Martinez, N. Carreras, C. Alonso, M.J. Lis, J.L. Parra, L. Coderch, Textiles with gallic acid microspheres: in vitro release characteristics, *J Microencapsul*, 31 (2014) 535-541.

[9] G. Cravotto, L. Beltramo, S. Sapino, A. Binello, M.E. Carlotti, A new cyclodextrin-grafted viscose loaded with aescin formulations for a cosmeto- textile approach to chronic venous insufficiency, *J Mater Sci-Mater M*, 22 (2011) 2387-2395.

[10] C. Wiegand, U.C. Hipler, S. Boldt, J. Strehle, U. Wollina, Skin-protective effects of a zinc oxide-functionalized textile and its relevance for atopic dermatitis, *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 6 (2013) 115- 121.

[11] R.J. Hay, N.E. Johns, H.C. Williams, I.W. Bolliger, R.P. Dellavalle, D.J. Margolis, R. Marks, L. Naldi, M.A. Weinstock, S.K. Wulf, C. Michaud, J.L.M. C, M. Naghavi, The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions, *J Invest Dermatol*, 134 (2014) 1527-1534.

- [12] P. Vltavska, V. Kasparkova, R. Janis, L. Bunkova, Antifungal and antibacterial effects of 1-monocaprylin on textile materials, *Eur J Lipid Sci Tech*, 114 (2012) 849-856.
- [13] T.R. Hammer, H. Mucha, D. Hoefler, Dermatophyte susceptibility varies towards antimicrobial textiles, *Mycoses*, 55 (2012) 344-351.
- [14] C.W.M. Yuen, J. Yip, H.C. Cheung, L.W. Liu, C.H. Luk, W.C. Wai, Treatment of interdigital-type tinea pedis with a 2-week regimen of wearing hygienic socks loaded with antifungal microcapsules: A randomized, double-blind, placebo-controlled study, *J Am Acad Dermatol*, 69 (2013) 495-496.
- [15] R.C. Heel, R.N. Brogden, T.M. Speight, G.S. Avery, Econazole - Review of Its Antifungal Activity and Therapeutic Efficacy, *Drugs*, 16 (1978) 177-201.
- [16] A. Brayfield, *Martindale: The Complete Drug Reference*, in: P. Press (Ed.), *MedicineComplete*, 2014.
- [17] M. Alsterholm, N. Karami, J. Faergemann, Antimicrobial activity of topical skin pharmaceuticals - an in vitro study, *Acta Derm-Venereol*, 90 (2010) 239-245.
- [18] M. Gupta, S.P. Vyas, Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis, *Chem Phys Lipids*, 165 (2012) 454-461.
- [19] B. Albertini, N. Passerini, M. Di Sabatino, B. Vitali, P. Brigidi, L. Rodriguez,

Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray- congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate, *Eur J Pharm Sci*, 36 (2009) 591-601.

[20] Y.G. Bachhav, K. Mondon, Y.N. Kalia, R. Gurny, M. Moller, Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals, *J Control Release*, 153 (2011) 126-132.

[21] N. Passerini, E. Gavini, B. Albertini, G. Rassu, M. Di Sabatino, V. Sanna, P. Giunchedi, L. Rodriguez, Evaluation of solid lipid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate, *J Pharm Pharmacol*, 61 (2009) 559-567.

[22] M. Gupta, S. Tiwari, S.P. Vyas, Influence of various lipid core on characteristics of SLNs designed for topical delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis, *Pharm Dev Technol*, 18 (2013) 550-559.

[23] K. Theberge, L. Goudreault, F. Quiron, G. Perron, Articles of manufacture releasing an active ingredient, in, 2010 Patent # WO 2010/006442 A1.

[24] I. Kazani, C. Hertleer, G. De Mey, A. Schwarz, G. Guxho, L. Van Langenhove, Electrical conductive textiles obtained by screen printing, *Fibres Text East Eur*, 20 (2012) 57-63.

[25] E. Skrzetuska, M. Puchalski, I. Krucinska, Chemically driven printed textile sensors based on graphene and carbon nanotubes, *Sensors*, 14 (2014) 16816-

16828.

[26] T. Jones, N.A. Federspiel, H. Chibana, J. Dungan, S. Kalman, B.B. Magee, G. Newport, Y.R. Thorstenson, N. Agabian, P.T. Magee, R.W. Davis, S. Scherer, The diploid genome sequence of *Candida albicans*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 101 (2004) 7329-7334.

[27] A.M. Gillum, E.Y. Tsay, D.R. Kirsch, Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations, *Mol Gen Genet*, 198 (1984) 179-182.

[28] F. Quirion, D. Lambert, G. Perron, The Hlm Method - a simple way to get the solid liquid-phase diagrams and enthalpies of transition of pure components and mixtures, *Can J Chem*, 70 (1992) 2745-2750.

[29] K. Kovacs, G. Stampf, I. Klebovich, I. Antal, K. Ludanyi, Aqueous solvent system for the solubilization of azole compounds, *Eur J Pharm Sci*, 36 (2009) 352-358.

[30] A. Melkoumov, M. Goupil, F. Louhichi, M. Raymond, L. de Repentigny, G. Leclair, Nystatin nanosizing enhances in vitro and in vivo antifungal activity against *Candida albicans*, *J Antimicrob Chemother*, 68 (2013) 2099-2105.

[31] C. Herkenne, A. Naik, Y.N. Kalia, J. Hadgraft, R.H. Guy, Pig ear skin ex vivo as a model for in vivo dermatopharmacokinetic studies in man, *Pharma Res*, 23 (2006) 1850-1856.

Chapitre 3: Modèle d'infection fongique cutanée in vivo

Avant d'essayer des nouveaux médicaments et des nouveaux dispositifs médicaux sur des sujets sains en phase I du développement du médicament, il est préférable de faire des études *in vivo*. Pour étudier une maladie, il faut utiliser un modèle pathologique animal, *qui doit être bien établi avant d'effectuer des tests*.

Pour les infections fongiques topiques, il existe certains modèles animaux. On peut les diviser en deux classes : modèle de cochon d'inde et les modèles de souris.

3.1 Modèle cochon d'inde

Le cochon d'inde est un modèle animal qui est susceptible de développer des infections fongiques cutanées à *T. mentagrophytes* et *C.albicans* [53, 54]. Le modèle de candidose cutanée a été développé par Thienpont et *al.* et a été utilisé pour tester le ketoconazole [54].

Ces modèles d'infection pour la candidose peuvent être faits avec ou sans occlusion. Les cochons d'indes sont d'abord immunosupprimés avec la prednisolone pour favoriser le développement de l'infection. La peau est rasée sur une petite surface, qui sera infectée. Après deux jours, 25 à 40 μL (selon la grandeur de la surface) d'inoculum de *C. albicans* à une concentration de 10^7 cellules est déposé sur la surface de peau rasée puis est laissé sécher à l'air libre. Les traitements antifongiques sont appliqués tous les jours et les animaux sont sacrifiés après 4 à 7

jours après le début du traitement selon le besoin. La peau infectée est broyée, remise en culture et le nombre de colonies est compté après 24 heures [55-58].

3.2 Modèle de souris

Les modèles de souris sont plus rares, car ces rongeurs ne développent pas facilement d'infections fongiques superficielles. Pr Le Pape et son équipe ont développé un modèle de souris DBA-2 infectées par *C. albicans* très similaire au modèle de cochon d'inde sauf qu'il est nécessaire de créer une lésion sur la peau pour favoriser l'infection [59]. Des études *in vivo* sur ce modèle de candidose cutanée avec la formulation de microparticules d'ECN ont été envisagées en collaboration avec le département de parasitologie et de mycologie de l'université de Nantes du laboratoire de Patrice Le Pape. Le but de cette étude était de comparer la formulation textile d'ECN avec la formulation commercial d'ECN (Pevaryl®) sur un modèle *in vivo* afin de déterminer l'activité prolongée du textile une fois appliqué.

3.2.1 Méthode

40 souris DBA-2 (15-20 g) ont été acclimatées pendant une semaine avant le début de l'étude. Trois jours avant l'étude, les souris ont reçu une injection de prednisolone (1 mg/kg). Les souris étaient rasées sur une surface de 1.5 cm par 1.5 cm sur le dos. Une solution de *C. albicans* (SC5314 et CAAL 93) avec une concentration de 2×10^6 cellules par mL ont été préparées. À la deuxième journée, une abrasion de la peau fut créée et 25 μ L de l'inoculum ont été déposés sur chaque

souris sous anesthésie générale avec la prednisolone (1 mg/kg). À la quatrième journée, le traitement commence et les souris ont été divisées en 5 groupes de 8 souris. Le premier groupe n'a pas reçu de traitement, le deuxième a reçu un placebo (le textile imprimé avec la formulation de microparticules sans ECN) changé tous les jours, le troisième groupe a reçu la formulation commerciale Pevaryl® tous les jours, le quatrième groupe a reçu la formulation textile d'ECN changé une fois par jour et le cinquième groupe a reçu la formulation textile ECN changé tous les deux jours. Après 5 jours de traitement, les animaux ne sont pas traités pendant 48 heures. Les animaux sont sacrifiés et la peau est collectée. La portion de la peau infectée est broyée et remise en culture pendant 24 à 48 heures. Les colonies sont comptées à la fin. L'étude a été répétée à deux reprises.

3.2.2 Résultats et discussion

Les souris ont été infectées par deux souches (SC5314 et CAAL 93) de *candida albicans*, dont la souche utilisée pour les études *in vitro* (SC5314) et le CAAL 93 couramment utilisée sur le modèle animal. Cependant, après 5 jours de traitement, aucun groupe, incluant les souris non-traitées, n'a développé l'infection attendue. Il pourrait avoir eu un problème avec la souche utilisée ou la concentration de champignon n'est pas suffisante pour créer une infection assez virulente.

3.2.3 Conclusion

Les tests *in vivo* sont à refaire après la validation du modèle pathologique. Depuis, les expériences ont été recommencées avec une souche isolée d'un patient et le

modèle a donné des résultats satisfaisants. L'étude est à nouveau programmée pour les textiles en 2015.

Chapitre 4 : Conclusion

Le but de ce projet était de démontrer que l'application de microparticules d'ECN sur un textile non-tissé (Laya™) est équivalent à la formulation commerciale d'ECN à 1% (Pevaryl®). Voici les objectifs qui ont été atteints :

1- Préparer des formulations de microparticules d'ECN et les déposer sur textile.

Plusieurs formulations de microparticules d'ECN sur textile ont été formulées, mais une seule formulation a été retenue pour étudier le relargage, l'efficacité antifongique et la diffusion *ex vivo*. La sélection de cette formulation s'est faite selon la stabilité à court et moyen terme.

2- Caractérisation des formulations d'ECN (Taille des particules, teneur, température de fusion, stabilité chimique).

Les diamètres des particules étaient de 3.5 ± 0.1 μm mesurées par diffraction laser avant impression. La température de fusion était de 34.8°C mesurée par AT-HLM. La teneur était de 90 ± 19 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et ensuite à 97 ± 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ après 4 mois à $25^\circ\text{C}/65\%$ humidité résiduelle.

3- Mesurer l'activité antifongique des formulations d'ECN sur textile.

L'activité de la formulation a été testée sur plusieurs espèces de *candida* et sur deux

espèces de Trichophyton (*rubrum* et *mentagrophytes*). Globalement la formulation a démontré une bonne activité sur les genres de *candida* (81-93% de l'activité de la formulation commerciale Pevaryl®), mais avait une activité de seulement 62% sur les *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* due aux conditions expérimentales.

4- Déterminer la cinétique de diffusion à 22°C et à 32°C des formulations textiles.

La formulation de microparticules d'ECN sur textile libérait mieux à 32°C que 22°C démontrant une thermosensibilité de la formulation après 6 heures.

5-Determiner la pénétration cutanée des formulations textiles.

La formulation d'ECN reste en superficie alors que la formulation commerciale Pevaryl® diffuse plus profondément due à sa taille de particule plus petite. Une libération de l'ECN en surface de la peau était désirée pour éviter les effets secondaires et augmenter l'efficacité du traitement.

Chapitre 5 : Perspective et Travaux futurs

Travaux restant sur les textiles avec microparticules d'ECN

Il serait nécessaire d'avoir une preuve visuelle des microparticules déposées sur le support textile. Les microparticules qui ont une température de fusion de 34.8°C peuvent fondre lors du MEB. L'expérience de MEB avec la formulation ECN sur textile donnait un film lipidique sur le support textile indiquant possiblement la fusion des microparticules. Pour contrer ce problème, il serait intéressant de faire un MEB avec cryofracture pour voir si on a réellement des microparticules déposées sur textile. Si la technique fonctionne, il serait intéressant de voir la stabilité physique des microparticules avec le MEB en même temps que la stabilité chimique. La stabilité devrait être suivie pendant au minimum un an pour estimer la durée de stabilité et rencontrer éventuellement les critères réglementaires.

Les tests *in vivo* sur le modèle de souris cutanée infecté par *C. albicans* seraient à répéter, ce qui aura lieu au mois de Mars 2015.

Il serait nécessaire de répéter les tests sur dermatophytes (*T. mentagrophytes* et *T. rubrum*) avec des conditions plus adaptées pour le textile (plus proche de 32°C).

Finalement, il serait intéressant de tester les textiles sur un modèle animal de dermatophytes.

Travaux à long terme

Des comparaisons plus poussées sur le relargage et la stabilité peuvent être faites contre le Pevaryl® afin de mieux comprendre la libération de l'ECN du textile et la stabilité de ce dernier. Un test chez des patients pourra être envisagé si les tests *in vivo* démontrent des résultats intéressants.

L'éconazole était choisi comme modèle puisque c'est une molécule stable, qui avait de la littérature sur la formulation de microparticule lipidique et était indiquée pour un traitement local qui infecte une grande portion de la population mondiale. D'autres médicaments qui auront des profils similaires peuvent être tentés sur textile grâce au modèle de textile d'ECN. Des médicaments comme d'autres antifongiques locaux, des anti-inflammatoires locaux et d'autres médicaments avec libération locale pourront être utilisés sur textile afin de faciliter la posologie et la complaisance des patients.

Références

- [1] M. Ibanescu, V. Musat, T. Textor, V. Badilita, B. Mahltig, Photocatalytic and antimicrobial Ag/ZnO nanocomposites for functionalization of textile fabrics, *J Alloy Compd*, 610 (2014) 244-249.
- [2] J. Yip, L.W. Liu, K.H. Wong, P.H.M. Leung, C.W.M. Yuen, M.C. Cheung, Investigation of Antifungal and Antibacterial Effects of Fabric Padded with Highly Stable Selenium Nanoparticles, *J Appl Polym Sci*, 131 (2014).
- [3] H.J. Liu, Y.Y. Lee, T.B. Norsten, K.R. Chong, In situ formation of anti-bacterial silver nanoparticles on cotton textiles, *J Ind Text*, 44 (2014) 198-210.
- [4] L. Budama, B.A. Cakir, O. Topel, N. Hoda, A new strategy for producing antibacterial textile surfaces using silver nanoparticles, *Chem Eng J*, 228 (2013) 489-495.
- [5] B. Mahltig, B. Tatlis, A. Fahmi, H. Haase, Dendrimer stabilized silver particles for the antimicrobial finishing of textiles, *J Text I*, 104 (2013) 1042-1048.
- [6] B. Ocepek, B. Boh, B. Sumiga, P.F. Tavcer, Printing of antimicrobial microcapsules on textiles, *Color Technol*, 128 (2012) 95-102.
- [7] N. Sarier, E. Onder, Organic phase change materials and their textile applications: An overview, *Thermochim Acta*, 540 (2012) 7-60.
- [8] G. Nelson, Application of microencapsulation in textiles, *Int J Pharm*, 242 (2002) 55-62.

- [9] S. Mondal, Phase change materials for smart textiles - An overview, *Appl Therm Eng*, 28 (2008) 1536-1550.
- [10] Biomod, Dermotex La technologie dans la peau, (2013). <http://www.dermotex.com>, Consulted on December 12th 2014.
- [11] Biomod, Biomod, (2013). <http://www.biomod.com>, consulted December 12th 2014.
- [12] S.N. Rodrigues, I.M. Martins, I.P. Fernandes, P.B. Gomes, V.G. Mata, M.F. Barreiro, A.E. Rodrigues, Microencapsulated perfumes for textile application, *Chem Eng J*, 149 (2009) 463-472.
- [13] Z.H. Ma, D.G. Yu, C.J. Branford-White, H.L. Nie, Z.X. Fan, L.M. Zhu, Microencapsulation of tamoxifen: Application to cotton fabric, *Colloids Surf B*, 69 (2009) 85-90.
- [14] K. Theberge, L. Goudreault, F. Quirion, G. Perron, Articles of manufacture releasing an active ingredient, (2010) Patent #WO 2010/006442 A1.
- [15] A. Saupe, T. Rades, Solid Lipid Nanoparticles, in: *Nanocarrier Technologie*, 2006, pp. 41-50.
- [16] S. Jaspert, G. Piel, L. Delattre, B. Evrard, Solid lipid microparticles: formulation, preparation, characterisation, drug release and applications, *Expert Opin Drug Deliv*, 2 (2005) 75-87.

- [17] M.N. Singh, K.S. Hemant, M. Ram, H.G. Shivakumar, Microencapsulation: A promising technique for controlled drug delivery, *Research in pharmaceutical sciences*, 5 (2010) 65-77.
- [18] C.E. Mora-Huertas, H. Fessi, A. Elaissari, Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *Int J Pharm*, 385 (2010) 113-142.
- [19] J.-W. Rhim, H.-M. Park, C.-S. Ha, Bio-nanocomposites for food packaging applications, *Prog Polym Sci*, 38 (2013) 1629-1652.
- [20] F. Hussain, M. Hojjati, M. Okamoto, R.E. Gorga, Review article: Polymer-matrix Nanocomposites, Processing, Manufacturing, and Application: An Overview, *J Compos Mater*, 40 (2006) 1511-1575.
- [21] N. Saheb, N. Qadir, M. Siddiqui, A. Arif, S. Akhtar, N. Al-Aqeeli, Characterization of nanoreinforcement dispersion in inorganic nanocomposites: A Review, *Materials*, 7 (2014) 4148-4181.
- [22] K.M.M. Abou El-Nour, A.A. Eftaiha, A. Al-Warthan, R.A.A. Ammar, Synthesis and applications of silver nanoparticles, *Arabian J Chem*, 3 (2010) 135-140.
- [23] J. Salazar, A. Ghanem, R.H. Muller, J.P. Moschwitz, Nanocrystals: Comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches, *Eur J Pharm Biopharm*, 81 (2012) 82-90.
- [24] D.J. McClements, Nanoparticle- and microparticle-based delivery systems: encapsulation, protection and release of active compounds, CRC Press, 2014.

- [25] C. Alonso, M. Marti, V. Martinez, L. Rubio, J.L. Parra, L. Coderch, Antioxidant cosmeto-textiles: Skin assessment, *Eur J Pharm Biopharm*, 84 (2013) 192-199.
- [26] S.Y. Cheng, C.W.M. Yuen, C.W. Kan, K.K.L. Cheuk, C.H. Chui, K.H. Lam, Cosmetic textiles with biological benefits: Gelatin microcapsules containing Vitamin C, *Int J Mol Med*, 24 (2009) 411-419.
- [27] J. Hu, Z.B. Xiao, R.J. Zhou, S.S. Ma, M.X. Wang, Z. Li, Properties of Aroma Sustained-release cotton fabric with rose fragrance nanocapsule, *Chinese J Chem Eng*, 19 (2011) 523-528.
- [28] C.W.M. Yuen, J. Yip, H.C. Cheung, L.W. Liu, C.H. Luk, W.C. Wai, Treatment of interdigital-type tinea pedis with a 2-week regimen of wearing hygienic socks loaded with antifungal microcapsules: A randomized, double-blind, placebo-controlled study, *J Am Acad Dermatol*, 69 (2013) 495-496.
- [29] J.A. Bouwstra, P.L. Honeywell-Nguyen, G.S. Gooris, M. Ponc, Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations, *Prog Lipid Res*, 42 (2003) 1-36.
- [30] T.W. Prow, J.E. Grice, L.L. Lin, R. Faye, M. Butler, W. Becker, E.M.T. Wurm, C. Yoong, T.A. Robertson, H.P. Soyer, M.S. Roberts, Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery, *Adv Drug Deliver Rev*, 63 (2011) 470-491.
- [31] Wikipedia, Stratum corneum, (2015).
http://fr.wikipedia.org/wiki/Stratum_corneum, Consulted December 10th 2014

- [32] A.S. Avram, M.M. Avram, W.D. James, Subcutaneous fat in normal and diseased states - 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue, *J Am Acad Dermatol*, 53 (2005) 671-683.
- [33] M.D. Richardson, D.W. Warnock, *Fungal Infection: Diagnosis and Management*, 4th ed., Wiley-Blackwell, 2012.
- [34] R.J. Hay, N.E. Johns, H.C. Williams, I.W. Bolliger, R.P. Dellavalle, D.J. Margolis, R. Marks, L. Naldi, M.A. Weinstock, S.K. Wulf, C. Michaud, J.L.M. C, M. Naghavi, The global burden of skin disease in 2010: an analysis of the prevalence and impact of skin conditions, *J Invest Dermatol*, 134 (2014) 1527-1534.
- [35] B. Havlickova, V.A. Czaika, M. Friedrich, Epidemiological trends in skin mycoses worldwide, *Mycoses*, 51 (2008) 2-15.
- [36] A. Zagnoli, B. Chevalier, B. Sassolas, Dermatophyties et dermatophytes, *EMC - Pédiatrie*, 2 (2005) 96-115.
- [37] I. Ben Salah, F. Makni, F. Cheikhrouhou, S. Neji, H. Sellami, A. Ayadi, Malassezia species: Pathology, isolation and identification media, *J Mycol Med*, 20 (2010) 53-60.
- [38] B. Brennan, J.J. Leyden, Overview of topical therapy for common superficial fungal infections and the role of new topical agents, *J Am Acad Dermatol*, 36 (1997) S3-S8.
- [39] A. Brayfield, *Martindale: The Complete Drug Reference*, in: P. Press (Ed.), *MedicineComplete*, 2014.

- [40] R.C. Heel, R.N. Brogden, T.M. Speight, G.S. Avery, Econazole - Review of Its Antifungal Activity and Therapeutic Efficacy, *Drugs*, 16 (1978) 177-201.
- [41] Y.G. Bachhav, K. Mondon, Y.N. Kalia, R. Gurny, M. Moller, Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals, *J Control Release*, 153 (2011) 126-132.
- [42] N. Passerini, E. Gavini, B. Albertini, G. Rassu, M. Di Sabatino, V. Sanna, P. Giunchedi, L. Rodriguez, Evaluation of solid lipid microparticles produced by spray congealing for topical application of econazole nitrate, *J Pharm Pharmacol*, 61 (2009) 559-567.
- [43] V. Sanna, E. Gavini, M. Cossu, G. Rassu, P. Giunchedi, Solid lipid nanoparticles (SLN) as carriers for the topical delivery of econazole nitrate: in-vitro characterization, ex-vivo and in-vivo studies, *J Pharm Pharmacol*, 59 (2007) 1057-1064.
- [44] V. Sanna, G. Caria, A. Mariani, Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of Econazole nitrate, *Powder Technol*, 201 (2010) 32-36.
- [45] L. Keshri, K. Pathak, Development of thermodynamically stable nanostructured lipid carrier system using central composite design for zero order permeation of Econazole nitrate through epidermis, *Pharm Dev Technol*, 18 (2013) 634-644.
- [46] U.S.P. Convention, USP Monographs: Econazole Nitrate, in: *The United States Pharmacopeia and The National Formulary (USP-NF)*, 2014, pp. 2752.

- [47] F. Quirion, D. Lambert, G. Perron, The Hlm Method - a simple way to get the solid liquid-phase diagrams and enthalpies of transition of pure components and mixtures, *Can J Chem*, 70 (1992) 2745-2750.
- [48] A.A. Gaona-Galdos, P.L. Garcia, M.S. Aurora-Prado, M.I.R.M. Santoro, E.R.M. Kedor-Hackmann, Simultaneous determination of econazole nitrate, main impurities and preservatives in cream formulation by high performance liquid chromatography, *Talanta*, 77 (2008) 673-678.
- [49] B.A. Mousa, N.M. El-Kousy, R.I. El-Bagary, N.G. Mohamed, Stability indicating methods for the determination of some anti-fungal agents using densitometric and RP-HPLC methods, *Chem Pharm Bull*, 56 (2008) 143-149.
- [50] G. Popovic, M. Cakar, K. Vucicevic, S. Vladimirov, D. Agbaba, Comparison of HPTLC and HPLC for determination of econazole nitrate in topical dosage forms, *Jpc- J Planar Chromat*, 17 (2004) 109-112.
- [51] NCCLS, Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A, Clinical and laboratory standard institute, (2008).
- [52] K. Kovacs, G. Stampf, I. Klebovich, I. Antal, K. Ludanyi, Aqueous solvent system for the solubilization of azole compounds, *Eur J Pharm Sci*, 36 (2009) 352-358.
- [53] T. Majima, S. Masui, K. Uchida, H. Yamaguchi, A novel mycological analysis valuable for evaluating therapeutic efficacy of antimycotics against experimental dermatophytosis in guinea pigs, *Mycoses*, 48 (2005) 108-113.

- [54] D. Thienpont, J. Vancutsem, M. Borgers, Ketoconazole in experimental candidosis, *Rev Infect Dis*, 2 (1980) 570-576.
- [55] K. Maebashi, T. Itoyama, K. Uchida, N. Suegara, H. Yamaguchi, A novel model of cutaneous candidiasis produced in prednisolone-treated guinea-pigs, *J Med Vet Mycol*, 32 (1994) 349-359.
- [56] Y. Niwano, A. Seo, K. Kanai, H. Hamaguchi, K. Uchida, H. Yamaguchi, Therapeutic Efficacy of Ianoconazole, a new Imidazole antimycotic agent, for experimental cutaneous candidiasis in guinea-pigs, *Antimicrob Agents Ch*, 38 (1994) 2204-2206.
- [57] A.M. Ben-Josef, J.L. Cutright, E.K. Manavathu, J.D. Sobel, CAN-296-P is effective against cutaneous candidiasis in guinea pigs, *Int J Antimicrob Ag*, 22 (2003) 168-171.
- [58] M. Gupta, S.P. Vyas, Development, characterization and in vivo assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis, *Chem Phys Lipids*, 165 (2012) 454-461.
- [59] T.H. Dai, V.J.B. de Arce, G.P. Tegos, M.R. Hamblin, Blue Dye and Red Light, a dynamic combination for prophylaxis and treatment of cutaneous candida albicans infections in mice, *Antimicrob Agents Ch*, 55 (2011) 5710-5717.