

Université de Montréal

**Développement de nouvelles formulations d'antifongiques et  
évaluation de l'activité sur *Candida spp.* et *Aspergillus spp.***

par  
Valéry AOUN

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la Faculté Pharmacie  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
en Sciences Pharmaceutiques  
option Technologie pharmaceutique

Août 2013

© Valéry Aoun, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée

Développement de nouvelles formulations d'antifongiques et évaluation  
de l'activité sur *Candida spp.* et *Aspergillus spp.*

Présentée par :  
Valéry AOUN

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Prof. François-Xavier Lacasse, Président-rapporteur  
Prof. Patrice Hildgen, Directeur de recherche  
Prof. Grégoire Leclair, Co-directeur de recherche  
Prof. Gaëlle Roullin, membre du jury  
Prof. Patrice Le Pape, Examineur externe

Août 2013

## Résumé

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse de doctorat avaient pour but de mettre au point des nouvelles formulations d'antifongiques sous forme de nanoparticules polymériques (NP) en vue d'améliorer l'efficacité et la spécificité des traitements antifongiques sur des souches sensibles ou résistantes de *Candida spp*, d'*Aspergillus spp* et des souches de *Candida albicans* formant du biofilm.

Dans la première partie de ce travail, nous avons synthétisé et caractérisé un polymère à base de polyester-co-polyéther branché avec du poly(éthylène glycol) (PEG-g-PLA). En plus d'être original et innovant, ce co-polymère a l'avantage d'être non-toxique et de posséder des caractéristiques de libération prolongée. Trois antifongiques couramment utilisés en clinique et présentant une biodisponibilité non optimale ont été choisis, soient deux azolés, le voriconazole (VRZ) et l'itraconazole (ITZ) et un polyène, l'amphotéricine B (AMB). Ces principes actifs (PA), en plus des problèmes d'administration, présentent aussi d'importants problèmes de toxicité. Des NP polymériques encapsulant ces PA ont été préparées par une technique d'émulsion huile-dans-l'eau (H/E) suivie d'évaporation de solvant. Une fois fabriquées, les NP ont été caractérisées et des particules de d'environ 200 nm de diamètre ont été obtenues. Les NP ont été conçues pour avoir une structure cœur/couronne avec un cœur constitué de polymère hydrophobe (PLA) et une couronne hydrophile de PEG. Une faible efficacité de chargement (1,3% m/m) a été obtenue pour la formulation VRZ encapsulé dans des NP (NP/VRZ). Toutefois, la formulation AMB encapsulée dans des NP (NP/AMB) a montré des taux de chargement satisfaisants (25,3% m/m). En effet, le caractère hydrophobe du PLA a assuré une bonne affinité avec les PA hydrophobes, particulièrement l'AMB qui est le plus hydrophobe des agents sélectionnés. Les études de libération contrôlée ont montré un relargage des PA sur plusieurs jours. La formulation NP/AMB a été testée sur un impacteur en cascade, un modèle *in vitro* de poumon et a permis de démontrer le potentiel de cette formulation à être administrée efficacement par voie pulmonaire. En effet, les résultats sur l'impacteur en cascade ont montré que la majorité de la formulation s'est retrouvée à l'étage de collecte correspondant au niveau bronchique, endroit où se situent majoritairement les infections fongiques pulmonaires.

Dans la deuxième partie de ces travaux, nous avons testé les nouvelles formulations d'antifongiques sur des souches planctoniques de *Candida spp.*, d'*Aspergillus spp.* et des souches de *Candida albicans* formant du biofilm selon les procédures standardisées du *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Les souches choisies ont démontré des résistances aux azolés et aux polyènes. Les études d'efficacité *in vitro* ont permis de prouver hors de tout doute que les nouvelles formulations offrent une efficacité nettement améliorée comparée à l'agent antifongique libre.

Pour mettre en lumière si l'amélioration de l'efficacité antifongique était due à une internalisation des NP, nous avons évalué le comportement des NP avec les cellules de champignons. Nous avons procédé à des études qualitatives de microscopie de fluorescence sur des NP marquées avec de la rhodamine (Rh). Tel qu'attendu, les NP ont montré une localisation intracellulaire. Pour exclure la possibilité d'une simple adhésion des NP à la surface des levures, nous avons aussi confirmé leur internalisation en microscopie confocale de fluorescence.

Il est important de noter que peu d'études à ce jour ont mis l'accent sur l'élaboration de nouvelles formulations d'antifongiques à base de polymères non toxiques destinées aux traitements des mycoses, donnant ainsi une grande valeur et originalité aux travaux effectués dans cette thèse. Les résultats probants obtenus ouvrent la voie vers une nouvelle approche pour contourner les problèmes de résistances fongiques, un problème de plus en plus important dans le domaine de l'infectiologie.

**Mots-clés** : nanoparticules polymériques, PEG-g-PLA, antifongiques, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, biofilms, internalisation cellulaire

## Abstract

The work done presented in this thesis was aimed to develop new formulations of antifungal drugs in order to improve the effectiveness and specificity of treatments. The formulations of polymeric NP encapsulated antifungals were tested on sensitive or resistant strains of *Candida spp*, *Aspergillus spp* and strains of *Candida albicans* that are able to develop biofilm structure.

The first part of this work focussed on the synthesis and characterizations of a polyester-co-polyether polymer grafted with poly(ethylene glycol) (PEG-g-PLA). Besides being original and innovative, polymeric nanoparticles composed of PEG-g-PLA co-polymers have been used as drug delivery devices due to their biodegradable and biocompatible nature and controllable release characteristics. Three antifungal drugs (voriconazole, itraconazole and amphotericin B) commonly administered have been selected due to physicochemical properties and pharmacokinetics problems. In fact, these drugs are known to have significant delivery and toxicity issues. Polymeric nanoparticles were prepared by a high pressure homogenization oil-in-water emulsion method. Nanoparticles were designed in order to have an hydrophobic core (PLA) and a hydrophilic corona (PEG). Antifungal drugs were successfully incorporated into nanoparticles with appropriate mean diameters (~ 200 nm). Drug loading efficiency for VRZ was the lowest with 1,3% w/w of loading. A fraction of the VRZ was lost during the manufacturing process because of its solubility in water. However, AMB encapsulated in NP showed better loading efficiency (25,3% w/w). Indeed, the hydrophobic nature of PLA ensured a good affinity with the hydrophobic drugs, particularly for AMB who is the most hydrophobic of the selected drugs. Drug release study from new formulations showed a burst effect during 24 h followed by a prolonged release over several days. Furthermore, new formulation of AMB was tested on a cascade impactor, an *in vitro* lung model and successfully demonstrated the potential of this formulation to be administered effectively by the pulmonary route. Indeed, the results obtained showed that the majority of the formulation was found on the collection stage corresponding to the bronchial region, where is located predominantly pulmonary fungal infections.

The second part of the thesis was aimed at testing the new formulations on planktonic strains of *Candida spp* and *Aspergillus spp*. and biofilm structure of *Candida albicans* according to NCCLS standardized procedures. The selected strains have demonstrated resistance to azoles and polyenes. Studies *in vitro* have proven that the new formulations offer significantly improved effectiveness compared to free antifungal agent.

To evaluate if improved antifungal effectiveness was due to internalization of NP, we evaluated the behavior of NP with fungal cells. We conducted qualitative studies in fluorescence microscopy on NP labeled with rhodamine. As expected, the NP showed intracellular localization. To exclude the possibility of NP absorption on the surface of yeast cells, we also confirmed internalization by confocal fluorescence microscopy.

Noteworthy, only a few studies have focused on the development of new formulations of antifungal drug, giving great value and originality of this work. Encouraging results pave the way to a new approach to overcome fungal resistance issues, a problem more acute in the field of fungal diseases.

**Keywords** : polymeric nanoparticles, PEG-g-PLA, antifungal drugs, *Candida spp*, *Aspergillus spp*, biofilms, cellular internalization

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xviii
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1. Revue de la littérature.....	2
1. Mise en contexte.....	3
2. Anatomie générale du système respiratoire.....	4
2.1. Les voies respiratoires supérieures.....	6
2.2. Les voies respiratoires inférieures.....	7
2.3. La région alvéolaire.....	8
3. Les infections fongiques.....	10
3.1. Biologie et structure cellulaire de <i>Candida albicans</i> .....	10
3.2. Biologie et structure cellulaire du biofilm de <i>Candida albicans</i> .....	13
3.3. Biologie et structure cellulaire d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	15
4. Les traitements conventionnels des candidoses et aspergilloses.....	18
4.1. Les antifongiques.....	18
4.1.1. Les azolés.....	19
4.1.2. Les polyènes.....	23
4.1.2.1. L'amphotéricine B.....	23
4.1.2.2. Propriétés physicochimiques.....	23
4.1.2.3. Mécanisme d'action.....	25
4.1.2.4. Formulation commerciale.....	25
4.2. Les mécanismes de résistance acquise.....	26
4.2.1. Les azolés.....	26
4.2.2. Les polyènes.....	29

5. Les nanoparticules polymériques.....	29
5.1. Polymère utilisé en surface des nanoparticules; Poly(éthylène glycol).....	30
5.2. Polymère utilisé pour le cœur des nanoparticules; Polyesters .....	31
5.3. Les co-polymères .....	32
Chapitre 2. Hypothèses et objectifs .....	34
1. Hypothèses et objectifs généraux.....	35
2. Objectifs spécifiques.....	37
2.1. Mise au point de nouvelles formulations de nanoparticules à base de PEG-g-PLA pour l'administration pulmonaire d'antifongiques .....	37
2.2. Effet de l'activité antifongique de nouvelles formulations d'antifongiques sur des souches résistantes et sensibles de <i>C. albicans</i> ainsi que d' <i>A. fumigatus</i> .....	38
2.3. Études de l'internalisation des nouvelles formulations sur des souches de <i>C. albicans</i> ainsi que <i>A. fumigatus</i> .....	39
Chapitre 3. Mise au point de nouvelles formulations de nanoparticules à base de PEG-g-PLA pour l'administration pulmonaire d'antifongiques .....	40
1. Introduction.....	41
2. Matériel et méthodes.....	44
2.1. Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA .....	44
2.2. Fabrication des NP .....	45
2.3. Caractérisation des NP .....	47
2.3.1. Mesure de la taille des particules et du potentiel zêta.....	47
2.3.2. Microscopie de force atomique (AFM) .....	47
2.3.3. Analyse calorimétrique différentielle (DSC).....	47
2.3.4. Efficacité d'encapsulation (%EE) et efficacité de chargement (%LE).....	48
2.3.5. Étude des profils de relargage <i>in vitro</i> des principes actifs .....	48
2.3.6. Méthodes d'analyse de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).....	49
2.3.7. Étude sur l'impacteur multi-étages en cascade .....	50
3. Résultats et discussion .....	54
3.1. Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA .....	54
3.2. Fabrication et caractérisation des NP .....	56



3.2.1.	Évaluation des propriétés physicochimiques des NP.....	56
3.2.2.	Études des profils de libération.....	63
3.2.3.	Étude des profils de déposition des NP sur un modèle <i>in vitro</i> de poumons; l'impacteur en cascade.....	66
4.	Conclusion.....	68
Chapitre 4. Effet de l'activité des nouvelles formulations d'antifongiques sur des souches résistantes ou sensibles de <i>Candida spp.</i> ainsi que d' <i>Aspergillus spp.</i> .....		
1.	Introduction.....	70
2.	Matériel et méthodes.....	73
2.1.	Paramètres du protocole NCCLS.....	73
2.2.	Origine des souches de référence.....	74
2.3.	Origine des souches cliniques.....	74
2.4.	Description du protocole NCCLS.....	75
2.4.1.	Milieu de culture et préparation de l'inoculum.....	75
2.4.2.	Préparation des gammes de concentrations d'antifongiques.....	77
2.4.3.	Préparation des gammes de concentrations des nouvelles formulations d'antifongiques.....	79
2.4.4.	Préparation de nouvelles formulations pour l'étude préliminaire du rôle du PEG	80
2.4.5.	Lecture des résultats.....	82
2.5.	Description du protocole pour la formation de structure de biofilm de <i>Candida albicans</i> .....	83
3.	Présentation des résultats.....	85
3.1.	Caractérisation des souches.....	85
3.2.	Résultats <i>in vitro</i> de l'activité antifongique sur cellules planctoniques des souches de <i>Candida spp.</i> .....	87
3.3.	Résultats <i>in vitro</i> de l'activité antifongique sur cellules planctoniques des souches d' <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	93
3.4.	Résultats <i>in vitro</i> de l'activité antifongique de différentes formulations pour l'étude préliminaire du rôle du PEG.....	97

3.5. Résultats de sensibilité antifongique sur des structures de biofilms de <i>Candida albicans</i> .....	99
3.6. Discussion de l'activité des nouvelles formulations d'antifongiques sur les souches formant du biofilm .....	104
Chapitre 5. Études de l'internalisation des nouvelles formulations sur des souches de <i>Candida albicans</i> ainsi que <i>Aspergillus nidulans</i> .....	108
1. Introduction .....	109
2. Matériels et méthodes .....	110
2.1. Matériel .....	110
2.2. Matériel biologique .....	110
2.3. Synthèse du polymère PEG-g-PLA avec une sonde fluorescente (rhodamine-azide) .....	110
2.4. Fabrication et caractérisation des NP .....	112
2.5. Études d'internalisation des nouvelles formulations dans des cellules de <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus nidulans</i> .....	113
2.5.1. Microscope à fluorescence .....	113
2.5.2. Microscope confocal à balayage laser .....	114
3. Résultats .....	115
3.1. Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA-Rhodamine .....	115
3.2. Caractérisation des NP .....	118
3.3. Internalisation des NP dans les cellules de <i>Candida albicans</i> ainsi que d' <i>Aspergillus nidulans</i> .....	118
3.3.1. Microscopie de fluorescence « classique » .....	118
3.3.2. Microscopie confocale .....	125
4. Discussion .....	129
Chapitre 6. Discussion générale .....	131
1. Mise au point de nanoparticules à base de PEG-g-PLA pour l'administration d'antifongiques .....	132
2. L'amélioration de l'activité antifongique par la vectorisation .....	137
3. Etude préliminaire du rôle du PEG .....	145
Chapitre 7. Conclusion et perspectives .....	150

Bibliographie..... 155

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classe des antifongiques [41] .....	19
Tableau 2 Biosynthèse de l'ergostérol à partir du lipide squalène. Les flèches rouges représentent le gène sur lequel les azolés peuvent agir [52].....	22
Tableau 3: Nouvelles formulations d'antifongiques.....	46
Tableau 4: Conditions pour la préparation d'un lot de nouvelles formulations de PA.....	46
Tableau 5 : Caractérisation du polymère PEG-g-PLA par GPC, DSC et RMN <sup>1</sup> H.....	56
Tableau 6 : Caractérisation des NP .....	60
Tableau 7 : Paramètres techniques de la méthode du NCCLS M27-A2.....	73
Tableau 8 : Valeur des CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de différents principes actifs après 48 h de traitement, tiré de la ref. [138] .....	75
Tableau 9 Gammes de concentrations des différents antifongiques*.....	78
Tableau 10 : Préparation des gammes de dilution des PA dans une microplaque 96 puits (concentrations finales).....	79
Tableau 11 : Efficacité d'encapsulation des antifongiques et concentration nécessaire (en poids de NP) pour obtenir la solution mère d'antifongique .....	80
Tableau 12 : Différentes formulations pour l'étude du rôle du PEG .....	81
Tableau 13 : Seuils de CMI ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) acceptables des souches contrôles ATCC d'après Barry <i>et al.</i> [140].....	82
Tableau 14 : Seuils d'interprétation clinique pour la méthode du NCCLS M27-A2 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) [141].....	83
Tableau 15 : Gamme de concentrations des différents antifongiques sur les structures de biofilm.....	84
Tableau 16 : Caractérisation des souches de <i>Candida albicans</i> provenant du CHU de Nantes. Données provenant de la réf. [143].....	85
Tableau 17 :Caractérisation des souches d' <i>Aspergillus fumigatus</i> provenant du CHU de Nantes. Données provenant de la ref [143].....	86
Tableau 18 : Caractérisation des souches provenant du LSPQ. Données provenant de la ref [137, 138].....	86

Tableau 19 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ, AMB, NP/VRZ et NP/AMB sur des souches de <i>C. albicans</i> , <i>parapsilosis</i> et <i>krusei</i> après 24 h <sup>a</sup> .....	90
Tableau 20 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de AMB et NP/AMB sur des souches de <i>C. albicans</i> , <i>parapsilosis</i> et <i>krusei</i> après 48 h <sup>a</sup> .....	90
Tableau 21 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ, AmB, NP/VRZ et NP/AmB sur la souche <i>C. albicans</i> LSPQ 5674 après 24 h <sup>a</sup> .....	92
Tableau 22 : MIC50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ, ITZ, AmB, NP/VRZ, NP/ITZ et NP/AmB sur des souches d' <i>A. Fumigatus</i> <sup>a</sup> .....	95
Tableau 23 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ et NP/VRZ sur la souche <i>A. nidulans</i> R153 après 48h <sup>a</sup> .....	95
Tableau 24: Efficacité antifongique des nouvelles formulations <b>NP/VRZ</b> et <b>NP/AMB</b> <sup>1</sup> .....	96
Tableau 25 : CMI50 ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) de différentes formulations sur la souche <i>C. albicans</i> LSPQ 5674 après 24 h de traitement <sup>a</sup> .....	98
Tableau 26 : Caractérisation du polymère Rh-PEG-g-PLA par GPC, DSC et RMN <sup>1</sup> H.....	117
Tableau 27 : Caractérisation des NP .....	118

## Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'appareil respiratoire humain. Adaptée avec permission de la réf. [10]	5
Figure 2 : Structure à droite de l'arbre bronchique suivi des cellules épithéliales à gauche (tailles & épaisseurs) correspondant à chaque niveau pulmonaire. Adaptée avec permission des réf. [14, 15]	8
Figure 3 : Structure d'une alvéole. Coupe transversale d'une alvéole présentant un capillaire, un macrophage alvéolaire, une couche de tensioactif, ainsi que des cellules de type 1 et 2. Adaptée avec la permission de la réf. [16]	10
Figure 4 : Aspect microscopique d'une cellule de <i>Candida albicans</i> [17]	11
Figure 5 : Formes morphologiques de <i>Candida albicans</i> . Le champignon peut se transformer de façon réversible entre la forme levure, pseudohyphe et hyphe. Adaptée avec permission de la réf. [18]	12
Figure 6 : Différents stades de croissance d'une structure de biofilm. Adaptée avec permission de la réf. [33]	14
Figure 7 : Microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm de <i>Candida albicans</i> après 24 h de développement sur un cathéter. (A) Vue intraluminale de la surface du biofilm; (B) Vue en coupe transversale du biofilm. Adaptée avec permission de la réf. [34]	15
Figure 8 : (A) Structure d' <i>Aspergillus</i> ; (B) structure d' <i>Aspergillus fumigatus</i> (ne possède pas de métule)	16
Figure 9 : Cycle de vie d'une infection d' <i>Aspergillus</i> . Adaptée avec permission de la réf. [37]	17
Figure 10 : Structure de différents azolés : (A) voriconazole et (B) itraconazole	20
Figure 11 : Liaison des azolés à l'atome de Fer de l'hème du CYP450. Adaptée avec permission de la réf. [51]	21
Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre AMB et l'ergostérol dans la membrane lipidique. (A) Représentation de la structure de l'AMB. La partie jaune représente la partie hydrophobe et la partie bleue représente la partie hydrophile. (B)	

Représentation de l'arrangement des molécules d'AMB. (C) Représentation de l'arrangement en B dans la membrane lipidique. Formation d'un pore. (D) Orientation moléculaire des molécules d'AMB et du cholestérol lors de la formation du pore. Les lignes pointillées entre les molécules de phospholipides représentent les liaisons de London et Van der Waals. Les lignes raillées représentent les ponts hydrogènes entre AMB et les molécules de cholestérol. Adaptée avec permission de la ref. [58].....	24
Figure 13 Différents mécanismes de résistance des champignons aux azolés. (A) représente la mutation de ERG11; (B) la surexpression des mécanismes d'efflux; (C) la surexpression de ERG11; (D) l'altération au niveau de biosynthèse de l'ergostérol; avec la permission de la réf [59].....	28
Figure 14 Structure du PEG.....	30
Figure 15 : Schéma du D,L-PLA.....	31
Figure 16 : Structure chimique du PEG-g-PLA.....	33
Figure 17 : Schéma de synthèse du PEG-g-PLA effectué par polymérisation par ouverture de cycle.....	44
Figure 18 : Schéma de l'impacteur multi-étages en cascade. Chaque cupule est représentée selon la taille des buses.....	51
Figure 19 : Corrélation <i>in vivo/in vitro</i> entre les niveaux de l'impacteur à cascade et les niveaux du poumon [112].....	52
Figure 20 Structure chimique du polymère PEG-g-PLA.....	54
Figure 21 : Spectre RMN <sup>1</sup> H du polymère 5%PEG-g-PLA dans le CDCl <sub>3</sub> .....	55
Figure 22 : Morphologie de surface de NP encapsulant du VRZ analysée par AFM. (A) représente l'image en mode phase; (B) représente l'image en mode topographique. Le champ de l'image est de 1,5 x 1,5 µm.....	58
Figure 23 : Analyse thermique du VRZ (1), VRZ/NP (2), mélange physique du VRZ et polymère PEG-g-PLA (3) et du polymère seul PEG-g-PLA (4).....	61
Figure 24 : Analyse thermique du ITZ (1), ITZ/NP (2), mélange physique du ITZ et polymère PEG-g-PLA (3) et du polymère seul PEG-g-PLA (4).....	62
Figure 25 Analyse thermique du AMB (1), AMB/NP (2), mélange physique du AMB et polymère PEG-g-PLA (3) et du polymère seul PEG-g-PLA (4).....	62

Figure 26 Profil de libération du VRZ encapsulé (pH 7.4, 37 °C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3).....	65
Figure 27 : Profil de libération de l'ITZ encapsulé (pH 7,4, 37 °C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3).....	65
Figure 28 : Profil de libération de l'AMB encapsulé (pH 7,4, 37 °C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3).....	66
Figure 29 : Pourcentage de déposition en fonction des différents niveaux de l'impacteur en cascade.....	67
Figure 30 : Schéma d'innoculation des levures et ajout d'antifongique selon un gradient de concentration.....	76
Figure 31 : Schéma représentatif sur microplaque 96 puits pour les tests de susceptibilité aux antifongiques. Les puits témoins positifs ne contiennent pas d'antifongique. Les puits témoins négatifs ne contiennent pas de levures. * selon l'expérience, peut être remplacé par NP/ITZ ou NP/AMB. ** selon l'expérience, peut être remplacé par ITZ seul ou AMB seul. ***La quantité de BI-NP de chaque puit des colonnes 3 à 12 correspond à la même quantité en poids de NP dans NP/VRZ pour chaque puit des colonnes 3 à 12.....	77
Figure 32 : Graphique de la viabilité cellulaire sur la souche ATCC 22019 après 48 h de traitement de AMB libre en solution, NP/AMB, BI-NP, ainsi que de AMB dans les NP sans la contribution des NP.....	88
Figure 33 : Graphique de la viabilité cellulaire sur la souche CAAL 76 après 24 h de traitement de VRZ libre en solution, NP/VRZ, BI-NP, ainsi que de VRZ dans les NP sans la contribution des NP.....	89
Figure 34 : Courbes de viabilité cellulaire de différentes souches de <i>Candida spp.</i> formant du biofilm après 24 h de traitement avec du VRZ et NP/VRZ. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3).....	102
Figure 35 : Courbes de viabilité cellulaire de différentes souches de <i>Candida spp</i> formant du biofilm après 24 h de traitement avec de l' AMB et NP/AMB. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3).....	103
Figure 36 : Aperçu général des mécanismes de résistance des biofilms associés au <i>C. albicans</i> , mais qui sont susceptibles d'être communs à d'autres champignons. Cette figure illustre la	



densité et la complexité du biofilm de <i>C. albicans</i> , avec différents morphotypes présents entourés par MEC. Les flèches représentent les différents facteurs qui déterminent la résistance antifongique dans le biofilm[159].....	105
Figure 37 :Structure chimique de la sonde fluorescente; PEG-Rhodamine-azide (PEG MM 132).....	111
Figure 38 Schéma de synthèse du polymère fluorescent. X représente la sonde fluorescente représentée à la figure 37 .....	112
Figure 39 :Structure chimique du polymère fluorescent.....	115
Figure 40 :Spectre RMN <sup>1</sup> H du polymère fluorescent Rh-PEG-g-PLA dans le CDCl <sub>3</sub> .....	116
Figure 41 : Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de <b>Rh-NP vides</b> après 2h de traitement sur des cellules de <i>Candida albicans</i> souche LSPQ 5674. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC.....	120
Figure 42 : Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de <b>Rh-NP/VRZ</b> (NP fluorescentes encapsulées de VRZ) après 2h de traitement sur des cellules de <i>Candida albicans</i> souche LSPQ 5674. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC.....	121
Figure 43 : Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de <b>Rh-NP/AMB</b> (NP fluorescentes encapsulées de AMB) après 2h de traitement sur des cellules de <i>Candida albicans</i> souche LSPQ 5674. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC.....	122
Figure 44: Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de <b>Rh-NP/AMB</b> (NP fluorescentes encapsulées de AMB) après 2h de traitement sur des cellules d' <i>Aspergillus nidulans</i> souche R153. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC .....	124

Figure 45 : Images de microscopie confocale à grossissement 100X sur une cellule unique sous forme hyphe de *Candida albicans* souche LSPQ 5674 traitée pendant 2 h avec **Rh-NP vides**. La cellule a été cultivée préalablement pendant 24 h. .... 126

Figure 46: Images de microscopie confocale à grossissement 100X sur 2 cellules différentes (A et B) *Candida albicans* souche LSPQ 5674 en forme levure traitées pendant 2 h avec **Rh-NP/VRZ** (NP fluorescentes encapsulées de VRZ). Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h ..... 127

Figure 47 : Images de microscopie confocale à grossissement 100X de 3 cellules différentes de *Candida albicans* souche LSPQ 5674. Figure A et B représente la forme levure, figure C représente la forme hyphe. Les cellules ont été traitées pendant 2 h avec **Rh-NP/AMB** (NP fluorescentes encapsulées de AMB) et cultivées préalablement pendant 24 h. .... 128

Figure 48 : Vue schématique du devenir des NP dans le poumon..... 136

Figure 49 : Schéma représentant d'une NP cœur/couronne. Le cœur est hydrophobe principalement composé de PLA et la couronne est hydrophile composée de PEG. À noter que le schéma n'est pas à l'échelle. Le PEG fait quelques nm de longueur comparativement à la particule qui fait ~150 nm de diamètre..... 139

Figure 50 : Schéma représentant à droite (A) l'action du VRZ en solution dans une cellule résistante aux azolés, et à gauche (B) l'action antifongique de la formulation de NP/VRZ. Le mécanisme de résistance est **la surexpression des pompes d'efflux**..... 141

Figure 51 : Schéma représentant à droite (A) l'action du VRZ en solution dans une cellule résistante aux azolés et à gauche (B) l'action antifongique de la formulation de NP/VRZ. Le mécanisme de résistance **est la mutation des gènes codant l'enzyme** menant à la synthèse de l'ergostérol..... 142

Figure 52 : Schéma représentant à gauche (A) l'action antifongique de la formulation de NP/AMB après **24 h de traitement** et à droite (B) l'action antifongique de la formulation de NP/AMB après **48 h de traitement**..... 144

Figure 53 : Représentation schématique des interactions possibles des pompes d'efflux avec le PEG dans (A) une cellule Caco-2 (B) une cellule de champignon..... 146

Figure 54: Schéma représentatif des mécanismes possibles de relargage du PA du nanovecteur dans le champignon. A: le PA est relargué de la NP tout près de la membrane plasmique. B: la NP est internalisée par endocytose. C: Depuis l'endosome, le PA est relargué dans

le cytosol. D: la NP vient bloquer la pompe d'efflux et libère le PA dans le cytosol. Les flèches noires pleines représentent la libération du PA ..... 148

## Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFM	Microscope à force atomique, <i>Atomic force microscopy</i>
AMB	Amphotéricine B
ATP	Adénosine triphosphate
BI NP	Nanoparticules vides
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
CHU	Centre hospitalier universitaire
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DCM	Dichlorométhane
DLS	Diffraction laser, <i>Dynamic light scattering</i>
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage, <i>Differential scanning calorimetry</i>
É.T.	Écart-type
EE	Efficacité d'encapsulation
MEC	Matrice extracellulaire
GPC	Chromatographie d'exclusion stérique, <i>Gel permeation chromatography</i>
H/E	Huile dans l'eau
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance, <i>high performance liquid chromatographie</i>
IP	Indice de polydispersité
I.V.	intraveineux
ITZ	Itraconazole
kDa	Kilo Dalton
LSPQ	Laboratoire de santé publique du Québec
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MEB	Microscope électronique à balayage
Mn	Masse molaire en nombre, <i>Number-average molecular weight</i>
MPS	Système des phagocytes mononucléés, <i>Mononuclear phagocytic system</i>

Mw	Masse molaire en poids, <i>Weight-average molecular weight</i>
NP	Nanoparticules
NP/VRZ	Voriconazole encapsulé dans des nanoparticules
NP/ITZ	Itraconazole encapsulé dans des nanoparticules
NP/AMB	Amphotéricine B encapsulée dans des nanoparticules
RMN	Résonance magnétique nucléaire
PA	Principe actif
PBS	tampon phosphate salin, <i>phosphate-buffered saline</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PEG-g-PLA	Poly(éthylène glycol)-greffé-poly(D,L lactide)
P-gp	P-glycoprotéine
PLA	Poly lactide
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
PLLA	Poly(L-lactide)
PM	Poids moléculaire
PVA	Polyvinyl alcool
SEM	Microscopie électronique à balayage, <i>Scanning electron microscope</i>
TGI	Tractus gastro-intestinal
Tg	Température de transition vitreuse
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VRZ	Voriconazole

*À mes parents*

## Remerciements

Le long cheminement des études de 3<sup>e</sup> cycle ne s'effectue pas sans l'aide et le support de personnes indispensables que je tiens sincèrement à remercier.

Je voudrais, en premier lieu, remercier mon directeur de recherche, M. Hildgen, de m'avoir accueillie au sein de son groupe de recherche. J'ai eu la chance et le privilège d'avoir un professeur qui a toujours su valoriser mon travail et me donner confiance et de cela, j'en suis profondément reconnaissante. Votre rigueur m'a fait développer mon sens critique que j'applique maintenant dans toutes les sphères de ma vie. Ce fut un réel plaisir d'être sous votre direction. Un grand merci pour votre disponibilité en cette fin de parcours, la rédaction n'a pas été facile, mais votre support et vos conseils m'ont grandement aidée.

J'aimerais aussi remercier mon co-directeur Grégoire Leclair de toujours être disponible et de prendre le temps de répondre à mes questions, de m'aider dans la rédaction des articles et de m'avoir fait confiance comme monitrice des cours de laboratoire.

J'aimerais par ailleurs remercier les membres du jury, Pr. François-Xavier Lacasse, Pr. Gaëlle Roullin ainsi que Pr. Patrice Le Pape d'avoir accepté de réviser le contenu de cette thèse.

Un remerciement spécial à Jean-Michel, pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues, pour l'aide et les commentaires (mais surtout le temps) apportés dans les révisions d'articles, abstracts, posters, séminaires, pré-doc, rédaction de thèse, et surtout pour l'écoute lors de séances de défoulement !... tu as été de bons conseils et j'en suis sincèrement reconnaissante. Je te souhaite bon courage dans la fin de ton doctorat.

Merci à mes collègues du labo Hildgen, Mohamed, Sherief, Igor. Merci pour votre encouragement continu et les discussions scientifiques que nous avons eues. C'a été un réel plaisir de vous côtoyer. Je vous souhaite bonne chance dans la continuité de vos carrières respectives.

Sincères remerciements au groupe du Pr Patrice Le Pape de la faculté de Pharmacie de Nantes. Vous m'avez accueillie dans votre groupe avec enthousiasme et permis d'en connaître

un peu plus sur le domaine de la mycologie et parasitologie (et de votre beau coin de pays !). Ce fut une expérience enrichissante et mémorable tant sur le plan professionnel que personnel.

Finalement, ce doctorat ne peut se faire sans le support indéfectible de la famille. Je remercie mes parents de m'avoir supportée et crue en moi. Je les remercie pour leur patience dans les moments difficiles, où la recherche et la rédaction de la thèse provoquaient mes changements d'humeur. Merci de m'avoir donné l'opportunité et la chance de faire des études de 3<sup>e</sup> cycle. Mom, je te le dis tous les jours, merci de toujours être là pour m'écouter et m'encourager. Tu es mon inspiration. Sans oublier, bien sûr, Dad. Je te remercie pour l'aide que tu m'as apportée durant ces cinq années. Ta persévérance et ton attitude acharnée dans tout ce que tu entreprends sont une source de motivation pour moi. Je vous aime les deux et suis infiniment reconnaissante.



*Qu'est-ce qu'une idée ?  
C'est une image qui se peint dans mon cerveau  
- Voltaire*

## **Chapitre 1. Revue de la littérature**

## 1. Mise en contexte

L'administration de médicaments par la voie pulmonaire consiste à administrer un principe actif sous forme liquide ou solide dans l'appareil respiratoire par inhalation ou par nébulisation. Depuis plusieurs décennies, l'administration pulmonaire de médicaments a fait ses preuves que ce soit pour un traitement local ou pour une administration systémique [1, 2].

L'administration de médicaments par voie pulmonaire est une approche thérapeutique efficace et non invasive. Cette voie, contrairement à la voie orale, permet d'éviter le métabolisme du premier passage hépatique. Pour le traitement de maladies respiratoires telles que l'asthme, la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), la mucoviscidose et les infections pulmonaires, l'administration directe du médicament au site d'action permet une plus grande concentration locale du principe actif [3]. Elle permet aussi un effet pharmacologique plus rapide, une exposition plus faible (comparativement à l'administration systémique) et par conséquent une réduction des effets secondaires [2, 4, 5].

Quant à l'administration pulmonaire destinée à l'absorption systémique, elle concerne surtout la livraison d'agents anesthésiques généraux. Encore aujourd'hui l'utilisation de la voie pulmonaire pour d'autres indications que celles citées plus haut reste rare [2, 4].

Même si le poumon présente des caractéristiques physiologiques propices à une bonne absorption des médicaments, telles qu'une grande surface d'absorption au niveau des alvéoles, une excellente perfusion pulmonaire, et une barrière air-sang très mince, seules quelques études ont été publiées [6, 7]. Pourtant, cette voie présente une alternative intéressante à l'administration parentérale ou orale (pour les médicaments faiblement absorbables). La cinétique d'absorption des médicaments dans le poumon reste aussi encore mal étudiée et presque aucun produit n'a encore été commercialisé. On peut toutefois citer Pfizer qui tenta, sans succès, une percée aux États-Unis avec Exubéra, une insuline destinée à l'inhalation, de septembre 2006 à octobre 2007 [8]. Selon Pfizer, le produit a été retiré dû à un manque de rentabilité. En effet, les professionnels de la santé trouvaient qu'il était difficile d'utiliser le

produit. L'entreprise a aussi eu de la difficulté à obtenir une couverture d'assurance semblable aux autres formes d'insuline [8].

Malgré les avantages de l'administration pulmonaire, les médicaments ou les formulations améliorées de principes actifs doivent surmonter plusieurs obstacles, tels que la clairance mucociliaire, les sécrétions respiratoires (mucus et liquide alvéolaire), une trajectoire tortueuse dans les voies respiratoires et l'élimination par les cellules macrophages [4, 5, 9].

Pour développer des formulations efficaces, il est important de comprendre les propriétés anatomiques et physiologiques des voies respiratoires. Dans cette introduction, nous allons d'abord discuter brièvement de l'anatomie et de la physiologie du poumon. Ensuite, nous allons discuter des différents types d'infections pulmonaires possibles et des traitements conventionnels disponibles. Nous élaborerons sur des nouveaux traitements innovateurs c'est-à-dire l'utilisation de nanotransporteurs. Nous discuterons des mécanismes de déposition des nanovecteurs, des voies possibles d'internalisation des nanovecteurs, l'impact du mucus sur l'administration des nanovecteurs, des propriétés physico-chimiques et enfin quelques exemples de nanovecteurs actuellement à l'étude pour l'administration pulmonaire.

## **2. Anatomie générale du système respiratoire**

Le système respiratoire est un ensemble d'organes pouvant être divisé en trois parties; les voies respiratoires supérieures, les voies aériennes trachéobronchiques et finalement la région alvéolaire. Les voies respiratoires supérieures comprennent le nez, la gorge, le pharynx et le larynx. Quant aux voies aériennes trachéobronchiques, elles s'étendent de la partie supérieure de la trachée jusqu'aux bronchioles terminales. Enfin, la région alvéolaire s'étend des bronchioles jusqu'aux alvéoles (figure 1).

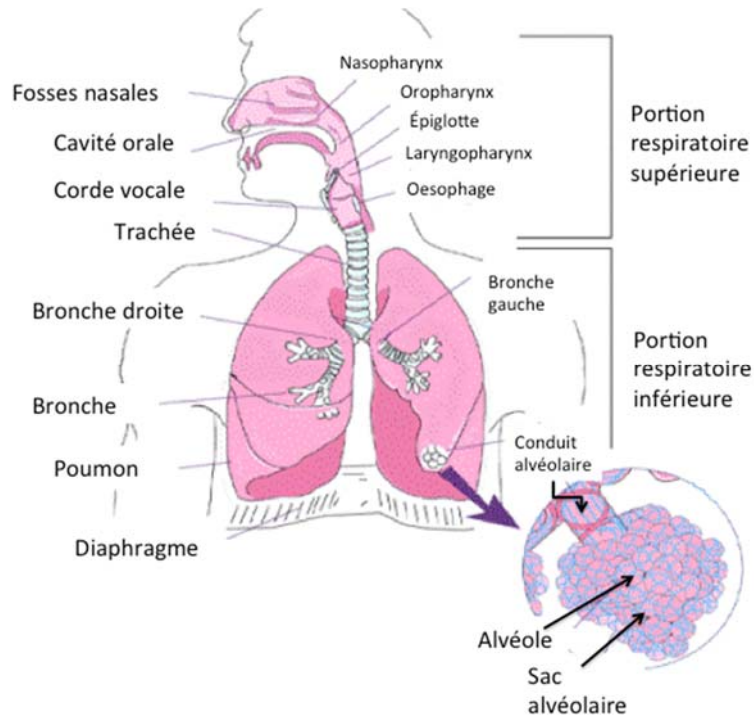


Figure 1 : Anatomie de l'appareil respiratoire humain. Adaptée avec permission de la réf. [10]

Les poumons contiennent environ  $2 \text{ à } 6 \times 10^8$  cellules, fournissant une surface disponible pour les échanges gazeux d'environ  $100 \text{ m}^2$  chez l'homme. Lors de l'inspiration, l'oxygène présent dans l'air sera introduit dans les poumons, traversera l'arbre bronchique puis arrivera aux cellules alvéolaires. Il y aura échanges gazeux par diffusion à travers la mince barrière alvéolocapillaire séparant le flot sanguin de l'atmosphère. Lors de l'expiration, le dioxyde de carbone diffusera par le chemin inverse pour être éliminé de l'organisme.

Ainsi, l'anatomie de chaque région des voies respiratoires se diversifie et correspond à des fonctions bien particulières que nous détaillerons de façon non exhaustive dans les prochaines sections.

## 2.1. Les voies respiratoires supérieures

Tel que mentionné plus haut, les voies respiratoires supérieures se composent du nez, de la bouche, du nasopharynx, de l'oropharynx et du larynx. Ces organes ont plusieurs fonctions telles que la filtration, le réchauffement de l'air inspiré en plus de procurer des sensations olfactives.

La fosse nasale a une surface transversale d'environ  $500 \text{ mm}^2$  qui diminue jusqu'à atteindre  $30 \text{ mm}^2$  pour chaque conduit nasal.

L'épithélium du nez se compose en grande partie de cellules cylindriques ciliées épithéliales contenant des glandes sécrétant du mucus. Par contre, les cordes vocales, l'épiglotte, l'oropharynx, les aires olfactives, ainsi que l'espace entre les narines ne contiennent pas de cellules épithéliales ciliées. Le mucus, contenant des protéines antimicrobiennes tel que lactoferrine et lactoperoxydase, a pour fonction de tapisser l'épithélium des fosses nasales permettant d'humidifier l'air inspiré ainsi que d'emprisonner des particules étrangères indésirables [11, 12]. Après être passé par les fosses nasales, le naso et l'oropharynx, l'air passera par le dernier organe de la partie supérieure, soit le larynx. La structure des voies aériennes supérieures a une géométrie tortueuse. Cette tortuosité a pour conséquence de faire diminuer radicalement le débit de l'air inspiré. Ainsi, la vitesse linéaire de l'air inspiré peut varier considérablement. La tortuosité des voies respiratoires n'est pas favorable à l'inhalation de particules étrangères et micro-organismes. Pour un débit inspiratoire normal de  $500 \text{ mL.s}^{-1}$ , la vitesse moyenne à travers les voies respiratoires supérieures est d'environ  $200 \text{ cm.s}^{-1}$ . Ceci engendre aussi une complication au niveau de l'entrée des médicaments dans les voies respiratoires inférieures [4].

## 2.2. Les voies respiratoires inférieures

Les voies respiratoires inférieures sont composées de la trachée, des bronches ainsi que des bronchioles. Les voies respiratoires inférieures forment une structure essentiellement dichotomique asymétrique. Les bronches principales naissant de la bifurcation trachéale pénètrent dans le hile des poumons et, à l'intérieur de ceux-ci, vont se diviser systématiquement pour former l'arbre bronchique [13]. Les bronches principales donneront successivement les bronches secondaires, tertiaires, les bronchioles terminales et respiratoires. Il peut y avoir entre 8 et 32 niveaux de ramifications entre la trachée et les bronchioles (figure 2).

La paroi des bronches est composée d'une couche externe de muscles lisses et de cartilage recouverte d'un épithélium pseudostratifié prismatique cilié. Sous l'épithélium, il existe une sous-muqueuse contenant la vascularisation bronchique, les nerfs, et les unités sécrétrices des glandes muqueuses et séreuses. Quant à la *lamina propria*, une couche de tissu conjonctif, elle contient également des réseaux nerveux et vasculaires ainsi que des lymphocytes.

L'épithélium bronchique se compose de cellules cylindriques ciliées pseudostratifiées et de cellules caliciformes sécrétrices de mucus. La proportion de cellules caliciformes diminue vers les bronchioles distales. En plus des cellules ciliées et des cellules caliciformes, l'épithélium bronchique contient aussi des cellules basales, des glandes muqueuses et séreuses. Au niveau des bronchioles terminales, les cellules caliciformes sont remplacées par d'autres cellules appelées cellules de Clara. Le rôle des cellules de Clara n'a pas été complètement élucidé, mais la présence de granules sécrétoires suggèrent qu'elles peuvent contribuer à la formation de la couche de tensioactif alvéolaire.

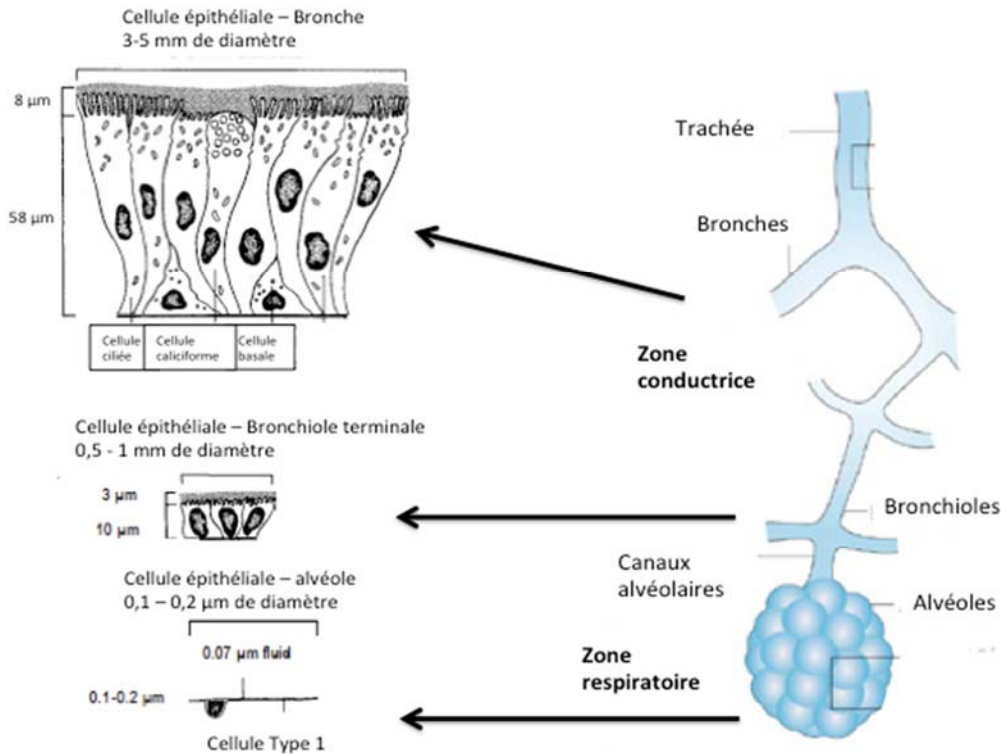


Figure 2 : Structure à droite de l'arbre bronchique suivi des cellules épithéliales à gauche (tailles & épaisseurs) correspondant à chaque niveau pulmonaire. Adaptée avec permission des réf. [14, 15].

### 2.3. La région alvéolaire

Tel que stipulé dans la section précédente, les bronchioles terminales conduiront vers les bronchioles respiratoires. Chaque bronchiole respiratoire donne naissance à canaux alvéolaires (variant de 2 à 11 canaux alvéolaires); ceux-ci donneront naissance à 5 ou 6 sacs alvéolaires remplis d'alvéoles. L'alvéole est l'unité structurelle de base du poumon, le siège des échanges gazeux. La surface alvéolaire exposée est normalement couverte par un film de tensioactif. Ils ont une tendance innée à s'effondrer du fait de leur forme en bulle et de leur grande courbure. Les phospholipides et les pores aident à égaliser les tensions superficielles et empêchent l'effondrement. Au niveau physiologique (figure 3), les cellules épithéliales des



alvéoles sont appelées pneumocytes. Elles couvrent l'intérieur des alvéoles et contribuent à leur fonction. Il existe principalement deux types de pneumocytes. Les pneumocytes de type I sont responsables des échanges gazeux (diffusion de l'oxygène et du dioxyde de carbone). Ce sont des cellules fragiles, relativement minces (environ 5  $\mu\text{m}$ ) et elles se dégradent rapidement suite à l'entrée de particules exogènes toxiques (bactéries, virus, champignons). De plus, elles sont difficiles à régénérer. Une seule cellule peut couvrir une surface de 400  $\mu\text{m}^2$ . Les pneumocytes de type I sont étroitement juxtaposés aux capillaires et ne sont séparés de ceux-ci que par la membrane basale, ce qui permet la diffusion des gaz respiratoires [13]. Les pneumocytes de type II (ou pneumocytes granuleux, et les grandes cellules alvéolaires) ont la particularité d'être sous forme de cube ou arrondi. Leur cytoplasme est riche en organites, un signe de métabolisme actif, ce que confirme un réticulum endoplasmique et un appareil de Golgi surdéveloppés. Ces cellules sont caractérisées par des organelles particulières, les corps lamellaires, sécrétant le surfactant pulmonaire. La quantité de cellules de type II est supérieure au nombre de cellules de type I. Il y a 6-7 cellules de type II par alvéole. Les pneumocytes de type II sont considérés comme essentiels à la régénération cellulaire après des dommages causés par des virus ou des agents chimiques [2, 13]. Pour régénérer les pneumocytes de type I, les pneumocytes de type II vont se diviser, pour ensuite se différencier en perdant leurs corps lamellaires et finalement s'aplatir. Les cellules épithéliales alvéolaires sont reliées par des jonctions étanches qui empêchent la fuite de fluide dans les alvéoles. L'épithélium est comme un tamis avec une taille de pores comprise entre 0,5 et 0,6 nm. En plus de ces cellules épithéliales, il faut noter l'existence de macrophages alvéolaires permettant la phagocytose de corps étrangers qui n'ont pas pu être piégés et éliminés par le mucus dans l'arbre bronchique.

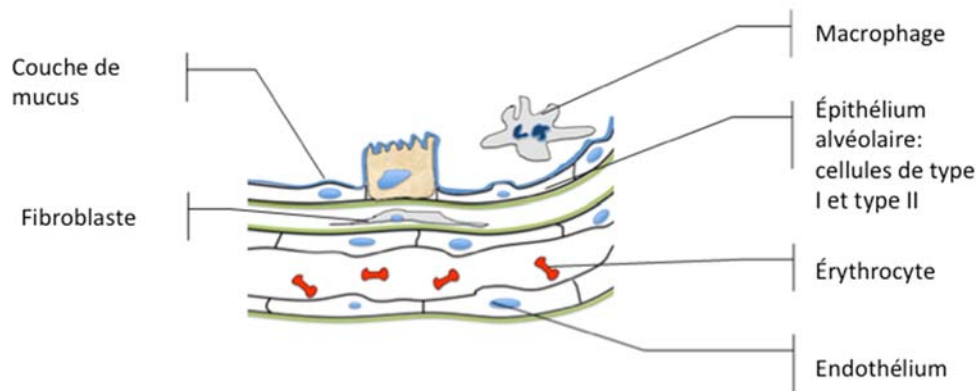


Figure 3 : Structure d'une alvéole. Coupe transversale d'une alvéole présentant un capillaire, un macrophage alvéolaire, une couche de tensioactif, ainsi que des cellules de type 1 et 2. Adaptée avec la permission de la réf.[16]

### 3. Les infections fongiques

Le poumon est un lieu d'échange exposé entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. À tout moment, les poumons sont soumis aux agressions venues de l'extérieur (produits toxiques, particules, bactéries, champignons notamment). Parmi ces types d'agression, les infections dues aux champignons affectent particulièrement le fonctionnement normal du système respiratoire. Parmi les nombreuses espèces qui peuvent poser problème, le *Candida* et l'*Aspergillus* peuvent engendrer d'importantes complications. Dans les sections suivantes, ces 2 types de champignons seront décrits.

#### 3.1. Biologie et structure cellulaire de *Candida albicans*

Le *Candida* est un genre de levures de la division des ascomycètes et dont l'espèce la plus importante est *Candida albicans*. En effet, *C. albicans*, champignon opportuniste, colonise plus de la moitié de la population sans pour autant être infectieux. Par exemple, le *C. albicans* peut se retrouver dans les muqueuses de la bouche ou de l'oesophage (flore commensale) sans créer de manifestations cliniques. Par contre, dans certains cas, il peut devenir pathologique et provoquer des mycoses chez l'humain. Les patients à risque sont

surtout les individus immunodéprimés, les patients traités par chimiothérapie, souffrant de HIV, de leucémie ou les sujets ayant reçu des traitements antibiotiques à large spectre.

Le *C. albicans* est une cellule eucaryote, qui contient un noyau, une membrane plasmique ainsi qu'une paroi cellulaire (double membrane), des chromosomes, des mitochondries et des inclusions lipidiques (figure 4).

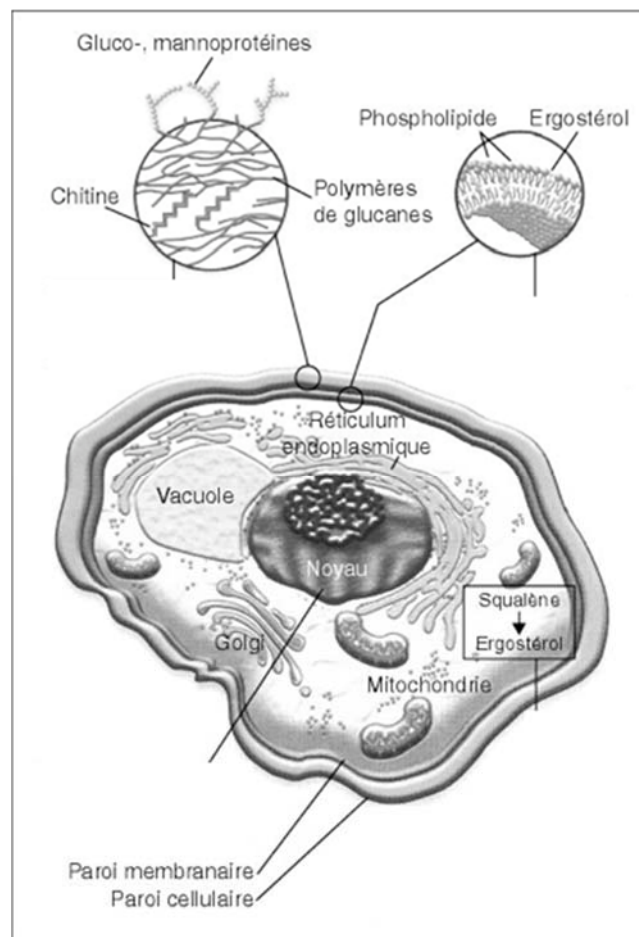


Figure 4 : Aspect microscopique d'une cellule de *Candida albicans* Adaptée avec la permission de la réf. [17]

Le *Candida* a la possibilité de se développer soit sous forme de levure unicellulaire bourgeonnante, soit de s'organiser sous forme filamenteuse formant des hyphes ou des pseudohyphes (figure 5).

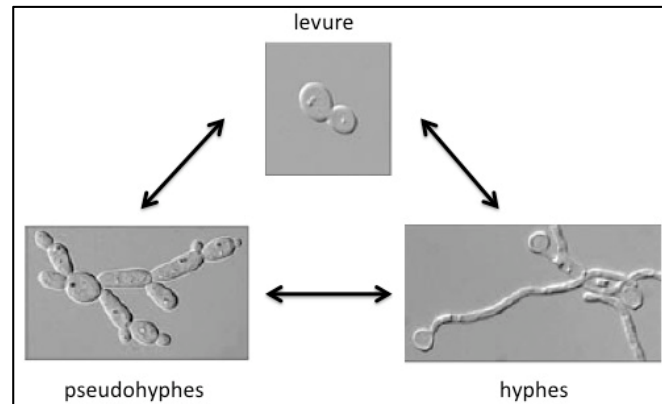


Figure 5 : Formes morphologiques de *Candida albicans*. Le champignon peut se transformer de façon réversible entre la forme levure, pseudohyphe et hyphe. Adaptée avec permission de la réf. [18]

La paroi de la cellule de *C. albicans* contient quatre classes de macromolécules polysaccharidiques : des mannoprotéines, du  $\beta$ -(1,6)-Glucan, du  $\beta$ -(1,3)-Glucan ainsi que de la chitine disposée en plusieurs couches stratifiées (entre 4 et 8 couches). La membrane plasmique intérieure est de l'ordre de 100 nm d'épaisseur tandis que la paroi extérieure principalement formée de protéines est de l'ordre de 180 nm d'épaisseur. La paroi cellulaire est une structure importante et très étudiée étant donné qu'elle protège le champignon des diverses agressions extérieures [19-21].

Les levures du type *Candida* peuvent provoquer plusieurs types d'infections. Les infections de la peau et des muqueuses sont dites des candidoses superficielles. Elles peuvent être localisées au niveau du tube digestif, cutané ou génital.

Le *Candida* peut aussi provoquer des candidoses invasives. Cela se produit lorsque les levures atteignent les vaisseaux sanguins. Les candidémies sont rares chez les personnes sans

facteur de risque. On retrouve plutôt ces infections chez les patients hospitalisés, immunodéprimés ou les patients neutropéniques. Finalement, il est possible de voir apparaître des infections pulmonaires à *Candida*. Il est fréquent d'apercevoir chez les patients immunodéprimés ou hospitalisés une dissémination des levures de *Candida* du tractus gastro-intestinal vers les poumons [22].

### **3.2. Biologie et structure cellulaire du biofilm de *Candida albicans***

Les biofilms sont des structures très organisées de microorganismes (généralement bactéries ou champignons) attachés les uns aux autres et encastrés dans une matrice polymérique extracellulaire ayant une épaisseur variant entre 50 et 350  $\mu\text{m}$  [23]. On peut retrouver les structures de biofilms un peu partout dans l'environnement ainsi qu'à l'intérieur du corps humain sur des cathéters, des prothèses ou encore sur la paroi des vaisseaux sanguins. Les biofilms fongiques ont attiré beaucoup d'attention ces dernières années étant donné qu'ils représentent d'importants problèmes cliniques car résistants à la plupart des traitements antifongiques. À ce jour, très peu de médicaments ont démontré une efficacité antifongique significative contre les structures de biofilms. Les patients hospitalisés et immunodéprimés sont généralement les plus à risque de développer des biofilms fongiques. Afin d'obtenir une réponse thérapeutique, il n'est pas rare de donner aux patients des doses d'antifongiques supérieures aux doses normalement administrées engendrant d'importants effets secondaires. Ces situations créent des résistances conduisant souvent à l'échec thérapeutique des traitements antifongiques disponibles [24-29].

Le biofilm ne s'installe pas sur les cathéters ou les parois des vaisseaux sanguins de façon instantanée. Le développement du biofilm est un phénomène complexe. Des études de microscopie ont révélées que la formation du biofilm se faisait selon trois phases de développement : la phase initiale (0 à 11 heures), la phase intermédiaire (12 à 30 heures) et la maturation (31 à 72 heures) [30]. Ces phases de développement sont présentées à la figure 6. Dans un premier temps, les blastopores (cellules fongiques bourgeonnantes) adhéreront à une surface pour ensuite bourgeonner et créer des microcolonies (détectées entre la 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> heure). Ensuite, entre la 4<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> heure, les pseudohyphes et les hyphes apparaîtront. Les microcolonies

seront ensuite rattachées aux pseudohyphes et hyphes créant ainsi une monocouche confluyente (phase intermédiaire). Les cellules bourgeonnantes formeront la couche basale du biofilm tandis que les pseudo hyphes et hyphes (cellules filamenteuses) formeront le corps du biofilm. Lors de la phase intermédiaire, il y aura le développement d'un film opaque composé de matériel extracellulaire recouvrant les microcolonies fongiques. Puis, lors de la phase de maturation, la quantité de matrice extracellulaire augmentera considérablement en fonction du temps jusqu'à ce que le biofilm devienne mature (figure 7). Des études récentes ont montré que la matrice extracellulaire est composée de polysaccharides, de protéines, de chitines, d'ADN et de  $\beta$ -1,3 glucan carbohydrates. Ces composants couvrent le biofilm et agissent comme une barrière protectrice en empêchant la pénétration de molécules toxiques. D'un autre côté, cette structure organisée permet la diffusion des nutriments et l'expulsion de déchets. Des auteurs ont déjà démontré que le biofilm bactérien contient des canaux aqueux et des milieux aqueux. Ainsi, quelques auteurs suspectent la même chose pour le biofilm fongique par analogie aux biofilms bactériens [30-32].

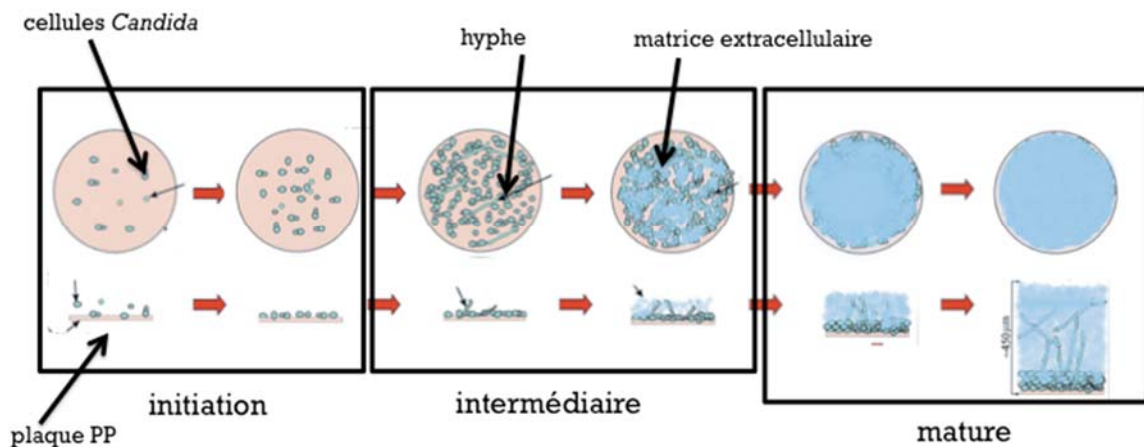


Figure 6 : Différents stades de croissance d'une structure de biofilm. Adaptée avec permission de la réf. [33]

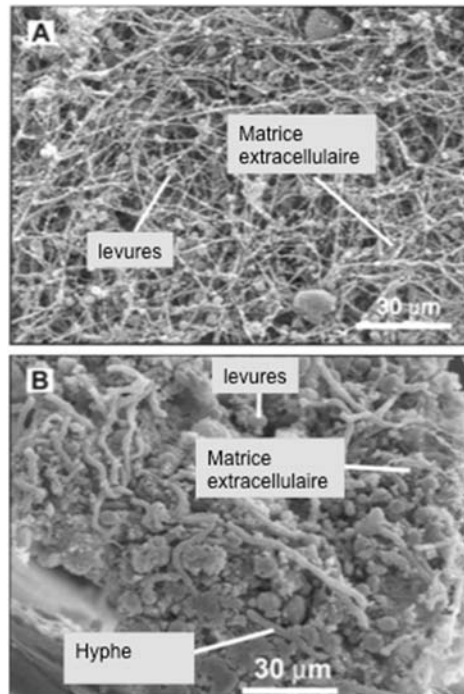


Figure 7 : Microscopie électronique à balayage (MEB) d'un biofilm de *Candida albicans* après 24 h de développement sur un cathéter. (A) Vue intraluminale de la surface du biofilm; (B) Vue en coupe transversale du biofilm. Adaptée avec permission de la réf. [34]

### 3.3. Biologie et structure cellulaire d'*Aspergillus fumigatus*

L'*Aspergillus* est un champignon filamenteux (moisissure) que l'on retrouve, entre autre dans l'air ambiant et dont les spores sont véhiculées par l'air et peuvent être inhalées très facilement. Gots *et al.* ont rapporté que les taux de colonies doivent être inférieurs à 1252 UFC/m<sup>3</sup> à l'intérieur des habitations pour qu'il n'y ait pas d'impact sur la santé [35]. Totalemment inoffensif pour la majorité de la population, il peut cependant provoquer différentes formes d'infections (par exemple des aspergilloses pulmonaires) si inhalé en trop grande quantité par des personnes présentant des facteurs de risque. Les patients les plus à risque sont surtout ceux présentant un système immunitaire faible, ceux atteints d'asthme, ou de mucoviscidose, de bronchopneumopathie chronique obstructive ou d'un cancer du poumon.

Parmi les espèces pathogènes d'*Aspergillus*, l'*Aspergillus fumigatus* est l'espèce majoritairement responsable des infections sévères chez l'Homme (figure 8). En effet, cette espèce est responsable de plus de 80% des aspergilloses humaines. La gravité et l'augmentation de l'incidence des aspergilloses requièrent une meilleure compréhension des interactions entre l'hôte et les champignons.

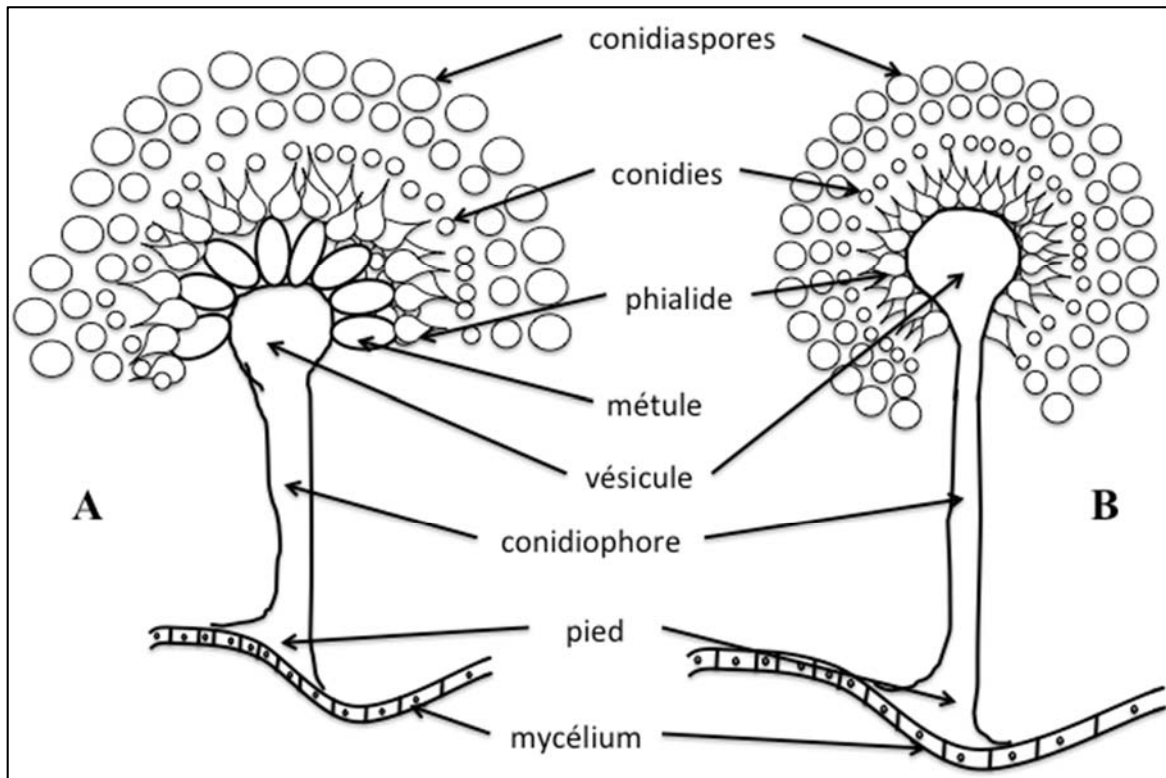


Figure 8 : (A) Structure d'*Aspergillus* ; (B) structure d'*Aspergillus fumigatus* (ne possède pas de métule)

À l'examen microscopique, l'*Aspergillus* est reconnaissable par la présence d'hyphes, où poussera un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule. La vésicule est garnie de métules et de phialides produisant un chapelet de conidies sèches et pulvérulentes (figure 8). Toutefois, l'espèce *Aspergillus fumigatus* ne contient pas de métule. Le cycle de vie de l'*Aspergillus* commence avec la production de conidies (spores asexuées) se propageant facilement dans l'air ambiant (Figure 9) [36]. C'est donc par



l'inhalation que les spores entreront dans l'organisme. L'absorption de conidies par une hôte sensible est habituellement le premier événement d'une aspergillose. Ensuite, les spores se déposeront dans les bronchioles ou dans la région alvéolaire.

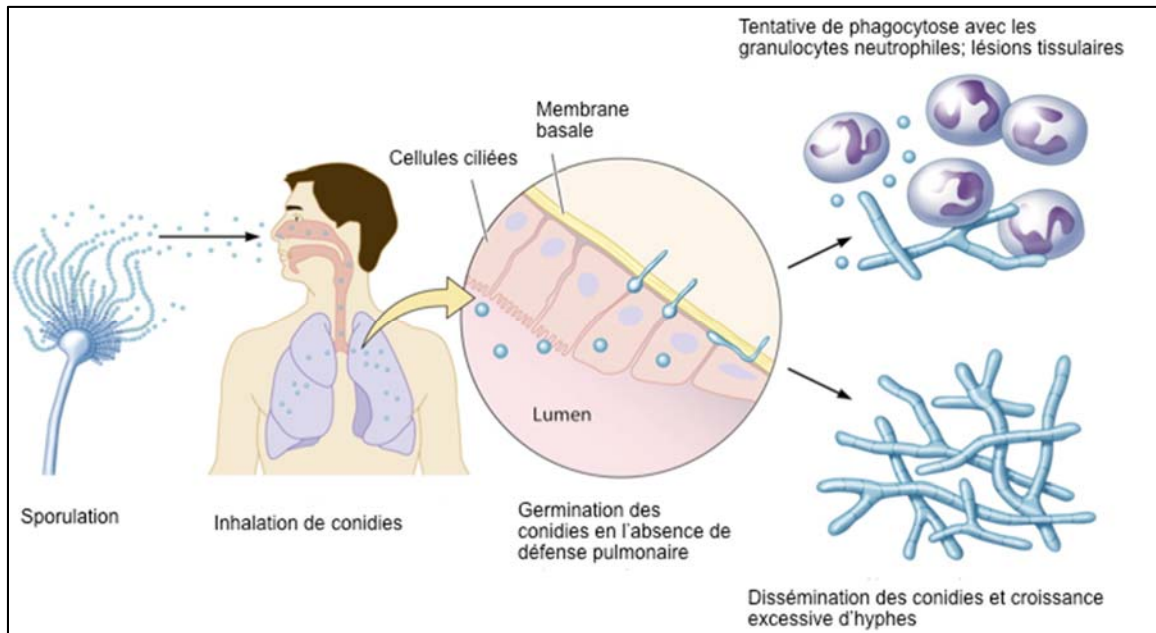


Figure 9 : Cycle de vie d'une infection d'*Aspergillus*. Adaptée avec permission de la réf. [37]

Une fois les conidies déposées, les macrophages alvéolaires et l'épithélium respiratoire tenteront de les éliminer [38].

La taille moyenne des spores se situe entre 2 et 3  $\mu\text{m}$  de diamètre, taille idéale pour s'infiltrer dans les bronches et alvéoles. De plus, les conidies d'*Aspergillus fumigatus* poussent bien à la température corporelle (37 °C). Plusieurs études ont suggéré que la pathogénicité serait en partie due à une bonne croissance à la température corporelle.

La paroi cellulaire de *Aspergillus fumigatus* est une structure rigide, qui protège la cellule fongique de son environnement. Cette protection est importante étant donné l'efficacité des macrophages pulmonaires à éliminer et détruire les spores et mycélium. Des études récentes ont montré que la paroi d'*Aspergillus fumigatus* est une structure dynamique où les

constituants, des polymères, sont continuellement chimiquement modifiés et réarrangés pendant la biosynthèse de la paroi cellulaire [39, 40].

Les enzymes de biosynthèse de la paroi cellulaire ont été depuis longtemps reconnues comme étant des composantes essentielles à la survie des champignons et une cible pour les antifongiques. Ainsi, une levure ne peut survivre sans une paroi cellulaire ou même s'il y a eu modification de cette membrane.

## **4. Les traitements conventionnels des candidoses et aspergilloses**

### **4.1. Les antifongiques**

Les médicaments antifongiques sont principalement utilisés pour traiter les pathologies dues aux infections fongiques (candidoses et aspergilloses). Il existe 4 classes principales d'agents antifongiques qui agissent soit au niveau de la paroi fongique, soit sur la membrane fongique ou soit au niveau de l'acide nucléique (polyènes, azolés, échinocandines, griséofulvine). De nos jours, le traitement des infections pulmonaires se fait dans la majorité des cas par la voie systémique. En effet, le traitement que ce soit d'infections invasives ou pulmonaires reste souvent inefficace dû entre autres aux problèmes de résistances chez les patients immunodéprimés ou aux problèmes d'infections nosocomiales. Un arsenal limité de médicaments antifongiques et des effets secondaires toxiques importants contribuent aussi grandement à l'échec des traitements. Dans cette thèse, l'étude sera focalisée sur 2 classes d'antifongiques, soient les azolés et les polyènes.

Tableau 1 : Classe des antifongiques [41]

Antifongiques	Années	Cible	Toxicité	Exemple
Polyènes	1955	Membrane fongique	Fongicide	Amphotéricine B
Échinocandines	> 2000	Paroi fongique	Fongicide sur <i>Candida</i> Fongistatique sur <i>Aspergillus</i>	Caspofungine
Azolés	1980-1990	inhibition de la 14 $\alpha$ -déméthylase	Fongistatique sur <i>Candida</i> (VRZ : fongicide sur <i>C. krusei</i> , <i>A. fumigatus</i> )	Voriconazole Itraconazole Posaconazole
5-fluorocytosine	1963	Acide nucléique	Fongistatique	

#### 4.1.1. Les azolés

##### 4.1.1.1. Le voriconazole et l'itraconazole

L'arrivée des azolés au début des années 1980 a révolutionné le traitement des infections fongiques. Les principes actifs de cette classe utilisés de nos jours sont le clotrimazole, le kétoconazole, l'itraconazole, le fluconazole et voriconazole. L'itraconazole a eu l'approbation de Santé Canada dès 1985. Quant au voriconazole, il a reçu l'approbation de commercialisation au Canada en 2004. Son activité globale *in vitro* est plus grande que celle du fluconazole et similaire à celle de l'itraconazole. Les études *in vitro* et *in vivo* pour ces 2 azolés ont démontré une efficacité antifongique entre autres contre les espèces *Aspergillus spp* et *Candida spp*.

##### 4.1.1.2. Propriétés physico-chimiques

Le voriconazole a une faible masse molaire (MM 349,41 g/mol). Il possède deux pKa (4,8/11,54) dus respectivement à un des atomes d'azote sur le noyau triazole et sur le noyau imidazole (figure 10-A). La solubilité intrinsèque du voriconazole dans l'eau (pH 7,6) est de 0,7 mg.mL<sup>-1</sup>. Étant donné que la molécule possède un pKa de 4,8, sa solubilité augmente à 3,2

mg.mL<sup>-1</sup> à pH 1,2 [42, 43]. Son temps de demie-vie est approximativement de 6 h. L'élimination se fait par voie rénale et environ 80% de la dose totale se retrouve sous forme de métabolite [44]. Son coefficient de partage octanol/eau (log P) est de 1,8, ce qui explique sa bonne biodisponibilité orale (>90%) [44, 45]. À l'état solide, le principe actif se présente sous une forme poudreuse de couleur blanchâtre. Le principe actif se dégrade à une température supérieure à 127-130 °C [46].

L'itraconazole est aussi une petite molécule mais avec une masse molaire 2 fois plus élevée que le voriconazole (MM 705,63 g.mol<sup>-1</sup>). Ce conazole possède un pKa de 3,7 dû à un des atomes d'azote sur le noyau triazole (figure 10-B). Sa solubilité dans l'eau est de 1ng.mL<sup>-1</sup> à pH neutre et de 4 µg.mL<sup>-1</sup> à pH 1, ce qui explique sa mauvaise biodisponibilité orale (~55 %) [47]. Son temps de demie-vie est approximativement de 21 h. Son coefficient de distribution apparent D est de 5,66 à pH 8,8 et son log P est de 5,66 [48]. À l'état solide, le principe actif se présente sous une forme poudreuse de couleur blanche. La température de fusion de la molécule est de 166-170 °C [46, 49, 50].

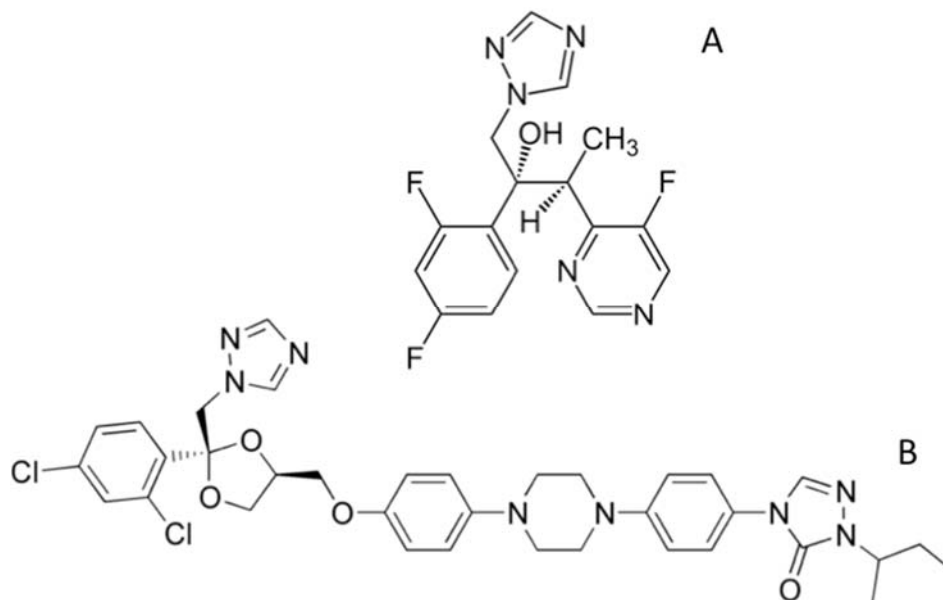


Figure 10 : Structure de différents azolés : (A) voriconazole et (B) itraconazole

#### 4.1.1.3. Mécanisme d'action

Les modes d'action du voriconazole et de l'itraconazole sont sensiblement les mêmes que celui de tous les azolés. Le principe actif arrête la synthèse de l'ergostérol par inhibition d'une enzyme à cytochrome P450 des cellules fongiques (inhibition de la 14 $\alpha$ -déméthylase (ERG11p)) suite à une interaction stoechiométrique de l'atome d'azote en 3<sup>e</sup> position N-3 du noyau triazole avec l'atome de Fe de l'hème du cytochrome (Figure 11). L'ergostérol est essentiel à la cohésion de la membrane du champignon en agissant comme un biorégulateur de la fluidité et de l'asymétrie membranaire.

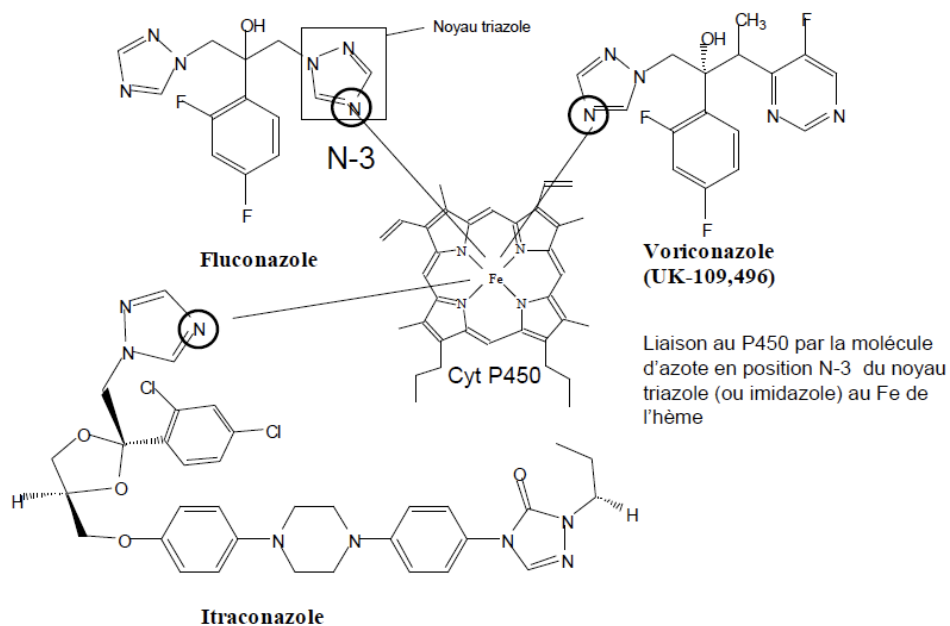


Figure 11 : Liaison des azolés à l'atome de Fer de l'hème du CYP450. Adaptée avec permission de la réf. [51]

Le tableau 2 présente le chemin de biosynthèse de l'ergostérol à partir du lipide squalène. Il existe 2 cibles possibles : soit les azolés agissent au niveau du gène ERG11 de l'enzyme lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase ou ils peuvent agir au niveau de ERG3 de l'enzyme C-5 stérol désaturase (flèches rouge dans le tableau 2) [52].

Gène	Enzyme	Métabolite
ERG1	Squalène epoxidase	Squalène
ERG7	Lanostérol synthase	2,3-oxido-squalène
→ ERG11 (CYP51)	Lanostérol 14a-déméthylase	4,4-diméthyl-8,14,24-triéol
ERG24	C-14 stérol réductase	4,4-diméthyl zymostérol
ERG25	C-4 stérol méthyloxidase	↓
ERG26	C-4 stérol décarboxylase	4-méthyl zymostérol
ERG27	C-3 stérol ketoreductase	zymostérol
ERG6	C-24 stérol methyl-transférase	Fécostérol
ERG2	C-8 stérol isomerase	Epistérol
→ ERG3	C-5 stérol désaturase	Ergosta-5,7,24 (28) triéol
ERG5 (CYP61)	C-22 stérol désaturase	Ergosta-5,7,22,24 (28) tetraéol
ERG4	C-24 stérol réductase	Ergostérol

Tableau 2 Biosynthèse de l'ergostérol à partir du lipide squalène. Les flèches rouges représentent le gène sur lequel les azolés peuvent agir [52]

#### 4.1.1.4. Formulation commerciale

SPORANOX® est la formulation commerciale de l'itraconazole. Cette formulation est composée d'un mélange racémique de quatre diastéréoisomères au ratio de 1:1:1:1 molécule possédant 3 centres chiraux. SPORANOX® est commercialisé sous deux formes : sous forme de solution orale et sous forme de capsules. La solution orale contient 10 mg d'itraconazole par mL, solubilisé à l'aide de l'hydroxypropyl-β-cyclodextrine (β-CD). Les capsules dures de SPORANOX® contiennent 100 mg d'itraconazole enrobé d'une fine couche de sucre. La formulation contient aussi des excipients tels que la gélatine, hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), polyéthylène glycol (PEG) (PM 20,000), amidon, sucrose [53].

VFEND® est la formulation commerciale du voriconazole. VFEND® est disponible sous forme de poudre lyophilisée pour administration intraveineuse. Cette formulation contient 200 mg de voriconazole et 3200 mg de sulfobutyl éther -β-CD à reconstituer dans 20 mL d'eau (concentration 10 mg.mL<sup>-1</sup>). VFEND® est aussi disponible en comprimés de 50 mg

ou 200 mg. Les excipients contenus dans cette formulation sont le lactose monohydrate, le croscarmellose sodique, le polyvinylpyrrolidone, le stéarate de magnésium, l'hydroxypropyl methylcellulose et le dioxyde de titane [41, 53].

#### **4.1.2. Les polyènes**

La nystatine et l'amphotéricine B (AMB) sont 2 polyènes d'origine naturelle encore largement utilisés en thérapeutique. De nos jours, l'AMB reste encore l'antifongique le plus efficace mais surtout très toxique.

##### **4.1.2.1. L'amphotéricine B**

Découvert dans les années 1950, l'AMB est un antibiotique antifongique de la famille des polyènes, extrait à partir d'une bactérie ; le *Streptomyces nodosus*. L'AMB exerce un effet fongistatique ou fongicide, selon la concentration qu'elle atteint dans les liquides organiques et la sensibilité du champignon [54, 55]. *In vitro*, elle est très active contre une grande variété de levures et de filamenteux. Puisque l'AMB est un fongicide avec un large spectre d'activité, la résistance clinique est plutôt rare.

##### **4.1.2.2. Propriétés physicochimiques**

L'AMB (MM 924,1 g/mol) est une molécule faisant partie de la classe IV du *Biopharmaceutical Classification System* (BCS); soit une molécule peu soluble et peu absorbable. Elle possède deux pKa (5,7 et 10,0) dus à un groupement carboxylique et une amine primaire (figure 12). De par sa configuration et sa structure, l'AMB forme un dimère ayant une solubilité très faible (750 µg.mL<sup>-1</sup>), ce qui pourrait expliquer en partie sa très faible biodisponibilité (0.3%). En effet, l'AMB est substrat des P-glycoprotéines [54]. On attribue cette mauvaise biodisponibilité à deux facteurs : une très faible solubilité et une perméabilité à travers la membrane intestinale faible. De plus, il paraîtrait que de plus gros agrégats se forment par empilement de plusieurs dimères et par conséquent deviennent insolubles [56, 57]. À l'état solide, elle se présente sous forme de cristaux jaunes qui se dégradent au-dessus de

170 °C. D'autre part, comme la plupart des lactones, elle est sensible aux pH très acides ou très basiques ainsi qu'à la lumière. Après administration, la molécule se lie à 90% aux protéines plasmatiques. Par voie systémique, l'AMB présente de nombreux effets secondaires: hypersensibilité, insuffisance rénale, traitement par des anti-arythmiques donnant des torsades de pointe. Ces nombreuses manifestations peuvent évoluer vers des effets encore plus graves: gastro-entérite hémorragique, choc anaphylactique, collapsus cardio-vasculaire [54]. La demi-vie plasmatique est de 24 h mais il y a une accumulation dans les reins [48].

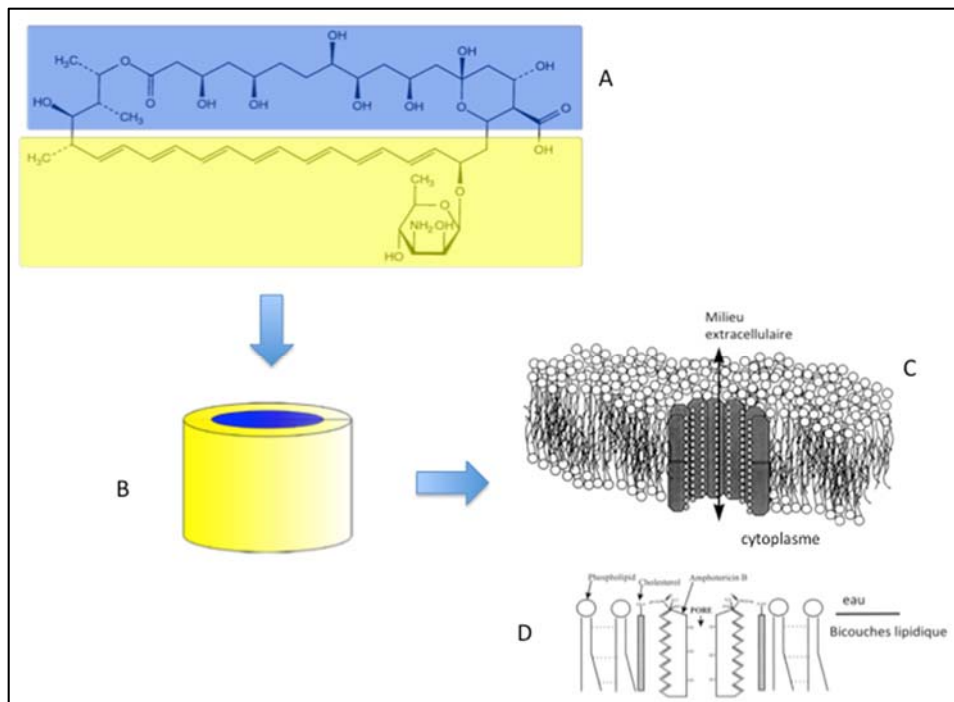


Figure 12 : Représentation schématique de l'interaction entre AMB et l'ergostérol dans la membrane lipidique. (A) Représentation de la structure de l'AMB. La partie jaune représente la partie hydrophobe et la partie bleue représente la partie hydrophile. (B) Représentation de l'arrangement des molécules d'AMB. (C) Représentation de l'arrangement en B dans la membrane lipidique. Formation d'un pore. (D) Orientation moléculaire des molécules d'AMB et du cholestérol lors de la formation du pore. Les lignes pointillées entre les molécules de phospholipides représentent les liaisons de London et Van der Waals. Les lignes raillées représentent les ponts hydrogènes entre AMB et les molécules de cholestérol. Adaptée avec permission de la ref. [58]



#### **4.1.2.3. Mécanisme d'action**

L'AMB agit en se liant à l'ergostérol et en formant un barillet composé de six molécules formant un canal. Ce canal ou pore exerce un effet cytotoxique en perturbant l'intégrité de la bicouche lipidique (figure 12). Ce dérèglement affecte la perméabilité de la membrane en favorisant la fuite de composants cytoplasmiques puis en menant à la mort cellulaire [59]. Toutefois, des auteurs ont récemment rapporté que suite à la formation de pores, il y aurait dommage de la cellule par un stress oxydatif (venant probablement de la mitochondrie) [55].

#### **4.1.2.4. Formulation commerciale**

Quatre préparations lipidiques d'amphotéricine B ont été développées en vue d'augmenter la biodisponibilité de l'AMB et de diminuer ses effets toxiques. Ces trois préparations (généralement administrées par intraveineuse) diffèrent par leur taille, par la forme de leurs particules et leur charge électrostatique. Ces propriétés physicochimiques ont un effet important sur leurs caractéristiques pharmacologiques.

La Fungizone® est constituée de poudre d'AMB lyophilisée ainsi que d'acide désoxycholique avec du phosphate de sodium comme tampon.

L'amphotéricine liposomale (AmBisome®) consiste en des vésicules sphériques unilamellaires composées d'une couche lipidique de phosphatidylcholine, cholestérol et phosphatidylglycérol. Elle a la plus petite taille des amphotéricines lipidiques (80-120nm).

L'amphotéricine B en dispersion colloïdale (Amphotec®) consiste en des disques formés d'agrégats de tétramères d'amphotéricine B et de sulfate de cholestérol. La taille est de 120 nm environ.

L'amphotéricine B sous forme de complexe lipidique (Abelcet®) consiste en une structure mélangeant deux phospholipides, le dimyristoyl phosphatidylcholine et le dimyristoyl phosphatidylglycérol formant des liposomes multilamellaires de grandes tailles (1 600-11 000 nm).

## 4.2. Les mécanismes de résistance acquise

### 4.2.1. Les azolés

L'usage intensif et prolongé de certains antifongiques, en particulier les azolés, a entraîné l'apparition de phénomènes de résistance acquise menant souvent à l'échec thérapeutique [60]. Toutefois, la résistance innée existe pour des espèces telles *C. krusei* pour le fluconazole. Les principaux mécanismes seront énoncés ci-dessous [54].

Tel que discuté dans l'introduction, les azolés inhibent l'enzyme fongique lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase, enzyme du cytochrome P450-dépendante, qui transforme le lanostérol en ergostérol [59, 61]. Sanglard *et al.* ont étudié les mécanismes de résistance des azolés qui sont présentés à la figure 13. La résistance aux antifongiques relève principalement de 3 mécanismes: modification de la perméabilité membranaire, modification ou hyperproduction de la cible et réduction de la concentration intracytoplasmique de l'antifongique. Pratiquement un seul de ces mécanismes de résistance est rarement en cause; c'est en fait leur combinaison qui conduit aux résistances des souches rencontrées en clinique.

- Modification de la perméabilité membranaire

La résistance serait due à des perturbations de la composition en phospholipides et en stérols diminuant la pénétration cellulaire de l'antifongique.

- Altération de la P 450<sub>14<sub>dm</sub></sub> (**situation A** de la figure 13)

Le cytochrome P450 14 alpha-déméthylase, codé par le gène ERG11 (CYP51), est la cible primaire pour la classe des antifongiques azolés. La mutation au niveau du gène codant pour la 14a-déméthylase, conduit à une enzyme modifiée dont l'affinité pour le conazole est diminuée [62].

- Hyperproduction de la cible (P45014<sub>dm</sub>-CPR) (**situation C** de la figure 13)

La surexpression du gène codant pour la P 45014<sub>dm</sub> entraîne la surproduction de l'enzyme.

- Diminution de la concentration cytoplasmique du conazole (**situation B** de la figure 13)

Ce mode de résistance vis-à-vis d'un principe actif est reconnu depuis une dizaine d'années chez les mammifères et les bactéries, mais n'a été admis que récemment pour les champignons. La résistance multiple, *Multi-drug resistance: MDR* est liée à la surproduction de protéines membranaires ATP-dépendantes ou non agissant à la façon de pompes membranaires et expulsant hors de la cellule le xénobiotique. Les protéines MDR sont classées en deux superfamilles: celle des *Major facilitators* (non ATP dépendante) et celles des *ATP-Binding Cassettes* (ABC ATP-dépendante).

Les transporteurs membranaires ABC sont relativement répandus chez les eucaryotes et ont déjà été impliqués dans le transport d'une grande variété de substrats. La plus connue est la glycoprotéine-P des mammifères (P-gp).

Les études de biologie moléculaire réalisées sur *Candida albicans* ont identifié les gènes codant pour les protéines MDR. La surexpression de ces différents gènes entraîne alors la surproduction de pompes membranaires qui expulsent le conazole hors de la cellule fongique.

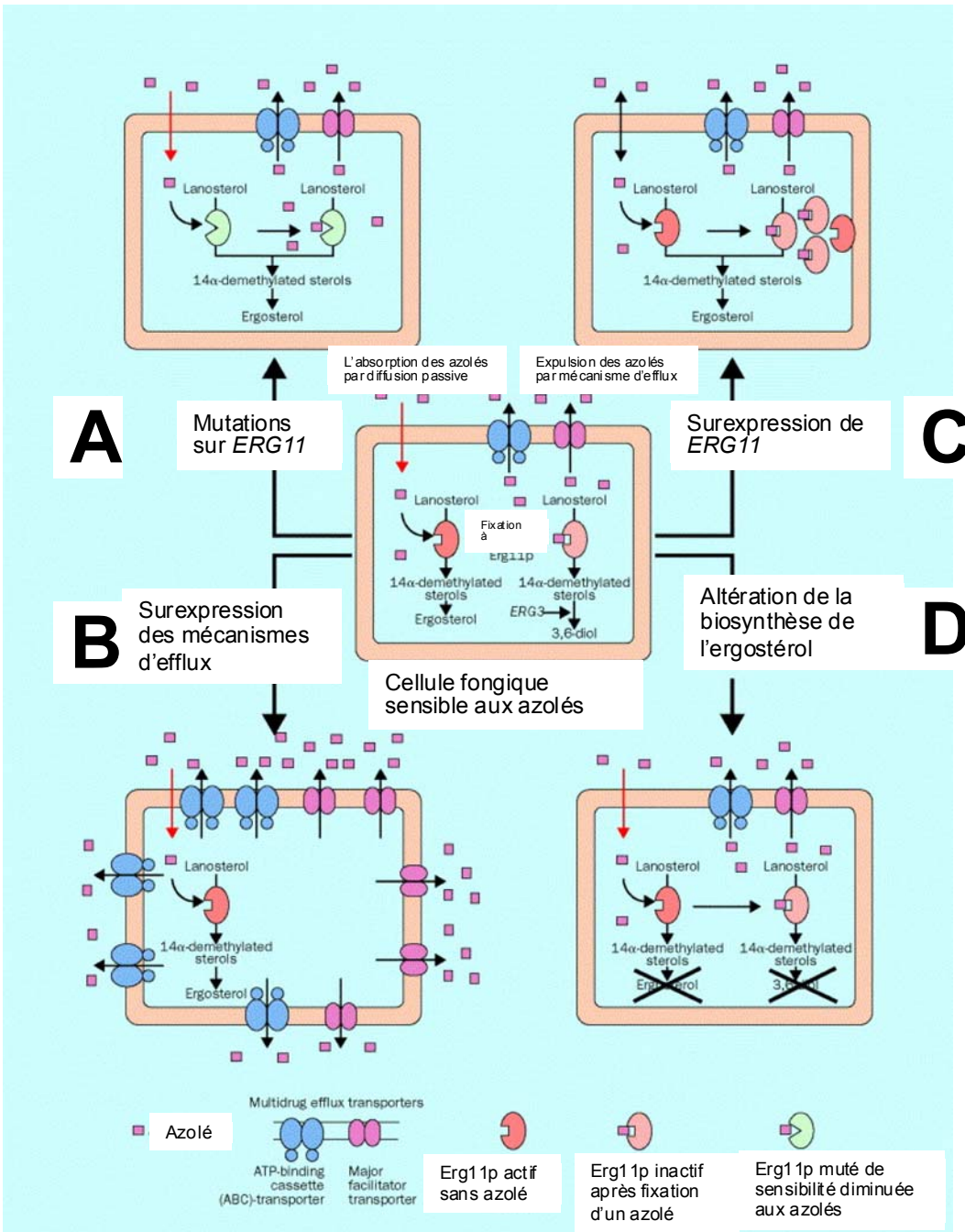


Figure 13 Différents mécanismes de résistance des champignons aux azolés. (A) représente la mutation de ERG11; (B) la surexpression des mécanismes d'efflux; (C) la surexpression de ERG11; (D) l'altération au niveau de biosynthèse de l'ergostérol; avec la permission de la réf [59]

#### 4.2.2. Les polyènes

La résistance à l'AMB est plutôt rare. La résistance se manifeste surtout chez les patients immunodéprimés ayant reçu de l'AMB sur de longues périodes. Les mécanismes de résistance des polyènes concernent surtout la diminution ou l'absence d'ergostérol, principale cible de l'AMB.[55]

### 5. Les nanoparticules polymériques

Les nanoparticules polymériques sont des vecteurs de taille variant généralement entre 10 et 1000 nm de diamètre. Ces nanovecteurs peuvent servir à encapsuler des principes actifs et ainsi les relarguer à l'endroit désiré; soit le site d'action. L'idée d'encapsuler des principes actifs vient du fait que plusieurs médicaments sur le marché ne présentent pas de propriétés physicochimiques optimales ou présentent des problèmes de toxicité non négligeable. Des propriétés comme une faible solubilité, une importante hydrophobicité, une toxicité importante ou une instabilité du principe actif peuvent considérablement affecter leur efficacité *in vivo*. Les principes actifs hydrophobes sont généralement ceux qui présentent des propriétés physicochimiques les moins intéressantes (mauvaise solubilité, mauvaise biodisponibilité...).

En encapsulant un principe actif dans une matrice, la libération du principe actif pourra être mieux contrôlée, mieux relarguée au site d'action et au bout du compte moins de médicament sera nécessaire pour avoir la même efficacité. Au fil des décennies, plusieurs formulations issues de la nanotechnologie ont été conçues, mais malheureusement peu ont atteint la commercialisation. Parmi les nanovecteurs étudiées dans la littérature, les nanoparticules polymériques s'illustrent surtout pour leur stabilité et leur biocompatibilité [63]. En effet, il est connu que les nanoparticules polymériques sont plus biocompatibles et démontrent moins de toxicité que la plupart des autres nanovecteurs (liposomes, micelles, nanoparticules métalliques...) [64, 65]. Les nanoparticules polymériques abordées dans cette thèse sont surtout celles ayant une structure cœur/couronne. Le cœur de la nanoparticule est

généralement constitué de polymère hydrophobe. Cette hydrophobicité permettra d'encapsuler des principes actifs hydrophobes ce qui assurera une bonne affinité entre les deux.

Toutefois, les protéines sanguines spécifiques sont davantage susceptibles de s'agréger ainsi que de s'adsorber sur des particules ayant des surfaces hydrophobes menant à la reconnaissance et la capture celles-ci par le système phagocytaire. Pour contrer ce désavantage, les nanoparticules polymériques hydrophobes présentent donc souvent une surface recouverte d'un polymère hydrophile afin de conférer une protection stérique et limiter ces événements. Les polymères utilisés dans la fabrication des nanoparticules seront présentés de façon brève et succincte dans la prochaine section.

### 5.1. Polymère utilisé en surface des nanoparticules; Poly(éthylène glycol)

Parmi les polymères utilisés pour leurs propriétés de surface, le poly(éthylène glycol) (PEG) est probablement celui qui est le plus utilisé et celui ayant fait le plus l'objet d'études (figure 14).

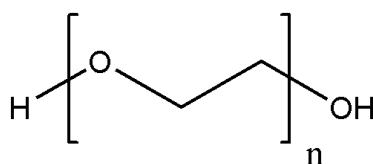


Figure 14 Structure du PEG

Le PEG est un polyéther hydrophile, non ionique, non toxique et biodégradable [66, 67]. Dans les années 90, le polyéthylène glycol linéaire a été introduit dans la composition des liposomes et des nanoparticules polymériques. Il est surtout utilisé comme polymère de couronne de nanoparticule de cœur hydrophobe [68-70]. Le PEG a la propriété de diminuer les interactions entre les protéines et la surface des nanovecteurs, de modifier la pharmacocinétique, la biodistribution et d'influencer l'internalisation des nanovecteurs par les

cellules [64, 71-73]. Les chaînes de PEG de taille allant au-delà de 2 kDa peuvent réduire considérablement l'adsorption d'opsonines et d'autres protéines du sérum sur les nanovecteurs.

Les chaînes de PEG, hydrophiles et flexibles, agissent par un effet de répulsion stérique, rendant la liaison aux protéines défavorable. Cet effet de répulsion dépend de la longueur de la chaîne, la densité de surface optimale, et la configuration de chaîne optimale [13]. Il est bien établi que de 2 à 5 kDa semble être la longueur minimale pour avoir l'effet *stealth* [64, 74], mais des chaînes plus longues de nanocapsules rigides ont montré l'amélioration du temps de circulation [63, 75]

## 5.2. Polymère utilisé pour le cœur des nanoparticules; Polyesters

Les polyesters sont des polymères hydrophobes dégradables par hydrolyse des liens esters entre chaque unité de répétition. Parmi les nombreux polyesters étudiés, les poly-(lactide) ont généré un immense intérêt en raison de leurs propriétés favorables telles qu'une bonne compatibilité, biodégradation et une bonne stabilité, des considérations importantes pour la conception de nouveaux biopolymères [76]. Même si les polyesters comme le poly-(lactide) (PLA) sont hydrophobes, ils ont l'avantage d'être approuvés pour l'usage humain par la FDA.

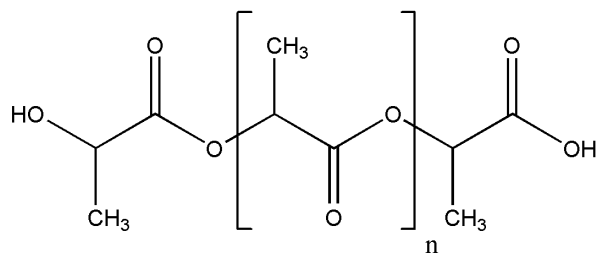


Figure 15 : Schéma du D,L-PLA

Le PLA peut exister sous la forme stéréochimique L-PLA (optiquement actif) et sous forme de mélange racémique D,L-PLA. Le L-PLA est semicristallin en raison de la nature hautement régulière de sa chaîne de polymère tandis que la forme D,L-PLA est plutôt amorphe (tout en ayant des micro zones cristallines) en raison d'irrégularités dans la structure de la chaîne. Le PLA est soluble dans les solvants organiques tels que le chloroforme et le dichlorométhane, mais est insoluble dans les alcools comme l'éthanol [77]. Ils sont aussi insolubles dans l'eau, bien que le PLA de faible masse molaire est plus hydrophile et contient des oligomères avec une certaine solubilité aqueuse [78].

### **5.3. Les co-polymères**

Ces dernières années, plusieurs travaux ont porté sur une nouvelle famille de polymère; les polyesters-co-éthers greffés latéralement par divers groupes fonctionnels [79-83]. Les plus intéressants sont les chaînes de polyesters où ont été greffés des polymères hydrophiles (PEG). En effet, l'équipe du Prof. Hildgen travaille sur le développement de ce type de polymère et la structure chimique peut être présentée à la figure 16. Ces co-polymères sont amphiphiles et donnent un caractère furtif aux nanoparticules. Les nanoparticules faites de co-polymères sont réputées être plus biocompatibles et biodégradables que beaucoup d'autres vecteurs, ce qui explique leur popularité pour le développement des systèmes de livraison de principe actif. La stabilité de ces systèmes est appréciable en regard aux exigences de circulation prolongée afin de tirer avantage de l'effet de perméabilité et de rétention dans les tissus tumoraux (applications liées au cancer) [84]. Il a été démontré que lors de la fabrication de nanoparticules à base de co-polymères amphiphiles, la partie hydrophile a tendance à s'exposer vers le milieu aqueux tandis que la partie hydrophobe a plutôt tendance à s'agréger pour former le cœur de la particule [66, 67].



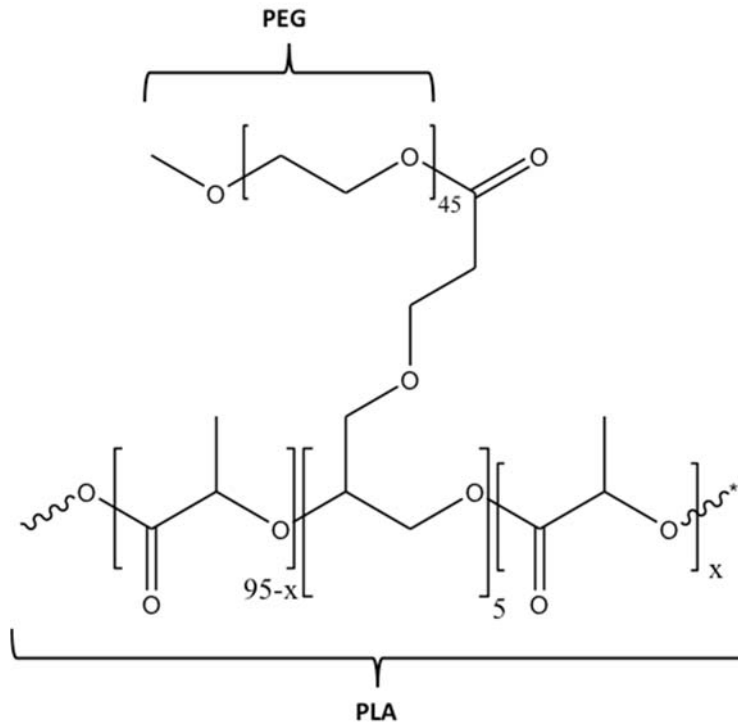


Figure 16 : Structure chimique du PEG-g-PLA

Pour des particules de taille nanométrique, la présence de PEG en surface favorisera l'endocytose ce qui est un élément essentiel à la perméabilité. La présence de PEG en surface permet aussi une mucoadhésion ce qui augmente le temps de séjour du vecteur à l'intérieur de l'organisme [85].

## **Chapitre 2. Hypothèses et objectifs**

## 1. Hypothèses et objectifs généraux

Les préparations pour inhalation sont des formulations liquides ou solides destinées à être administrées pour la voie pulmonaire sous forme de vapeurs ou d'aérosols en vue d'une action locale ou systémique. Depuis plusieurs décennies, l'administration pulmonaire de principe actif a surtout été employée pour traiter les troubles pulmonaires en utilisant des bronchodilatateurs et des agents expectorants. Cependant, l'administration systémique de petites molécules et de macromolécules à l'aide d'aérosols est devenue un domaine d'étude très actif ces dernières années. Que ce soit pour l'administration systémique ou locale, les caractéristiques uniques du poumon telles qu'une grande surface d'absorption, une bonne perméabilité ainsi qu'une forte irrigation sanguine contribuent à faire de la voie pulmonaire une voie d'administration fort intéressante. En effet, plusieurs études ont montré que des médicaments, incluant une protéine comme l'insuline, peuvent atteindre efficacement la circulation systémique [7, 8, 15, 86-91]. Quant au niveau local, la plupart des études s'intéressent aux médicaments pour le traitement de l'asthme et de maladies pulmonaires obstructives chroniques. Toutefois, l'administration locale demeure aujourd'hui encore le traitement le plus populaire.

Par contre, la voie pulmonaire présente encore aujourd'hui plusieurs défis et obstacles. En effet, pour administrer une formulation par inhalation, certaines caractéristiques physiologiques spécifiques du poumon doivent être contournées [92]. Par exemple, les formulations doivent surmonter l'aptitude du poumon à filtrer les particules entrantes et à rapidement expulser toute substance étrangère par l'action des cils vibratiles formant un véritable escalier mobile vers l'œsophage. À cet égard, les systèmes à libération prolongée faits de nanoparticules ou de nanocapsules polymériques présentent de nombreux avantages pour améliorer l'efficacité de l'administration de médicaments par voie pulmonaire. En effet, les caractéristiques physicochimiques (taille, densité, mucoadhésivité, charge en surface des NP) de ces systèmes peuvent être modulées permettant ainsi d'augmenter la durée de vie et/ou d'améliorer la biodisponibilité des principes actifs que ce soit au niveau local ou systémique.

La stratégie retenue dans la présente recherche s'appuie sur le développement de nanoparticules polymériques composées de polyester-co-polyéther branché avec du polyéthylène glycol (PEG-g-PLA). Ce co-polymère a la particularité d'être biodégradable, biocompatible en plus de posséder des caractéristiques de libération prolongée. Les chaînes de PEG greffées sur les chaînes de PLA moduleront la libération du principe actif ainsi que les caractéristiques de surface des particules.

### **Hypothèse générale de recherche**

*Une nouvelle formulation de voriconazole, d'itraconazole ainsi que d'amphotéricine B sous forme de nanoparticules polymériques permettra d'augmenter l'efficacité et la spécificité des traitements antifongiques sur des souches sensibles et résistantes de *Candida spp*, d'*Aspergillus spp* et des souches de *Candida albicans* formant du biofilm.*

### **Hypothèse secondaire 1:**

L'encapsulation du principe actif dans une matrice polymérique composée de polyester-co-polyéther branché avec du polyéthylène glycol (PLA-g-PEG) permettra de contourner les problèmes de faible taux de dissolution et d'absorption des antifongiques.

### **Hypothèse secondaire 2:**

Une formulation à libération modifiée prolongera la durée d'action. La présence de PEG en surface de la nanoparticule jouera un rôle dans la libération du principe actif et dans l'internalisation dans les levures.

### **Hypothèse secondaire 3:**

La nouvelle formulation permettra de diminuer de façon significative les valeurs de concentration minimale inhibitrice (CMI50) par rapport aux traitements conventionnels.

## 2. Objectifs spécifiques

### 2.1. Mise au point de nouvelles formulations de nanoparticules à base de PEG-g-PLA pour l'administration pulmonaire d'antifongiques

#### *Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA*

L'objectif est l'obtention de polyesters-co-éthers greffés latéralement avec des groupes fonctionnels pegylés dans le but de préparer des nanovecteurs de médicament. Brièvement, le dilactide est mélangé à un catalyseur en présence de glycidyl éther pour obtenir un polylactide-co-éther portant des groupements latéraux allyl. Ces groupements sont soumis ensuite à une oxydation douce qui conduit à un groupement hydroxyle puis une deuxième oxydation conduit à un groupement acide carboxylique. Sur ce dernier groupement un poly(éthylène) glycol (MM 2000) est greffé par une réaction d'estérification. La caractérisation du polymère sera faite selon les méthodes habituelles (<sup>1</sup>H RMN, GPC, IR et DSC).

#### *Fabrication des NP*

Des formulations de nanoparticules destinées à la voie pulmonaire seront développées avec le polymère PEG-g-PLA par une méthode d'émulsion H/E à l'aide d'un homogénéiseur à haute pression. Les paramètres de fabrication seront optimisés afin d'obtenir des NP ayant un diamètre hydrodynamique moyen inférieur à 200 nm. L'optimisation de l'encapsulation des antifongiques devra aussi être effectuée. Selon l'antifongique utilisé, le taux d'encapsulation et le choix du solvant devront être optimisés.

#### *Caractérisation des NP*

Les NP seront caractérisées par mesure de taille, leur rayon hydrodynamique, leur charge en surface (potentiel zêta), taux d'encapsulation du PA et évaluation de la morphologie

par AFM. Les profils de libération du médicament seront étudiés dans des milieux tamponés. Des études sur un impacteur en cascade seront effectuées pour estimer le profil de déposition des NP dans le poumon.

## **2.2.Effet de l'activité antifongique de nouvelles formulations d'antifongiques sur des souches résistantes et sensibles de *C. albicans* ainsi que d'*A. fumigatus***

*Évaluation in vitro de l'activité antifongique sur des souches résistantes ou sensibles de Candida et d'Aspergillus selon le protocole NCCLS*

Pour déterminer la sensibilité d'une souche à un antifongique, il faut déterminer sa concentration minimale inhibitrice (CMI). Elle correspond à la plus faible concentration d'antifongique permettant d'inhiber totalement la pousse d'un agent fongique. Les nouvelles formulations seront testées selon le protocole NCCLS en utilisant comme contrôle l'antifongique dissout en solution et les NP non chargées en PA.

*Évaluation in vitro de l'activité antifongique sur un modèle de biofilm de Candida albicans*

L'objectif sera d'évaluer le potentiel antifongique des nouvelles formulations sur des souches de *Candida albicans* formant des biofilms. Les formulations seront testées selon un protocole maison et les résultats obtenus seront comparés aux traitements conventionnels.

### **2.3. Études de l'internalisation des nouvelles formulations sur des souches de *C. albicans* ainsi que *A. fumigatus***

#### *Synthèse du polymère PEG-g-PLA avec une sonde fluorescente*

Afin de faire un suivi des NP à l'intérieur des levures en microscopie de fluorescence, une sonde fluorescente, la rhodamine, sera greffée de façon covalente sur le polymère PEG-g-PLA. Le polymère devra être caractérisé par GPC et RMN <sup>1</sup>H. Les NP seront ensuite préparées de façon similaire aux lots décrits dans la section 2.2.1.

#### *Internalisation des NP dans les cellules de *C. albicans* ainsi que *A. fumigatus**

Le dernier objectif sera de relier le comportement des nouvelles formulations *in vitro* avec les résultats de caractérisation. Les NP fluorescentes contenant les antifongiques seront mises en contact avec des cellules de *Candida* et d'*Aspergillus* et les interactions NP / levures seront étudiées. L'internalisation cellulaire sera évaluée par microscopie de fluorescence et par microscopie confocale. Les NP fluorescentes sans principe actif seront utilisées comme contrôle.

**Chapitre 3. Mise au point de nouvelles formulations de nanoparticules à base de PEG-g-PLA pour l'administration pulmonaire d'antifongiques**



# 1. Introduction

Le système respiratoire constitue une voie d'entrée dans l'organisme pour de nombreuses substances. Généralement, ces substances sont inoffensives, mais elles peuvent parfois contenir des agents pathogènes et causer des infections. En effet, les poumons sont vulnérables aux bactéries, agents infectieux fongiques, parasites ou aux virus.

L'incidence des infections fongiques graves a augmenté de façon spectaculaire au cours des dernières années en raison de l'augmentation du nombre de patients recevant des traitements immunosuppresseurs (greffe) et de l'augmentation de patients infectés par le VIH [93-95]. Il n'est pas rare de voir ces patients développer des maladies pulmonaires telles que l'aspergillose pulmonaire invasive, maladie grave et souvent mortelle. La fréquence élevée des infections a mis en évidence le besoin de médicaments plus efficaces et moins toxiques pour le traitement des infections fongiques. Par exemple, la Fungizone® est une solution de désoxycholate de sodium et d'AMB, ce qui permet de diminuer légèrement la toxicité. L'Ambisome® est une forme liposomale d'AMB. Ces diverses formes injectables ont permis de légèrement diminuer la toxicité et d'augmenter un peu la durée d'administration. Toutefois, les problèmes toxiques restent importants et aucune formulation orale n'est présentement efficace occasionné par une mauvaise biodisponibilité. On attribue cette faible biodisponibilité à deux facteurs physicochimiques : une très faible solubilité et une perméabilité à travers la membrane intestinale faible. Par exemple, la solution de Sporanox®, formulation de cyclodextrine d'ITZ, a une biodisponibilité variant de 40% à 50 % due à une faible solubilité [96].

Les poumons sont également une voie d'entrée pour les médicaments. En fait, l'administration de médicaments directement dans les voies respiratoires est largement considérée pour le traitement des maladies respiratoires. L'administration directe de médicament au site d'action permet une plus grande concentration locale du PA. Toutefois, seules quelques études ont été rapportées dans la littérature [97].

Par ailleurs, depuis déjà plusieurs années, de nombreuses avancées dans le domaine de la nanovectorisation de médicaments ont permis d'améliorer grandement l'efficacité de divers principes actifs. Parmi les exemples notoires, on peut citer les liposomes pegylés chargés en doxorubicine (Doxil ®), les nanoparticules d'albumine de paclitaxel (Abraxane ®) ou bien les solutions liposomales d'amphotéricine B (Ambisome ®) [98-100]. En raison de leur petite taille, ces structures sont capables de traverser les barrières biologiques en améliorant le ciblage des sites pathologiques et en améliorant la biodisponibilité des médicaments [101]. Toutefois, les réels avantages de ces nanoformulations restent limités, causés entre autres, par une stabilité précaire en milieux biologiques, un ciblage peu adéquat ou bien un relargage peu contrôlé. D'autant plus que l'administration par voie pulmonaire de ces formulations reste grandement toxique [102-105]. Jusqu'à ce jour, aucun nanovecteur spécialement conçu pour la voie pulmonaire n'a été commercialisé.

Les nanoparticules à base de polymère composées de PLA-PEG ont été proposées comme alternative en raison de leur nature biodégradable et biocompatible (non toxique) en plus de pouvoir moduler la libération du principe actif. Récemment, des polyesters ramifiés composés de chaînes de PEG greffés sur un polylactide ont été étudiés dans notre laboratoire [82, 106, 107]. Ceux-ci ont comme caractéristique de pouvoir modifier les propriétés de libération ou les propriétés de surface des particules pour diminuer l'opsonisation, diminuer la capture par le système réticulo-endothélial, diminuer les interactions non spécifiques avec les surfaces biologiques [108].

C'est dans ce contexte que nous proposons une toute nouvelle formulation d'antifongique spécialement étudiée pour la voie pulmonaire. En utilisant un polymère tel que le PEG-g-PLA dans la fabrication des nanotransporteurs de PA, on permettra probablement d'augmenter la perméabilité, la durée d'action et de diminuer potentiellement les doses nécessaires. On protège aussi le PA d'une dégradation prématurée en plus de permettre une

libération contrôlée. L'effet combiné de ses facteurs pourrait potentiellement entraîner une augmentation de l'efficacité des traitements.

Dans un premier temps, le polymère sera synthétisé et caractérisé, puis les NP seront fabriquées et caractérisées. Le profil de relargage sera effectué. La formulation NP/AMB sera testée sur un modèle mécanique *in vitro* de poumon pour évaluer le potentiel de cette formulation à être administrée par voie pulmonaire.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA

Les polymères utilisés ont été synthétisés tel qu'effectué lors de travaux antérieurs et publiés dans la littérature [82]. Le schéma de synthèse est présenté à la figure 17. Brièvement, le dilactide est mélangé à un catalyseur en présence de glycidyl éther pour obtenir un polyester-co-éther portant des groupements latéraux allyl. Ces groupements sont soumis ensuite à une oxydation douce qui a conduit à un groupement hydroxyle puis une deuxième oxydation a conduit à un groupement acide carboxylique. Sur ce dernier groupement, un méthoxy-poly(éthylène) glycol (MM 2000) est greffé par une réaction d'estérification. La caractérisation est effectuée selon les méthodes habituelles, soit par résonance magnétique nucléaire (RMN), par chromatographie d'exclusion de taille (GPC), par analyse infra-rouge (IR) et par analyse calorimétrique différentielle (DSC).

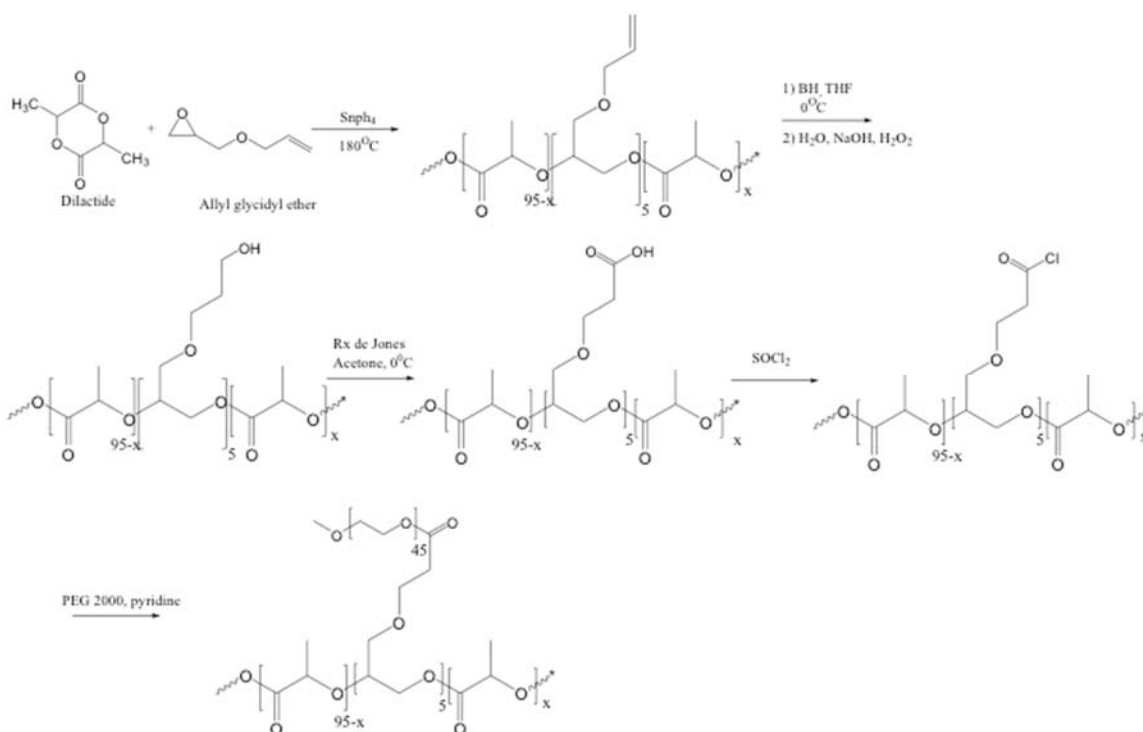


Figure 17 : Schéma de synthèse du PEG-g-PLA effectué par polymérisation par ouverture de cycle

La masse molaire ainsi que l'indice de polydispersité (IP) sont déterminés par GPC (Waters, Milford, MA) en utilisant une colonne Phenogel de 5  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, CA). La phase mobile est composée de tétrahydrofurane ( $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) et la détection a été réalisée à l'aide d'un réfractomètre différentiel. Des standards de polystyrène ont été utilisés pour réaliser une courbe d'étalonnage à 6 points.

## **2.2.Fabrication des NP**

Les NP ont été préparées en utilisant une méthode d'émulsion-évaporation de solvant. Les NP blanches, non chargées ont été préparées en dissolvant le polymère (1 g) dans du dichlorométhane (DCM, 35 mL). Cette solution a ensuite été émulsionnée avec une phase aqueuse contenant un surfactant, l'alcool polyvinylique (PVA) à une concentration de 0,5% m/v (100 mL). L'émulsion a été effectuée à l'aide d'un homogénéiseur à haute pression (Emulsiflex C30, Avestin, Ottawa, Canada) à une pression de 10 000 psi, pendant 4 min. L'émulsion huile-dans-eau (H/E) a été recueillie dans un bécher. Sous une agitation constante, le DCM présent dans l'émulsion a été évaporé sous atmosphère réduite et une constante agitation. La suspension de NP obtenue a été centrifugée à l'aide d'une ultracentrifugeuse (Sorval Evolution RC, Langensfeld, Allemagne) à 18 500 rpm, pendant 1 h, à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  et lavée quatre fois avec de l'eau distillée (200 mL) pour éliminer le PVA. Une solution de sucrose à une concentration de 5% (m/v) a été ajoutée au mélange. Celle-ci a été lyophilisée pour obtenir des NP sèches (Lyph-Lock 4.5, Labconco, Kansas City, MO). Les NP ont été conservées congelées ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) pour utilisation ultérieure.

Trois formulations d'antifongiques ont été préparées de façon similaire aux NP blanches non-chargées. Le tableau ci-dessous présente les trois formulations qui ont été préparées.

Tableau 3: Nouvelles formulations d'antifongiques

<b>Nouvelles formulations</b>	<b>Abréviations</b>
VRZ encapsulé dans une NP polymérique de PEG-g-PLA	NP/VRZ
ITZ encapsulé dans une NP polymérique de PEG-g-PLA	NP/ITZ
AMB encapsulé dans une NP polymérique de PEG-g-PLA	NP/AMB

De façon générale, chaque antifongique est dissous avec le polymère dans un solvant organique pour ensuite être émulsionné avec une phase aqueuse (tableau 4).

Pour la préparation des formulations NP/ITZ et NP/VRZ, les antifongiques ont été préalablement dissous dans du DCM avec le polymère PEG-g-PLA.

Quant à la formulation NP/AMB, elle a été préparée de façon similaire mais avec quelques modifications. L'AMB a quant à elle été dissoute dans un mélange de cosolvants de MeOH (pH 4)/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:2) et soumis aux ultrasons à 60 °C pendant 30 minutes. Ensuite, le polymère a été solubilisé dans le mélange à température ambiante. Plus précisément, le tableau 4 présente les conditions spécifiques pour la préparation de chaque nouvelle formulation d'antifongique.

Tableau 4: Conditions pour la préparation d'un lot de nouvelles formulations de PA

<b>PA</b>	<b>Quantité PA (mg)</b>	<b>Polymère utilisé</b>	<b>Quantité de polymère (mg)</b>	<b>Solvants</b>	<b>Volume de solvant (mL)</b>	<b>Volume de phase aqueuse (mL)</b>	<b>Température</b>
VRZ	90	PEG-g-PLA	900	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35	100	Température pièce
ITZ	90	PEG-g-PLA	900	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35	100	Température pièce
AMB	90	PEG-g-PLA	900	MeOH + CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	35	100	60 °C pour 30 min

## **2.3. Caractérisation des NP**

### **2.3.1. Mesure de la taille des particules et du potentiel zêta**

La taille des particules a été évaluée 25 °C en milieu aqueux par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Zetasizer NS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK) avant lyophilisation. Le potentiel zêta a été mesuré par diffusion électrophorétique de la lumière en utilisant le même instrument dans une solution saline NaCl (0,25%, pH7,4). Les résultats ont été rapportés sous forme de moyenne de trois différentes mesures.

### **2.3.2. Microscopie de force atomique (AFM)**

La morphologie et les études d'imagerie ont été effectuées en utilisant un instrument de microscopie de force atomique (Nanoscope IIIa Dimension 3100, Digital Instruments, Santa Barbara, CA) équipé de sondes de silicium gravées (fréquence de résonance 200-500 kHz, mode tapotement, rayon de la pointe 5-10 nm, constante de rappel 20-100 N/m, longueur de la pointe 125 µm). Les échantillons ont été préparés en déposant 10 µL de suspension aqueuse de NP sur des plaques de mica fraîchement clivées. Les images ont été acquises après une nuit de séchage à température ambiante.

### **2.3.3. Analyse calorimétrique différentielle (DSC)**

Les propriétés thermiques du polymère pur, des mélanges physiques respectifs de VRZ, ITZ et AMB avec le polymère PEG-g-PLA et les principes actifs encapsulés dans des NP ont été analysées avec un instrument DSC (Jade DSC, Perkin-Elmer, Waltham, MA) sous atmosphère d'azote dans un intervalle de température allant de -20 à 250 °C à une vitesse de balayage de 5°C/min). Deux balayages thermiques ont été effectués pour chaque échantillon. Le premier balayage montre les événements thermiques. Le deuxième balayage confirme l'absence de solvant résiduel. Toutefois, seul le premier balayage a été rapporté dans les résultats.

#### **2.3.4. Efficacité d'encapsulation (%EE) et efficacité de chargement (%LE)**

Les antifongiques VRZ, ITZ et AMB ont été quantifiés pour évaluer leur efficacité d'encapsulation dans les NP. Le chargement initial pour chaque antifongique a été fixé à 10% par rapport à la quantité de polymère utilisée.

Pour évaluer l'efficacité d'encapsulation du VRZ, 25 mg de NP ont été dissoutes dans 1 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puis le volume a été jaugé à 10 mL avec de l'acétonitrile (ACN) (température ambiante, 1 h d'agitation) dans un ballon jaugé. La suspension a ensuite été ultracentrifugée à 140 000 RPM pendant 15 min. Le surnageant a été analysé par HPLC suivant la méthode décrite ci-dessous. Les résultats ont été rapportés selon l'efficacité d'encapsulation, %EE, définie comme le ratio de la quantité de principe actif encapsulé dans les NP sur la quantité initiale de principe actif utilisé et selon l'efficacité de chargement, %LE, définie comme étant le rapport de la quantité de principe actif encapsulé dans les NP sur la quantité totale des NP.

La même procédure a été utilisée pour évaluer l'efficacité d'encapsulation de l'ITZ et de l'AMB. Toutefois, pour l'analyse de l'AMB, quelques modifications ont été apportées à la méthode. La solution de NP a été dissoute dans du DMF au lieu du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avant d'être quantifiée par HPLC.

#### **2.3.5. Étude des profils de relargage *in vitro* des principes actifs**

Une méthode de diffusion des principes actifs par sac de dialyse a été utilisée pour établir les profils de libération en milieux plasmatiques simulés. Le PA libre a été utilisé comme contrôle pour cette méthode. La libération du PA à partir de la NP a été comparée avec le relargage du PA libre. Pour l'étude de relargage de l'AMB, la solution commerciale Fungizone® a été utilisé comme point de comparaison. Cinquante milligrammes de NP de chaque formulation ont été dispersés dans 2,5 mL de milieu PBS (10mM, pH 7.4). Ce volume est ensuite placé dans des membranes de dialyse (Spectra Por 1, pores de diamètre variant entre 6-8000 Da). Chaque membrane est insérée dans un tube en polypropylène contenant 10



mL de milieu. Le tout sera mis sous agitation mécanique douce (150 RPM) à 37 °C. Des échantillons de 1 mL du milieu de diffusion seront prélevés (et remplacé par 1 mL de PBS) à des instants prédéterminés et dosés par HPLC. Les résultats sont présentés sous forme d'un graphique représentant les quantités cumulées en fonction du temps d'incubation.

### **2.3.6. Méthodes d'analyse de chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)**

L'analyse de chaque antifongique s'est faite par HPLC muni d'un détecteur à barrettes de diode (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Pour la quantification de l'AMB, une colonne Inertsil ODS-3V C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm, GL sciences, Japan) et une pré-colonne C18 ODS-octadecyl (4 mm x 3,0 mm) ont été utilisées. La méthode d'analyse provient d'une récente publication de Chang *et al.* avec quelques modifications [109]. La colonne est maintenue à 30,0°C. La phase mobile contient un ratio de 55:45 de phase organique (41/18/10 v/v/v méthanol/acétonitrile/tetrahydrofuran) et de tampon (2,5 mmol.L<sup>-1</sup> EDTA-2Na). L'élution isocratique est effectuée à un débit de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> pendant 25 min avec une détection de l'absorbance à 383 nm et avec un volume d'injection de 20 µL. Pour la courbe d'étalonnage, une solution mère de 5,0 mg.mL<sup>-1</sup> d'AMB a été préparée dans du DMF. Ensuite, sept dilutions en série dans la phase mobile sont préparées avec des concentrations variant de 0,5 à 200 µg.mL<sup>-1</sup>. Les injections ont été réalisées en triplicata pour chaque analyse (n = 3).

Pour la quantification de l'ITZ, une colonne Apollo C8 5u 250mm\*4,6mm a été utilisée. La colonne est maintenue à 30,0°C. La phase mobile contient 35% de tampon phosphate 50mM, 20% Méthanol et 45% ACN. L'élution isocratique est effectuée à un débit de 1,7 mL.min<sup>-1</sup> pendant 25 min avec détection de l'absorbance à 263 nm et avec un volume d'injection est de 50 µL. Pour la courbe d'étalonnage, l'ITZ est dissous dans une solution de MeOH (5,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Sept dilutions en série dans l'eau sont préparées avec des concentrations variant de 0,05 à 6 µg.mL<sup>-1</sup>. Les injections ont été réalisées en triplicata pour chaque analyse (n = 3).

Pour quantifier le VRZ, nous avons optimisé les paramètres de la HPLC afin d'obtenir un pic fin et précis de VRZ avec un temps de rétention relativement faible pour nous permettre de multiplier les mesures. Pour la quantification du VRZ, une colonne Apollo C8 5u 250mm x 4,6mm a été utilisée. La colonne est maintenue à 30,0°C. La phase mobile est constituée d'un mélange à pH=6, 50:50 de tampon phosphate 0,1M et d'ACN. L'élution isocratique est effectuée à un débit de 1,0 mL.min<sup>-1</sup> pendant 25 min avec détection de l'absorbance à 254 nm et avec un volume d'injection est de 50 µL. Pour la courbe d'étalonnage, le VRZ est dissous dans une solution de MeOH (5,0 mg.mL<sup>-1</sup>). Ensuite, sept dilutions en série dans l'eau sont préparées avec des concentrations variant de 0,2 à 10 µg.mL<sup>-1</sup>. Les injections ont été réalisées en triplicata pour chaque analyse (n= 3).

#### **2.3.7. Étude sur l'impacteur multi-étages en cascade**

L'impacteur multi-étages en cascade est un appareil permettant de simuler les 7 niveaux du poumon et permet d'évaluer le niveau pulmonaire atteint par un médicament lorsqu'il est administré au moyen d'un nébuliseur (voir figure 18).

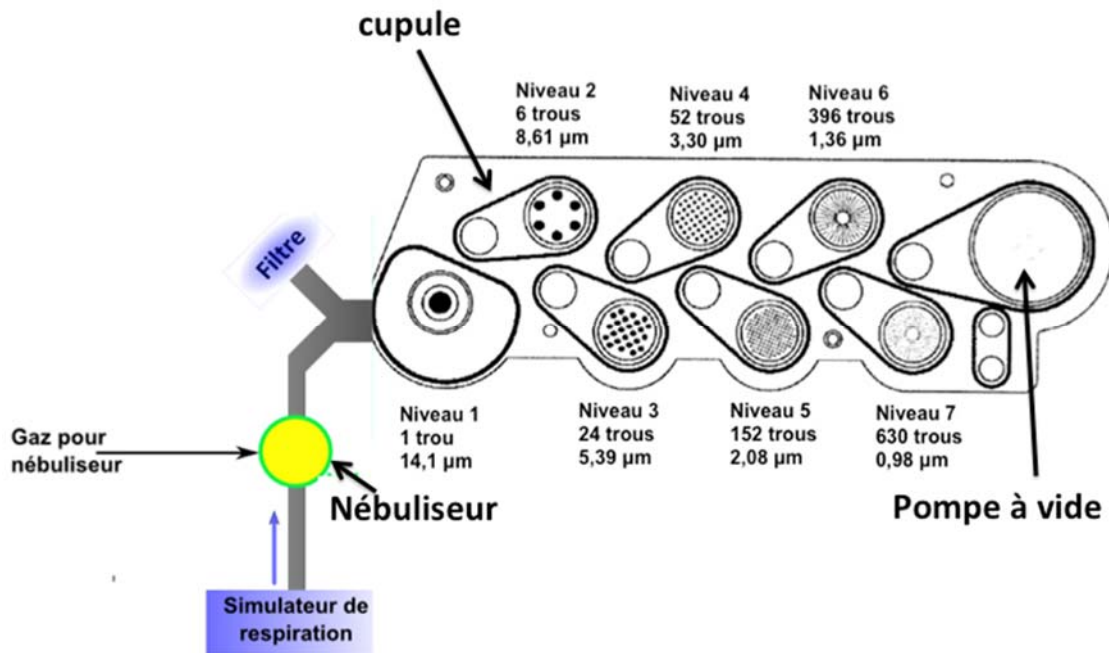


Figure 18 : Schéma de l'impacteur multi-étages en cascade. Chaque cupule est représentée selon la taille des buses

Il est important de contrôler le dépôt du médicament inhalé dans le poumon. Pour ce faire, la taille des particules est un facteur essentiel permettant de prédire l'emplacement des particules dans les poumons [110]. Elle est généralement exprimée par le diamètre hydrodynamique (HD) qui tient compte, de la taille, de la densité et de la forme des particules. Les grosses particules ( $\text{HD} > 6 \mu\text{m}$ ) ont une importante quantité de mouvement, donc une forte tendance à s'installer dans les régions supérieures des voies respiratoires. Le mouvement des particules de petite taille ( $< 1 \mu\text{m}$  HD) est plutôt régi par le mouvement brownien. La plupart d'entre elles sont expirées pendant la respiration normale. Ainsi, pour une déposition optimale des particules dans les voies respiratoires, le HD optimal doit être entre 2 et 5  $\mu\text{m}$ . Ainsi, les particules supérieures à 5  $\mu\text{m}$  seront en grande partie bloquées au niveau supérieur, entre 2 et 5  $\mu\text{m}$  elles se localiseront plus facilement dans le poumon profond, c'est à dire au niveau des bronchioles et des alvéoles [111]. Cependant, il faut noter que les particules entre 0,1  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$  peuvent être exhalées diminuant ainsi le dépôt au niveau du poumon profond. Ainsi, la nébulisation doit être adaptée pour chaque médicament de façon à produire des particules pour

un dépôt optimal à l'endroit désiré. La figure 19 représente une corrélation *in vivo/in vitro* entre les niveaux de l'impacteur à cascade et les niveaux du poumon.

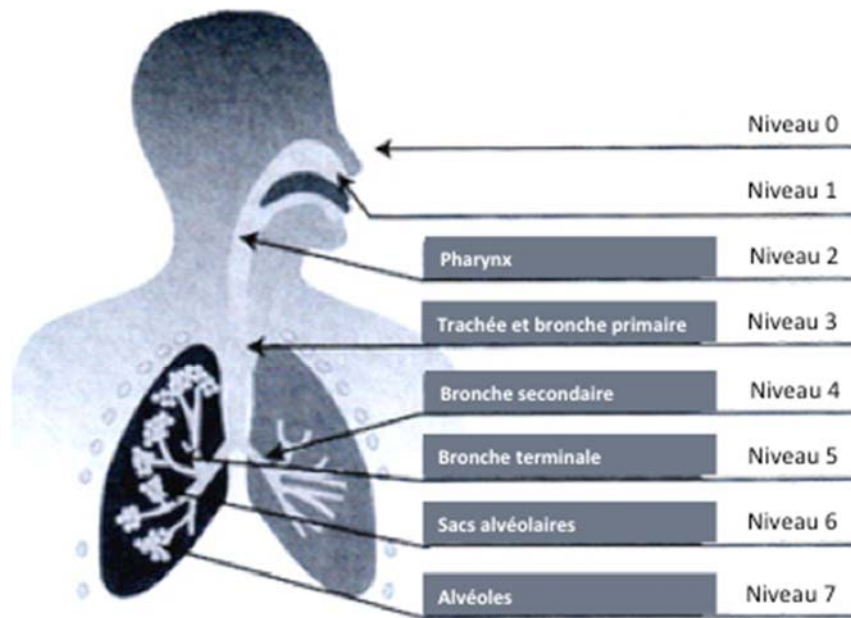


Figure 19 : Corrélation *in vivo/in vitro* entre les niveaux de l'impacteur à cascade et les niveaux du poumon [112]

Le système est soumis à un simulateur de respiration, le *Breath Simulator* (BRS Copley Scientific 1000, Nottingham Royaume-Uni) suivant un modèle respiratoire de 10 respirations par minute à 500 mL/respiration. Cinq mg d'antifongique libre (AMB) et une suspension de NP/AMB ( $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  de AMB) sont projetés à travers un nébuliseur à simple jet utilisant l'azote comme gaz porteur ( $12 \text{ L.min}^{-1}$ ) à l'intérieur de l'appareil. L'impacteur est maintenu à  $6 \text{ }^{\circ}\text{C}$  à l'intérieur d'une enceinte réfrigérée, *Copley Scientific NGI Cooler* (Nottingham, Royaume-Uni) et le flux d'air à l'intérieur de l'impacteur est maintenu à  $12 \text{ L.min}^{-1}$  à travers toutes les expériences. Le flux d'air est contrôlé par un débitmètre d'air

*Copley Scientific* (Nottingham, Royaume-Uni). La déposition des particules dans cet appareil se fait en fonction des phénomènes d'impaction ou de sédimentation, mais aussi de la viscosité du liquide. À la fin de l'expérience, le contenu de chaque cupule correspondant à un niveau différent de l'impacteur est récupéré, congelé et lyophilisé. Le contenu en AMB est déterminé par analyse HPLC. Pour la formulation NP/AMB, la quantité de AMB est déterminée après dissolution du polymère dans du DMF. La répartition du pourcentage de masse récupérée à chaque niveau de l'impacteur est comparée pour la nouvelle formulation et le principe actif en solution.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA

Le polymère a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle et sa structure est présentée à la figure 20. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du polymère est présenté à la figure 21.

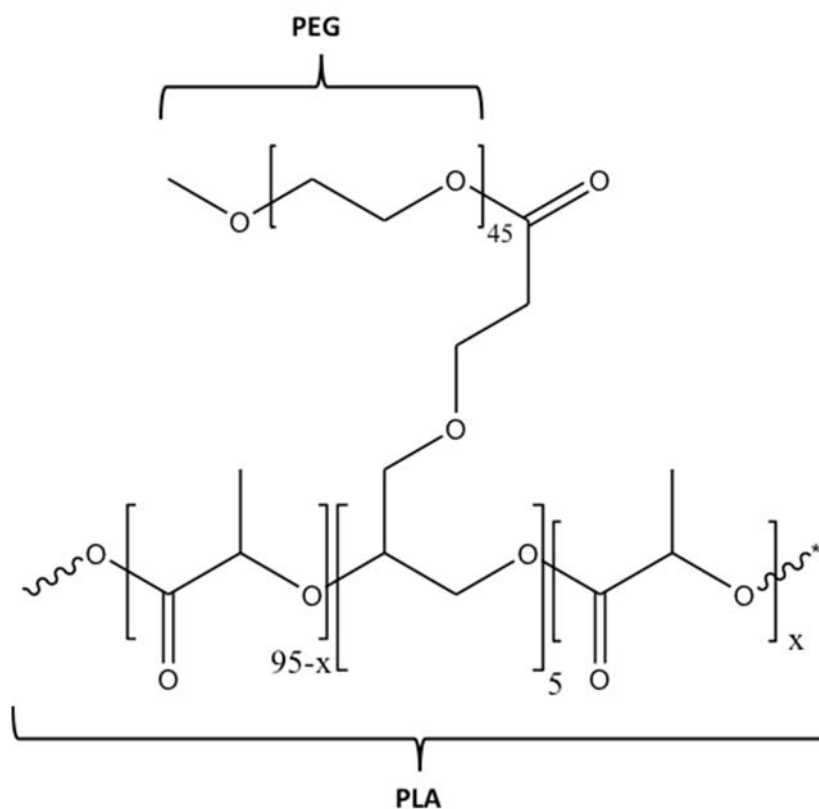


Figure 20 Structure chimique du polymère PEG-g-PLA

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  permet de confirmer la structure et de déterminer le ratio de la quantité de chaînes de PEG greffées par rapport à la quantité de chaînes de PLA. Ce polymère a déjà été étudié dans notre laboratoire et nous pouvons confirmer que le spectre présenté est identique à ceux déjà publiés dans des travaux antérieurs [107, 113]. Comme le montre la figure 21, les signaux à 5,14; 1,54 et 3,62 ppm (pics représentés respectivement par 1, 3 et 2) peuvent être attribués respectivement aux protons des groupes CH, CH<sub>3</sub> de la chaîne PLA et

CH<sub>2</sub> de la chaîne du PEG. L'intégration des pics CH et CH<sub>2</sub> a été utilisée pour calculer le pourcentage de chaînes de PEG par rapport aux chaînes de PLA et les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau 5. Le rapport calculé par RMN <sup>1</sup>H est semblable à la valeur visée expérimentalement. Cette valeur démontre que la quantité de PEG ajouté avant la copolymérisation est similaire à la proportion PEG/PLA calculée par RMN <sup>1</sup>H du produit final.

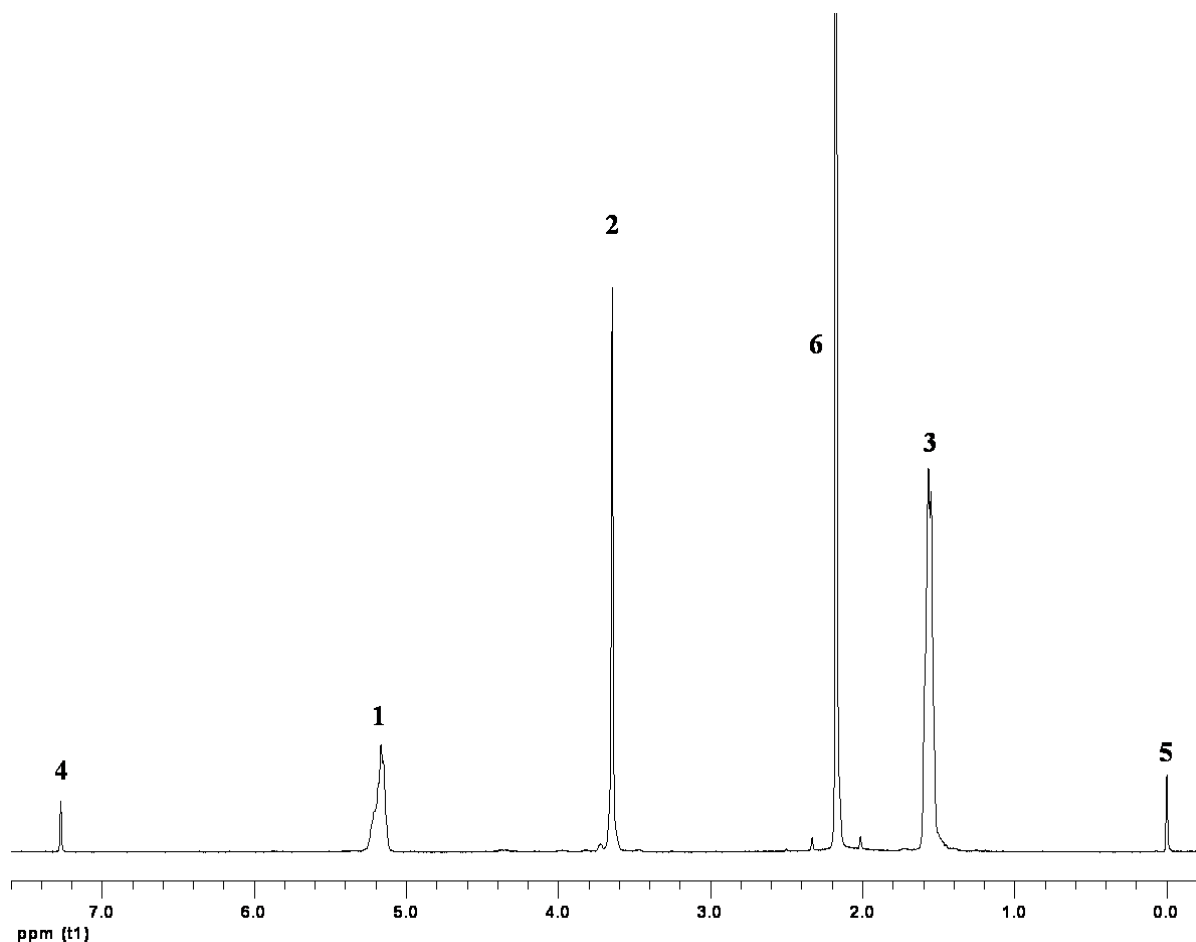


Figure 21 : Spectre RMN <sup>1</sup>H du polymère 5%PEG-g-PLA dans le CDCl<sub>3</sub>.

Les analyses par GPC permettent de déterminer la masse molaire moyenne et la polydispersité du polymère. Les résultats sont présentés au tableau 5. Nous pouvons noter l'absence de pic autour de 2000 confirmant l'absence de méthoxy-PEG n'ayant pas réagi lors

de l'étape du greffage du PEG sur la chaîne de PLA (lors de la copolymérisation). Le faible indice de polydispersité confirme que les longueurs de chaînes de polymère sont homogènes et de faible dispersion, indiquant une polymérisation contrôlée et une préparation du polymère PEG-g-PLA bien définie. Ces résultats concordent encore une fois avec les polymères déjà synthétisés dans notre laboratoire [106, 107].

Tableau 5 : Caractérisation du polymère PEG-g-PLA par GPC, DSC et RMN <sup>1</sup>H

Polymère	Greffage visé du PEG (mol%)	Greffage du PEG calculé expérimentalement (par NMR)	Mw <sup>1</sup>	Mn <sup>1</sup>	Mw/Mn <sup>2</sup>	Tg (°C)
PEG-g-PLA	5	6,1	20100	13400	1.5	35

<sup>1</sup> Analyse GPC utilisant des standards de polystyrène

<sup>2</sup> Mw/Mn=IP (index de polydispersité)

## 3.2. Fabrication et caractérisation des NP

### 3.2.1. Évaluation des propriétés physicochimiques des NP

Les vecteurs nanoparticulaires contenant les antifongiques VRZ, ITZ et AMB ont été évalués par différentes techniques. L'imagerie des NP par AFM a permis d'étudier plusieurs aspects morphologiques des NP comme la forme, les caractéristiques de surface ainsi que la mesure de la taille. Les NP montrent en général une forme plus ou moins sphérique et « crevassée » semblable à une balle de golf (figure 22). Il est intéressant de noter que les mesures de taille effectuées lors de l'imagerie des NP par AFM sont en concordance avec celles faites par DLS (voir tableau 6). Pour confirmer une valeur obtenue, il est indispensable d'utiliser au moins deux techniques différentes.

Les images d'AFM de la formulation NP/VRZ sont présentées à la figure 22. L'image de gauche (A) présente les NP en mode « phase » tandis que l'image de droite (B) présente les



NP en mode topographique. Les photos d'AFM sont conformes aux images acquises dans notre laboratoire avec des vecteurs faits à partir du même polymère [106, 113, 114]. Ils semblent être en mesure d'encapsuler différents PA et ne pas avoir d'impact sur la morphologie de surface des NP.

On peut aussi noter une tendance des NP à s'agréger, une caractéristique fréquemment rapportée par d'autres auteurs [108, 113]. L'image en phase présente des NP ayant une surface avec deux tons. Cette particularité peut être expliquée par le fait que la pointe d'AFM lors de son tapotement sur la surface, rencontre deux types de matériaux. Il est probable que ces surfaces ont différentes propriétés physicochimiques telles que différentes rigidités sur la surface. L'explication la plus plausible est que du PLA ainsi que du PEG se trouvent en surface de la NP. Ainsi, la pointe d'AFM a une affinité différente pour les 2 polymères. Il en résulte une différence de ton. Les images d'AFM pour les formulations NP/ITZ et NP/AMB ne sont pas présentées, mais elles sont similaires à celles-ci.

Toutefois, l'AFM ne permet pas de détecter de principes actifs non encapsulés se retrouvant à la surface des NP.

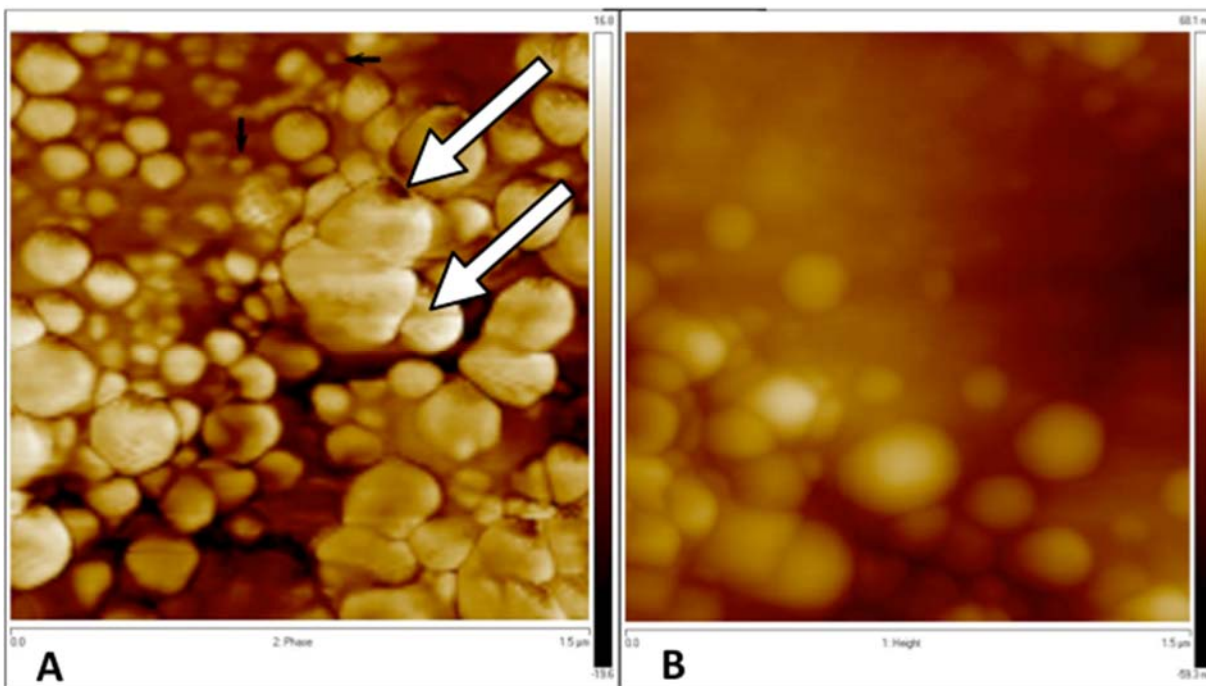


Figure 22 : Morphologie de surface de NP encapsulant du VRZ analysée par AFM. (A) représente l'image en mode phase; (B) représente l'image en mode topographique. Le champ de l'image est de 1,5 x 1,5  $\mu\text{m}$

Les valeurs de potentiel zêta sont présentées au tableau 6. Nous pouvons remarquer que pour les trois formulations, la charge en surface est neutre. Le potentiel zêta correspond au potentiel électrique mesuré au niveau du diamètre hydrodynamique de particules en suspension au sein d'un milieu liquide. Il permet de caractériser le potentiel au voisinage de la surface de la particule, en fonction de son environnement. Il est un bon indicateur des interactions possibles entre particules et donc de la stabilité des dispersions colloïdales. En principe, la mesure du potentiel zêta permet donc de prévoir le comportement des émulsions et des suspensions (stabilité, crémage, coalescence, agglutination...), et donc de résoudre certains problèmes de formulation. Les mesures ont été prises dans l'eau. Or, les formulations d'antifongique sont destinées à être nébulisées dans le poumon. Pour connaître le réel impact de la charge de la particule dans l'organisme, il faut évaluer la charge *in vivo* pour tenir compte de toutes les charges existantes. Or, il est presque impossible de faire cela. Toutefois, plusieurs études ont démontré que le PEG en surface des particules pouvait masquer la particule et ainsi contourner la reconnaissance par le système immunitaire [64, 67, 73, 74]. La

charge neutre en surface pourrait aussi venir du PVA résiduel (émulsifiant utilisé dans la préparation des NP). Plusieurs études ont démontré qu'il a un effet masquant [115, 116]. Il est donc important de le quantifier pour déterminer l'apport du PVA dans la mesure du potentiel zêta. Des études précédentes par dosage colorimétrique sur des NP similaires ont démontré que le pourcentage de PVA en surface des NP représentait environ 6% m/m [108].

Plusieurs études ont montré que des particules à base de PLA sont soumises à une clairance systémique rapide en raison de leurs surfaces lipophiles et de l'opsonisation. Avec la présence de PEG en surface, les interactions avec les protéines sont réduites au minimum, ce qui conduit à un temps de séjour prolongé des particules dans l'organisme [71, 72, 117].

Les études de quantification des antifongiques ont été effectuées par HPLC et les résultats sont présentés au tableau 6. Comme nous pouvions le prédire, le taux d'encapsulation des PA est influencé par la solubilité des principes actifs dans la phase organique lors de la fabrication des NP (à l'étape de l'émulsion). On remarque que l'efficacité d'encapsulation du VRZ est le plus faible et que la meilleure efficacité d'encapsulation est obtenue pour l'AMB qui est de 25 %. Cette différence du taux de rendement entre les trois principes actifs peut être facilement expliquée par l'affinité entre les PA et le polymère. Le VRZ étant le PA le moins hydrophobe ( $\log P$  1,8) et le plus soluble dans l'eau, lors de l'émulsion à haute pression, il aura une plus grande affinité pour la phase aqueuse que pour la phase organique. Le même raisonnement peut être appliqué pour l'ITZ et l'AMB. L'ITZ et l'AMB sont très hydrophobes et pratiquement insolubles dans l'eau. Ils auront une meilleure affinité pour la phase organique (et le PLA) que pour la phase aqueuse. Ceci explique le résultat d'une meilleure efficacité d'encapsulation.

Tableau 6 : Caractérisation des NP

<b>Formulation</b>	<b>Taille±É.T.<sup>1</sup> (nm)</b>	<b>PdI<sup>2</sup></b>	<b>% CT<sup>3</sup> (%m/m)</b>	<b>% LE<sup>4</sup> (%m/m)</b>	<b>%EE<sup>5</sup> (%m/m)</b>	<b>Potentiel zeta (mV)</b>	<b>Rdt<sup>6</sup> (%m/m)</b>
BI-NP	132±3	0,16	-	-	-	-2.2±0.3	20 %
NP/VRZ	167±5	0,08	10 %	1,3±0,5	13,2±0,2	-5,7±1,0	18,2 %
NP/ITZ	177±2	0,03		23,0±1,2	230,5±1,2	-7,4±1,3	15,3 %
NP/AMB	185±7	0,10		25,3±1,7	250,1±2,2	-8,7±1,7	8,7 %

n=3

<sup>1</sup> Écart-type sur moyenne des tailles par DLS<sup>2</sup> Indice de polydispersité<sup>3</sup> % Chargement théorique<sup>4</sup> Efficacité de chargement<sup>5</sup> Efficacité d'encapsulation<sup>6</sup> Rendement de fabrication des NP

L'utilisation de l'analyse thermique a permis de déterminer l'état de dispersion des principes actifs dans la matrice polymérique PEG-g-PLA et les graphiques sont présentés aux figures 23 à 25. Deux balayages thermiques ont été effectués pour chaque échantillon. Toutefois, seul le premier balayage a été rapporté dans les résultats (le deuxième balayage a toutefois confirmé l'absence de solvant résiduel). Les trois graphiques présentent les courbes de DSC obtenues pour PA pur, le mélange physique du PA et polymère et enfin le PA encapsulé dans des NP. Il est important de spécifier que lors de la préparation des échantillons en mélange physique, la même proportion de PA a été utilisée que lorsque le PA est encapsulé. Aucun des lots de NP ne présente de signaux d'une transition de phase pour leur principe actif respectif. Ceci signifie que les PA existent soit sous forme d'une dispersion moléculaire dans la matrice polymérique ou soit que la présence de cristaux de principe actif est trop faible pour être détectée par analyse thermique. Il y a aussi la possibilité que les PA se trouvent sous forme amorphe. De plus, on peut remarquer que l'intensité des pics de fusion pour les mélanges physiques et pour les nouvelles formulations est beaucoup plus faible que les pics de fusion des polymères pur. En effet, le polymère pur PEG-g-PLA contient dans sa structure certains domaines de cristallinité. Lorsque le polymère se trouve sous forme de NP, il perdra

un peu de sa cristallinité. Lors de la préparation des NP, le PA et le polymère sont dissous dans une phase organique préalablement avant d'être émulsionnés dans une phase aqueuse (contenant un surfactant). Lors de la dissolution du PA et du polymère dans la phase organique, il y aura réarrangement des chaînes de polymère. Ce réarrangement des chaînes, dû à la présence de PA (et interactions avec le polymère) et de résidu d'émulsifiant PVA, aura un impact sur l'intensité du pic de fusion.

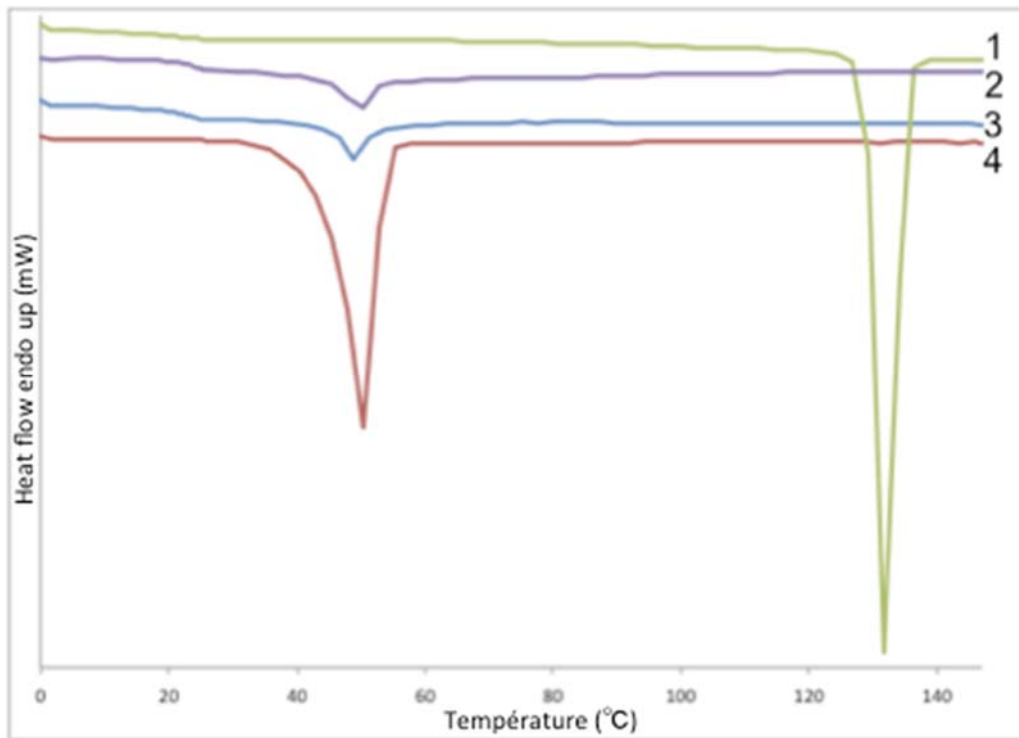


Figure 23 : Analyse thermique du VRZ (1), VRZ/NP (2), mélange physique du VRZ et polymère PEG-g-PLA (3) et du polymère seul PEG-g-PLA (4)

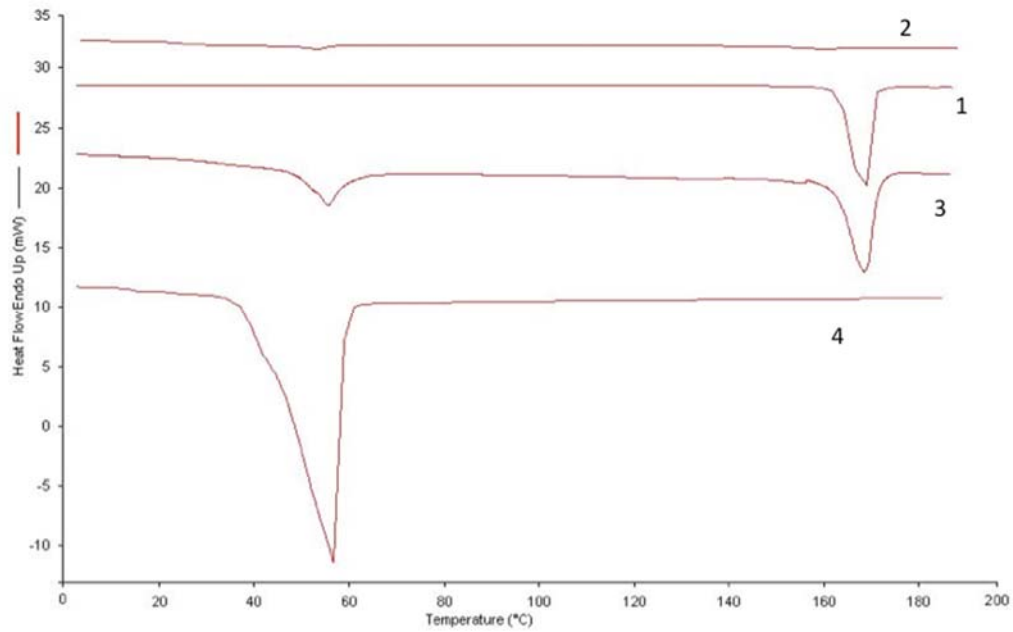


Figure 24 : Analyse thermique du ITZ (1), ITZ/NP (2), mélange physique du ITZ et polymère PEG-g-PLA (3) et du polymère seul PEG-g-PLA (4)

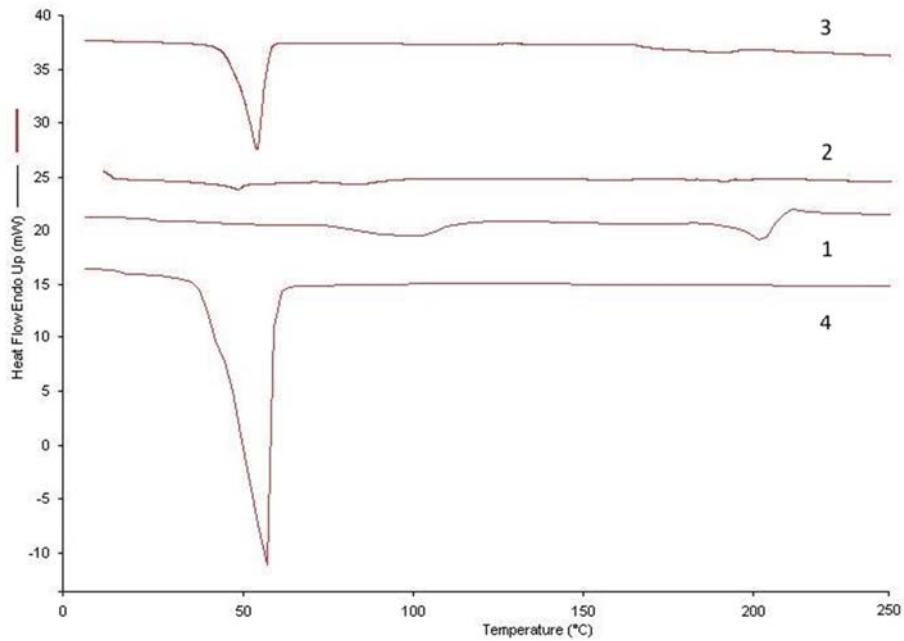


Figure 25 Analyse thermique du AMB (1), AMB/NP (2), mélange physique du AMB et polymère PEG-g-PLA (3) et du polymère seul PEG-g-PLA (4)

### 3.2.2. Études des profils de libération

Le polymère ayant une masse molaire d'environ 15 kDa, il ne peut traverser la membrane : seule le PA libéré des NP passera à l'extérieur de la membrane, tandis que les NP intactes resteront dans la membrane de dialyse.

Le profil de libération prolongée de chaque antifongique est présenté aux figures 26, 27 et 28. Nous pouvons remarquer que les profils de libération obtenus sont généralement conformes à l'observation habituelle. On observe un effet *burst* (libération rapide du PA) variable suivi par une libération plus lente pour les trois antifongiques.

Concernant les antifongiques, il est probable que l'état de dispersion de l'agent a surtout influencé la phase initiale de sa libération. Les profils de libération *in vitro* obtenus avec les NP montrent un *burst* de 20% à 45% dans les premières 24 h selon le lot ce qui est très conforme à ce que l'on observe dans la littérature [118]. Pour toute la période de l'étude, la libération de l'AMB à partir des NP a été plus lente par rapport aux deux autres PA. On pense que l'affinité de l'agent lipophile pour le PLA du polymère est responsable d'un tel ralentissement. Par ailleurs, l'effet *burst* est sûrement dû à la dissolution d'une quantité de principe actif facilement accessible au milieu ou simplement adsorbée en surface des NP. Nous pouvons aussi remarquer que le profil de libération de l'ITZ est un peu différent de celui du VRZ. Étant donné que la solubilité de l'itraconazole dans l'eau est de 1-4 ng.mL<sup>-1</sup>, il est fort probable que les conditions *sink* ne soient pas respectées. Dans ce cas, la libération de l'ITZ est limitée par sa solubilité.

Après l'effet *burst*, on observe par la suite une libération plus lente des antifongiques, possiblement par diffusion à travers les micropores de la matrice de PLA. Certains auteurs ont rapporté que l'incorporation d'un copolymère pegylé dans la fabrication des nanoparticules permet une accélération de la libération des PA en facilitant l'infiltration du milieu aqueux dans la matrice polymère [107, 119].

Finalement, nous pouvons remarquer que l'effet *burst* de l'AMB est moins prononcé que les autres PA. Cela est probablement dû à la localisation moins importante du PA près de la surface des NP. Il est aussi important de noter qu'avec une solubilité aqueuse de  $750 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , il est fort probable que les conditions *sink* ne soient pas respectées. Ce biais pourrait expliquer le plateau obtenu à 60 % pour la formulation NP/AMB.

Il est bien établi dans la littérature que les études de libération des PA des NP se déroulent sous forme de plusieurs phases successives [106, 108, 118, 120, 121]. Ce phénomène peut être expliqué, en partie, par l'implication de phénomènes tels que la désorption/dissolution du PA, la diffusion au travers des micropores et des mésopores, ou encore par l'érosion de la matrice polymérique. La superposition de ces processus rend l'interprétation de la cinétique de relargage un sujet complexe. Dans bien des cas, il est laborieux de distinguer l'implication de chaque phénomène physicochimique impliqué dans le relargage (érosion, diffusion simple, diffusion en milieu confiné, gonflement du polymère, relaxation des chaînes polymériques). Toutefois, on peut affirmer que les profils obtenus sont en adéquation avec les prévisions faites sur ces nanotechnologies, c'est à dire des systèmes qui libèrent des PA sur plusieurs jours dans le but de réduire les doses administrées.



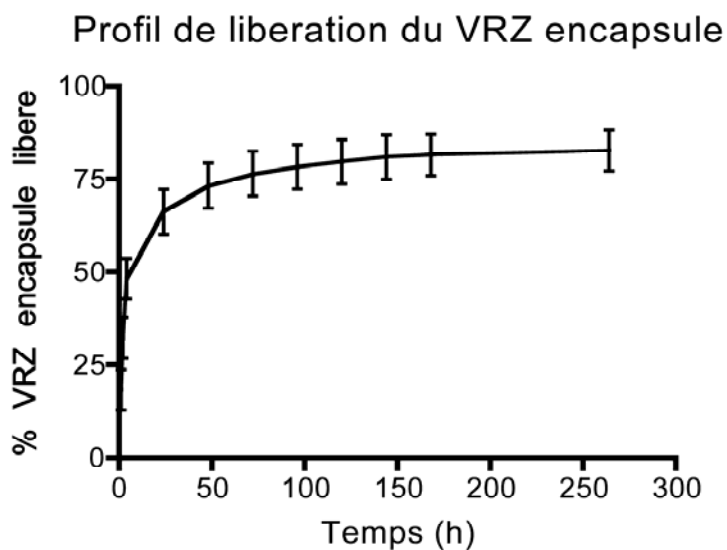


Figure 26 Profil de libération du VRZ encapsulé (pH 7.4, 37 °C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3)

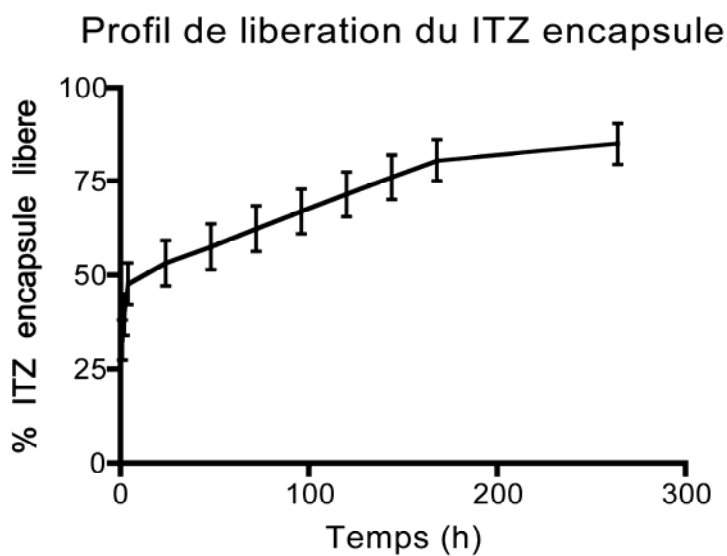


Figure 27 : Profil de libération de l'ITZ encapsulé (pH 7,4, 37 °C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3)

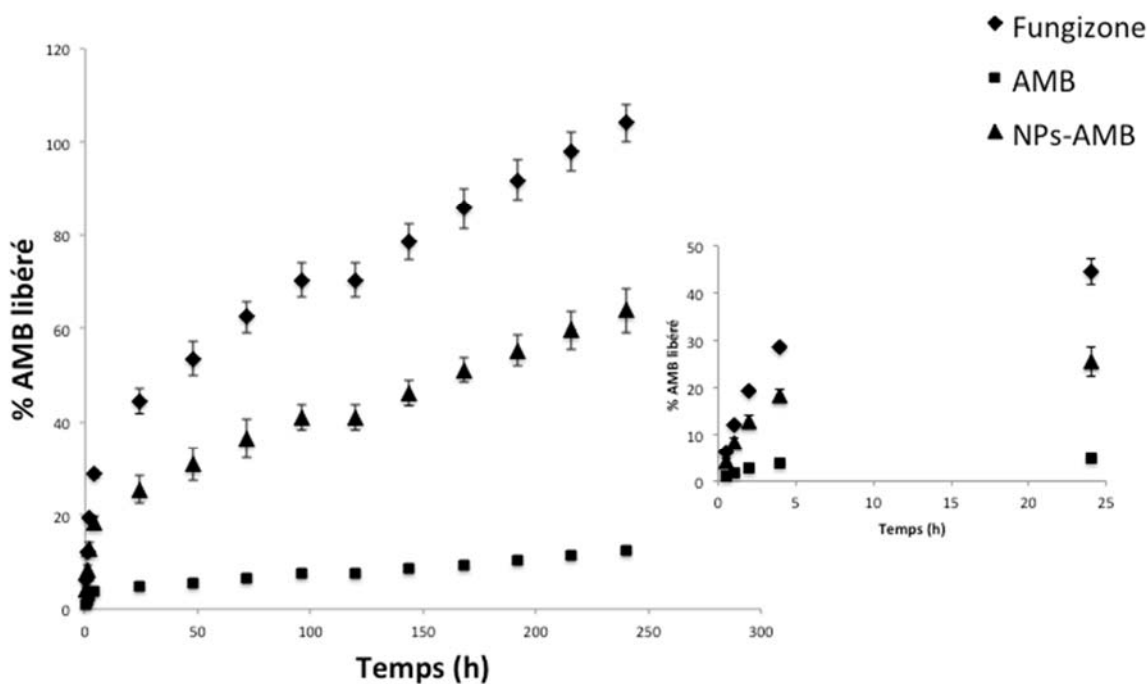


Figure 28 : Profil de libération de l'AMB encapsulé (pH 7,4, 37 °C). Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3)

### 3.2.3. Étude des profils de déposition des NP sur un modèle *in vitro* de poumons; l'impacteur en cascade

Pour prédire au mieux le dépôt d'un médicament nébulisé dans les voies pulmonaires, et donc son site d'action, il est nécessaire d'évaluer les propriétés physiques de l'aérosol. Les particules constituant un aérosol peuvent être caractérisées selon leur diamètre aérodynamique qui reflète leur dépôt dans l'arbre pulmonaire. La taille des particules constituant l'aérosol varient selon des caractéristiques telles que la densité des gouttelettes (donc dépend de la nature de la molécule constituant le liquide) et du type de nébuliseur utilisé. Pour ces raisons, une étude avec un impacteur en cascade a été réalisée pour évaluer la répartition des particules d'aérosol de la nouvelle formulation NP/AMB selon leur taille après nébulisation. L'impacteur en cascade est constitué de plusieurs plaques percées de fentes de taille de plus en plus petites et traversées par un flux d'air (chaque étage correspondant à un diamètre de coupure) (figure

18). Les particules de masse définie contenant l'AMB vont s'impacter sur les plaques d'impaction correspondant à leur diamètre de coupure. Ainsi, les gouttelettes de rayon plus grand (et par conséquent ayant une densité plus importante) seront arrêtées sur les premières plaques. Et inversement, celles au rayon plus petit s'arrêteront sur les dernières plaques. La quantité d'AMB déposée sur chaque étage de l'impacteur est dosée par HPLC.

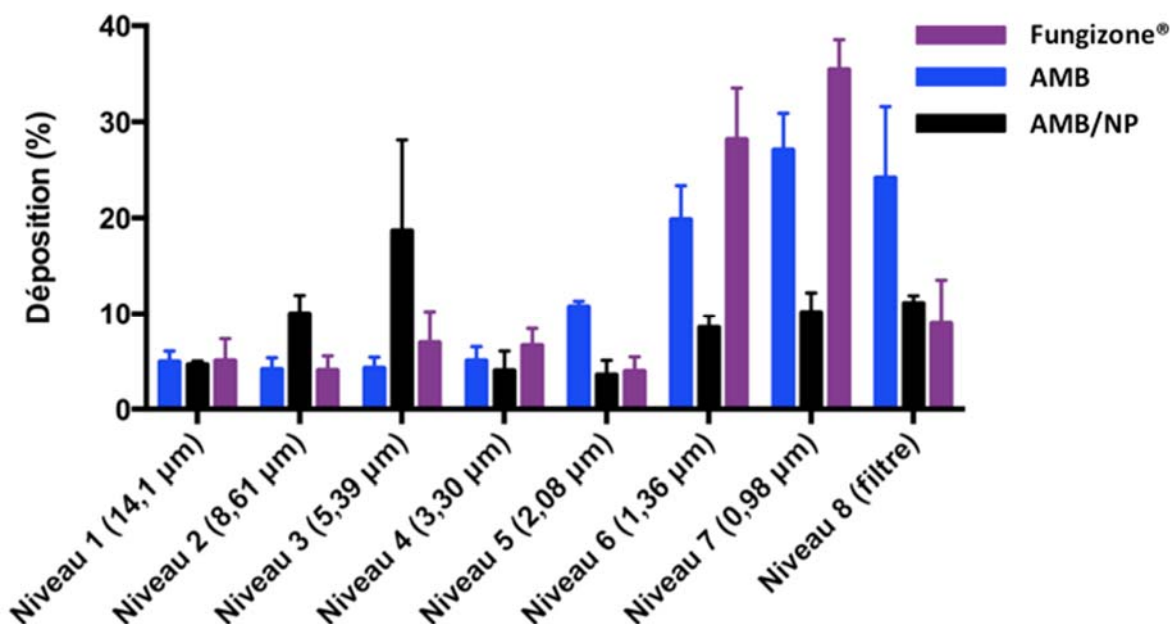


Figure 29 : Pourcentage de déposition en fonction des différents niveaux de l'impacteur en cascade.

Il est important de mettre les valeurs obtenues en perspective, car l'étude a été réalisée à une température de 6 °C, ce qui ne correspond pas à la température des voies respiratoires (37 °C et 100% humidité relative)

Les résultats sont présentés à la figure 29. On peut remarquer que lorsque la nanoformulation NP/AMB est nébulisée, elle crée des gouttelettes de taille pouvant atteindre les voies aériennes (niveau 2/3 & niveaux 6/7). Par contre, pour la solution de Fungizone®, la

formulation ne semble pas cibler les bronches, ce qui n'est peut-être pas optimal (niveaux 6/7). Il faut aussi noter que lors de la nébulisation de la solution de Fungizone®, il y a eu formation de mousse. Naturellement, la formation de mousse engendre un dépôt dans le montage de l'impacteur en cascade avant même d'atteindre les cupules. On peut penser que *in vivo* la formation de mousse engendrerait un dépôt dans la région de l'oropharynx, donc une diminution du dépôt dans la région pulmonaire. Forcément, cela peut amener à une absorption dans le tube gastro intestinal et engendrer une toxicité.

Finalement, les résultats de l'AMB pure en solution démontrent que la distribution n'est pas optimale. Pour éviter la précipitation de l'AMB, nous l'avons solubilisé dans un mélange de H<sub>2</sub>O et de MeOH. Cet ajout a probablement changé la viscosité du mélange et forcément cela a eu un impact sur sa distribution dans l'impacteur en cascade.

## **4. Conclusion**

En conclusion, nous avons démontré qu'il est possible d'encapsuler efficacement des antifongiques dans des NP. Le polymère PEG-g-PLA est employé pour la première fois comme vecteur dans la préparation de NP destinées pour la voie pulmonaire. Ces nouvelles formulations ont un potentiel prometteur dans le traitement d'infection pulmonaire, d'autant plus que ce polymère a déjà été évalué pour son innocuité [122]. Nous avons démontré qu'il était possible de nébuliser une formulation de NP d'antifongique à l'endroit désiré, c'est à dire dans les bronches, l'endroit où se situent majoritairement les infections pulmonaires. Toutefois, ces résultats demeurent préliminaires et d'autres travaux sont nécessaires afin d'élucider le comportement des NP lors de la nébulisation des formulations dans le poumon humain.

**Chapitre 4. Effet de l'activité des nouvelles formulations  
d'antifongiques sur des souches résistantes ou sensibles de  
*Candida spp.* ainsi que d'*Aspergillus spp.***

## 1. Introduction

Pour traiter les infections fongiques, l'AMB est généralement le traitement de choix car très peu de souches présentent des formes de résistance [123]. Quelques études ont montré que l'AMB destinée à l'injection peut être aussi efficace lorsqu'elle est administrée par d'autres voies pour le traitement de certains types d'infections fongiques [124, 125]. Par exemple, il est possible d'administrer de l'AMB par aérosol (nébulisation) dans le traitement des infections fongiques des poumons [126]. Malheureusement, les effets secondaires de ce principe actif sont graves et potentiellement mortels. Par voie systémique, l'AMB présente de nombreux effets secondaires tels que l'hypersensibilité, l'insuffisance rénale, torsades de pointe. Certains effets secondaires (frissons, fièvre, céphalées) peuvent évoluer vers des manifestations plus graves telles qu'une gastro-entérite hémorragique, un choc anaphylactique, un collapsus cardio-vasculaire [54, 127]. D'autre part, les molécules de la classe des azolés, (fluconazole, itraconazole (ITZ), voriconazole (VRZ) et posaconazole) présentent une toxicité plus faible [128]. Cet aspect associé à leur bonne efficacité a contribué à accroître leur utilisation. Récemment, certaines études rapportent des cas de patients qui n'ont pas répondu aux traitements antifongiques, principalement en raison du développement de la résistance et/ou de l'apparition de biofilms fongiques [129, 130].

Les souches formant des biofilms ont des caractéristiques structurales et des propriétés phénotypiques différentes des souches sous forme planctonique. En effet, les biofilms se définissent comme des arrangements très organisés de levures attachées les unes aux autres et confinées dans une matrice polymérique extracellulaire ayant une épaisseur variant entre 50 et 350  $\mu\text{m}$  [23-26, 28, 29, 131-133]. Ces caractéristiques font en sorte qu'il est très difficile d'éradiquer les biofilms puisqu'ils sont résistants à la plupart des traitements antifongiques incluant les azolés, l'AMB et la flucytosine [27]. Les valeurs de concentration minimale inhibitrice à 50% (CMI50) peuvent être augmentées de 10 fois comparées aux valeurs des CMI50 pour des cellules sous forme planctoniques [134]. Plusieurs patients immunodéprimés au centre hospitalier universitaire (CHU) de Nantes ont développé des biofilms de *Candida albicans* suite à l'utilisation de dispositifs médicaux tels que des cathéters. Par conséquent, des

doses plus élevées d'antifongiques ont été nécessaires pour éradiquer ces infections fongiques, conduisant à des effets secondaires importants. Malgré tout, les traitements antifongiques ont échoué chez certains patients.

Tel que discuté dans le chapitre précédent, les NP composées de PLA-g-PEG, sont utilisées pour la livraison de principe actif en raison de leur nature biodégradable, biocompatible et de leurs propriétés de libération contrôlables [82, 106, 108, 135]. Les groupes pendants tels que les chaînes de PEG modifient les propriétés de libération du médicament et les caractéristiques de surface des particules. Toutes ces raisons nous ont conduits à proposer l'encapsulation de VRZ, ITZ et AMB dans des NP polymériques composées de co-polymères PEG-g-PLA, afin d'améliorer l'activité antifongique contre des souches de *Candida spp* et des souches d' *Aspergillus spp*. L'objectif ultime est de réduire la dose thérapeutique efficace de l'AMB et du VRZ sur le biofilm de *Candida spp*.

Avant de présenter les résultats d'efficacité *in vitro* obtenus, il est important de mettre en contexte l'origine des tests *in vitro* qui ont été effectués à partir d'un mode opératoire standardisé provenant du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Le CLSI, connu précédemment comme le NCCLS, est une organisation internationale, interdisciplinaire, à but non lucrative et reconnue mondialement, qui favorise le développement et l'utilisation de normes et de lignes directrices consensuelles volontaires au sein de la communauté médicale.

Les documents du CLSI sont ainsi élaborés par des comités d'experts dans différentes activités médicales, telles que le dépistage, la microbiologie, l'hématologie ou autres activités connexes. La principale responsabilité des comités est de rédiger des documents avec consensus, évaluer et traiter les commentaires reçus de la communauté scientifique. L'élaboration des normes est un processus dynamique et en constante évolution.

Parmi ces documents, on retrouve les tests de sensibilité aux antifongiques, dont le document M27-A2, un test de macrodilution. Ceux-ci sont devenus des outils importants pour

les médecins confrontés à la prise de décisions cliniques difficiles concernant les patients atteints d'infections fongiques. Le CLSI a approuvé des méthodes d'analyse pour deux levures et pour les moisissures.

Il est important de mentionner qu'aucune formulation de nanoparticules polymériques d'antifongiques décrite dans la littérature n'a jamais été testée par des procédures standardisées de sensibilité aux antifongiques. Cette façon de faire, qui n'a jamais été évaluée auparavant, donnera à la communauté scientifique un point de comparaison intéressant et essentiel entre les antifongiques généralement administrés et les formulations en développement. Ce point de comparaison est une plus-value et permettra de démontrer le potentiel des nanovecteurs dans le domaine de la mycologie.

Pour les besoins de cette thèse, une partie des tests de sensibilité aux antifongiques ont été effectués à Nantes au laboratoire du Pr. Patrice LePape. La seconde partie des tests antifongiques a été effectuée au laboratoire du Pr. Martine Raymond de l'IRIC à Montréal. Il est important de noter que le même protocole a été utilisé dans les deux laboratoires.



## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Paramètres du protocole NCCLS

La méthode de référence américaine est le document NCCLS M27-A2. C'est en 1982 que le *Subcommittee on Antifungal Susceptibility Test* du NCCLS a débuté des études multicentriques pour standardiser les différents paramètres intervenant dans les tests de sensibilité des champignons aux antifongiques. Le document a été amélioré depuis. Son utilisation permet d'établir ou de fixer les paramètres susceptibles de faire varier la reproductibilité de la méthode. Cette méthode spécifie la taille de l'inoculum et la manière de le préparer; le milieu de culture à utiliser, la température et la durée d'incubation ainsi que la méthode et les points de lecture pour différents antifongiques. Ses paramètres sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Paramètres techniques de la méthode du NCCLS M27-A2

<b>Paramètres standardisés du NCCLS M27-A2</b>	
Microorganismes	Levures de types <i>Candida spp.</i> et <i>Aspergillus spp.</i>
Taille de l'inoculum	$0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ cellules.mL <sup>-1</sup>
Milieu de culture	RPMI 1640 tamponné à pH 7,0 avec 0,165M de MOPS
Format	Microdilution dans des plaques 96 puits
Durée de l'incubation	24 ou 48 h ( <i>Candida spp.</i> ), 48 h ( <i>Aspergillus spp.</i> )
Température de l'incubation	35 °C
Point de lecture	50% d'inhibition de pousse pour les azolés et amphotéricine B
Contrôles de qualité	<i>C. krusei</i> ATCC 6258, <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, AF 7 et AF 350
Antifongiques testés	Voriconazole, Itraconazole et Amphotéricine B

## 2.2. Origine des souches de référence

Pour les analyses sur les espèces de *Candida*, deux souches de référence ont été choisies, soient le *Candida krusei* ATCC 6258 et le *Candida parapsilosis* ATCC 22019 [136]. Ces souches contrôles sont recommandés par le NCCLS pour l'étude de la sensibilité aux antifongiques, soit le voriconazole, l'itraconazole et l'amphotéricine B. Pour les contrôles d'*Aspergillus fumigatus*, 2 souches du laboratoire de mycologie de Patrice LePape ont été utilisées comme contrôle soient les souches AF 7 et AF 350.

## 2.3. Origine des souches cliniques

En ce qui a trait aux tests effectués à Nantes, plusieurs souches présentant une résistance aux polyènes et aux azolés ont été sélectionnées. Toutes les souches planctoniques de *C. albicans* (n=4) ont été isolées du sang de patients du CHU Hôtel-Dieu de Nantes (CAAL67, CAAL74, CAAL76) sauf la souche DSY 735 qui a été isolée et identifiée par Dr Sanglard du CHU de Lausanne.

Pour les souches formant du biofilm, six souches de *Candida spp.* ont été isolées du sang des patients du CHU Hôtel Dieu de Nantes (ca134, ck818, ca845, ca073, ct366, ct573).

Pour les souches d'*Aspergillus fumigatus* (n=4), elles ont été isolées par lavage des fluides bronchoalvéolaires de patients du CHU Hôtel-Dieu de Nantes. Les souches sont conservées à +4 °C au laboratoire de mycologie du Pr. Patrice LePape jusqu'à leur utilisation. Les souches sontensemencées sur milieu Sabouraud à 37 °C pendant 24 h. C'est à partir de cette culture que sera préparé l'inoculum.

Des études sur la sensibilité des champignons aux antifongiques ont aussi été effectuées sur une souche du laboratoire du Pr. Martine Raymond de l'IRIC. La souche 5674 a été isolée d'un échantillon provenant de la région buccale. Cette souche provient de la banque du laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ). Cette souche a été caractérisée et est

résistante aux azolés. Les gènes CDR1 et CDR2, gènes codant dans les pompes d'efflux, sont surexprimés [137, 138]. Pour l'*Aspergillus nidulans*, la souche R153 a été isolée d'un échantillon de la bouche. Cette souche provient aussi du LSPQ.

Pour la souche de *Candida albicans* du laboratoire du Pr. Martine Raymond, des CMI50 ont été effectuées et rapportées dans la littérature [138]. Le tableau ci-dessous présente les CMI50 attendues pour les antifongiques évalués.

Tableau 8 : Valeur des CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de différents principes actifs après 48 h de traitement, tiré de la ref. [138]

Souche	CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					
	ITC <sup>1</sup>	AMB	FLC <sup>2</sup>	KTC <sup>3</sup>	FPZ <sup>4</sup>	R6G <sup>5</sup>
5674	0,2	2	150	0,6	75	16

<sup>1</sup> : itraconazole; <sup>2</sup> : fluconazole; <sup>3</sup> : ketoconazole; <sup>4</sup> : fluphenazine; <sup>5</sup> : rhodamine 6G

## 2.4. Description du protocole NCCLS

### 2.4.1. Milieu de culture et préparation de l'inoculum

Selon le protocole du NCCLS, le milieu de culture utilisé sera le RPMI 1640 déshydraté (GibcoBRL, Life Technologie), avec présence de L-glutamine mais sans bicarbonate. Ce milieu est tamponné avec du MOPS (3 N-morpholino propane sulfonique) (Grosseron) à une concentration de 0,165M. Le pH du milieu doit être ajusté à pH 7,0 avec une solution de NaOH 10M. Le milieu passera d'une couleur jaunâtre à une couleur rose. Finalement, le milieu doit être stérilisé sur un filtre 0,22  $\mu\text{m}$  et conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

Pour les études menées sur les souches de l'IRIC, le milieu YPD supplémenté avec 2% (v/m) de glucose a été utilisé tel que dans la référence [138].

Il est important de noter que l'inoculum de levures doit être préparé à partir de colonies datant de 24 h. Un prélèvement « scoop » de colonies est mis en suspension dans 5 mL de PBS. Cette suspension fongique est agitée au vortex. La densité cellulaire est mesurée à l'aide d'une cellule de Malassez. La suspension initiale doit être diluée pour obtenir une première suspension à  $1 \text{ à } 5 \times 10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$ . Ensuite, on diluera par 2 la suspension pour obtenir une concentration finale avoisinant  $1 \text{ à } 5 \times 10^3 \text{ cellules.mL}^{-1}$  dans du RPMI (ou YPD).

Cet inoculum servira à ensemercer les plaques (figure 30). Il doit être utilisé dans les 15 minutes ou doit être conservé au frigo à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  pour un maximum de 2 h. Dans la plaque 96 puits, les colonnes 3 à 12 reçoivent  $100 \text{ }\mu\text{L}$  d'inoculum. Ainsi, dans les puits des colonnes 3 à 12, on obtient une concentration fongique finale de  $0,5 \text{ à } 2,5 \times 10^3 \text{ cellules.mL}^{-1}$  (figure 31).

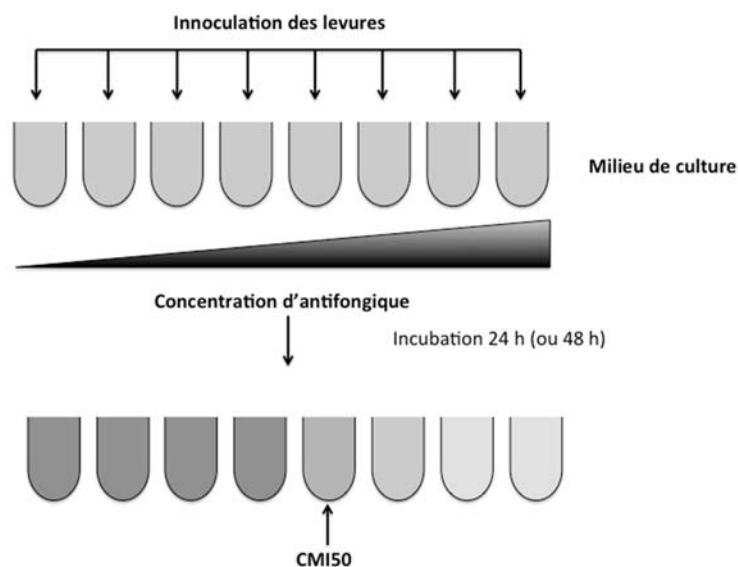


Figure 30 : Schéma d'innoculation des levures et ajout d'antifongique selon un gradient de concentration

Les tests seront effectués dans des plaques 96 puits où les puits de la colonne 1 et 2 recevront 100  $\mu$ L de RPMI (ou YPD) et serviront de contrôle de stérilité du milieu. Les plaques seront incubées à 35 °C pendant 24 ou 48 h (figure 31).

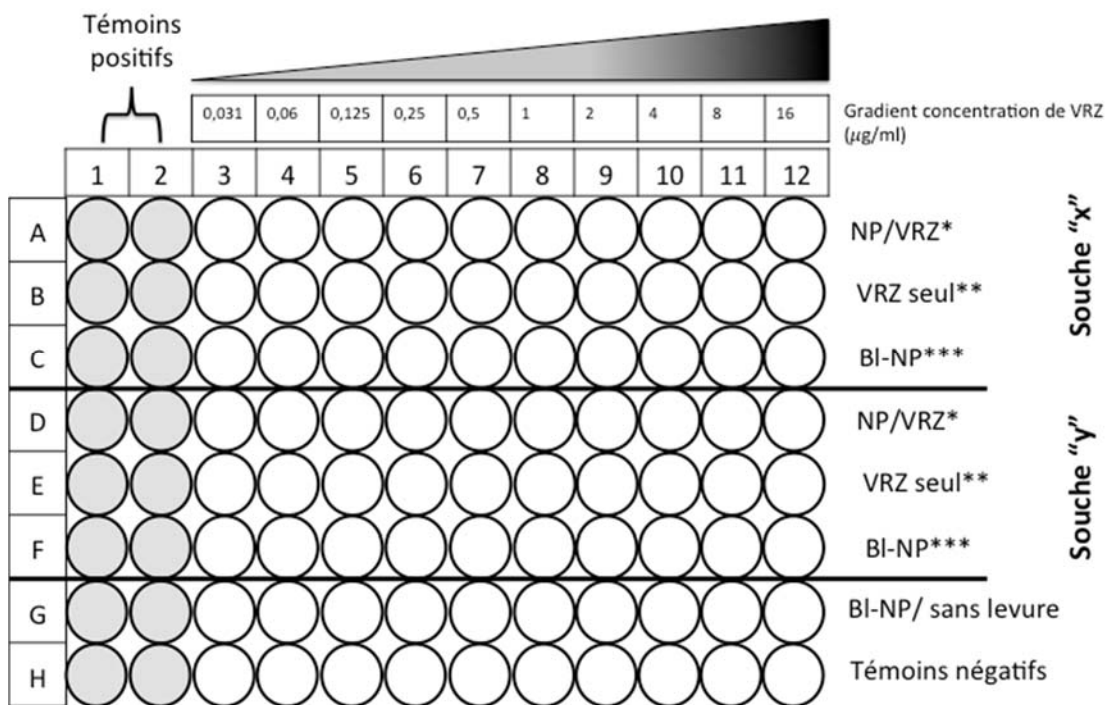


Figure 31 : Schéma représentatif sur microplaque 96 puits pour les tests de susceptibilité aux antifongiques. Les puits témoins positifs ne contiennent pas d'antifongique. Les puits témoins négatifs ne contiennent pas de levures. \* selon l'expérience, peut être remplacé par NP/ITZ ou NP/AMB. \*\* selon l'expérience, peut être remplacé par ITZ seul ou AMB seul. \*\*\*La quantité de BI-NP de chaque puit des colonnes 3 à 12 correspond à la même quantité en poids de NP dans NP/VRZ pour chaque puit des colonnes 3 à 12.

#### 2.4.2. Préparation des gammes de concentrations d'antifongiques

Pour effectuer les tests de sensibilité aux antifongiques, des plaques stériles Nunc 96 puits, à fond plat, seront utilisées. Dans chaque plaque, il y aura un témoin de stérilité du milieu contenant seulement du milieu RPMI (ou YPD) sans antifongique.

Les concentrations à tester doivent encadrer les concentrations seuils et les valeurs de (CMI) attendues pour les deux souches de contrôle qualité, mais également correspondre à des taux plasmatiques efficaces.

Les gammes de concentrations finales suivantes seront utilisées pour les différents antifongiques :

Tableau 9 Gammes de concentrations des différents antifongiques\*

<b>Antifongiques</b>	<b>Gamme de concentrations (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Voriconazole	0,015 à 8
Itraconazole	0,0313 à 16
Amphotéricine B	0,0313 à 16

\* Au final, les puits 3 à 12 (figure 31) pour les antifongiques seul en solution contiendront 1% de DMSO

Pour préparer les dilutions du VRZ, une gamme de 10 dilutions en série de 0,313 à 16 mg.L<sup>-1</sup> seront effectuées à partir d'une solution mère de 800 mg.L<sup>-1</sup>. Pour l'ITZ et AMB, 10 dilutions en série de 0,0625 à 32 mg.L<sup>-1</sup> seront effectuées à partir de la solution mère à 1600 mg.L<sup>-1</sup>. Les solutions mères seront préparées dans du DMSO pour s'assurer de la dissolution complète du principe actif.

Lors de la préparation des plaques 96 puits, il est important de spécifier que l'antifongique sera dilué de moitié lors de l'ajout de l'inoculum. Ainsi, la gamme de concentrations finales lors des tests sera de 0,0313 à 16 mg.L<sup>-1</sup> pour l'ITZ et l'AMB et de 0,015 à 8 mg.L<sup>-1</sup> pour le VRZ (tableau 10). La concentration finale en DMSO est de 1%.

Tableau 10 : Préparation des gammes de dilution des PA dans une microplaque 96 puits (concentrations finales)

<b>Puits<sup>1</sup></b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
Concentration VRZ mg.L <sup>-1</sup>	0.01562	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8
Concentration ITZ mg.L <sup>-1</sup>	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16
Concentration AMB mg.L <sup>-1</sup>	0.03125	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16

1 : les chiffres de 3 à 12 correspondent aux colonnes de 3 à 12 sur une microplaque 96 puits (figure 31)

La pousse de champignons est quantifiée par un test de colorimétrie et par ce test il sera possible de calculer la MIC50. La MIC50 détermine la concentration minimale pour inhiber 50% de la croissance de champignons comparée aux puits contrôles [136].

#### **2.4.3. Préparation des gammes de concentrations des nouvelles formulations d'antifongiques**

La même procédure NCCLS (voir section 2.4.3) a été utilisée pour préparer les dilutions des nouvelles formulations d'antifongiques, à quelques modifications près. Toutefois, la solution mère des nouvelles formulations ne sera pas préparée dans du DMSO, comme à la section 2.4.3, mais plutôt dans une solution aqueuse. Le DMSO est un solvant ayant la capacité de dissoudre le nanovecteur (ce qui n'est pas souhaité).

Dans le chapitre précédent, la détermination de l'efficacité d'encapsulation a permis de déterminer la quantité d'antifongique dans les nanovecteurs. Ainsi, l'efficacité d'encapsulation de chaque antifongique permettra d'élaborer une gamme de dilutions en série équivalente aux gammes de concentrations du NCCLS. Donc, en ayant les mêmes gammes de concentrations

pour l'antifongique libre en solution et pour la nouvelle formulation, les valeurs obtenues de CMI50 pourront être directement comparées et analysées. Le tableau ci-dessous présente l'efficacité d'encapsulation des différents antifongiques dans les nanovecteurs et la quantité nécessaire en poids de NP pour obtenir la concentration désirée de la solution mère.

Tableau 11 : Efficacité d'encapsulation des antifongiques et concentration nécessaire (en poids de NP) pour obtenir la solution mère d'antifongique

Formulations d'antifongiques	LE <sup>1</sup> (%)	Concentration nécessaire de NP (mg.mL <sup>-1</sup> )	Concentration de la solution mère (mg.L <sup>-1</sup> )
NP/VRZ	1,2	3,2	800
NP/ITZ	13	3,0	1600
NP/AMB	25,3	1,5	1600

<sup>1</sup> Efficacité de chargement

Pour ce test, des contrôles seront aussi nécessaires. Une formulation de NP *sans principe actif* sera préparée selon la même procédure. L'effet antifongique du véhicule sera évalué sur les souches de champignons.

#### 2.4.4. Préparation de nouvelles formulations pour l'étude préliminaire du rôle du PEG

Un certain nombre d'expériences contrôles ont été réalisées pour mieux comprendre le rôle éventuel du PEG présent en surface des NP dans l'efficacité des nouvelles formulations d'antifongiques.

En plus de tester des nouvelles formulations d'antifongiques sur différentes souches de *Candida spp.* et d'*Aspergillus fumigatus*, différentes combinaisons découlant de la formulation initiale de NP/VRZ seront effectuées. Les différentes formulations de VRZ sont préparées de



façon similaire aux formulations décrites au chapitre 3 et seront testées sur la souche LSPQ 5674 et seront testées selon le même protocole NCCLS.

Le tableau 12 ci-dessous présente chaque formulation qui sera testée. Une description détaillée suivra expliquant les conditions spécifiques de préparation de chaque formulation

Tableau 12 : Différentes formulations pour l'étude du rôle du PEG

No	Formulations	Description des formulations
1	VRZ libre	VRZ libre en solution
2	BI NP + VRZ	Mélange physique : NP de PEG-g-PLA vide + VRZ libre en solution
3	PEG + VRZ	Mélange physique : PEG2000 libre en solution + VRZ libre en solution
4	BI-PLA-NP + VRZ	Mélange physique : NP de PLA vide + VRZ libre en solution
5	NP/VRZ	VRZ encapsulé dans une NP de PEG-g-PLA
6	PLA-NP/VRZ	VRZ encapsulé dans une NP de PLA
7	PLA-NP/VRZ + PEG	Mélange physique : VRZ encapsulé dans une NP de PLA + de PEG2000 libre en solution

**Formulation no 1 :** la même solution de VRZ libre en solution du tableau 9 et 10 sera utilisée.

**Formulation no 2 :** les NP de PEG-g-PLA vide ont été préparées de façon similaire à celles préparées au chapitre 3. Un mélange physique 50/50 de la formulation 1 et de NP vide constitueront la formulation no 2.

**Formulation no 3 :** un mélange physique 50/50 de PEG2000 dissout en solution aqueuse (1 mg.mL<sup>-1</sup>) avec la formulation no 1.

**Formulation no 4 :** un mélange physique 50/50 de NP de PLA vide avec la formulation no 1. Les NP de PLA vide ont été préparées de façon similaire à celles préparées au chapitre 3.

**Formulation no 5 :** la formulation préparée au tableau 4 du chapitre 3 sera utilisée (polymère PEG-g-PLA a été utilisé).

**Formulation no 6 :** les NP de PLA encapsulé de VRZ ont été préparées de façon similaire à celles préparées au chapitre 3 (polymère PLA a été utilisé).

**Formulation no 7 :** mélange physique de la formulation no 6 avec une solution de PEG2000 dissout en solution aqueuse (1 mg.mL<sup>-1</sup>)

## 2.4.5. Lecture des résultats

### 2.4.5.1. Révélation avec la rézasurine

Après 24 ou 48 h, 10 µL de rézasurine 70 µM seront ajoutés dans tous les puits. Les plaques seront ensuite réincubées pour 2-3 heures. La rézasurine est un colorant visuel, indicateur vital d'oxydoréduction, réduit par les cellules viables qui permet l'évaluation du nombre de cellules dans un milieu. Lorsque le potentiel redox du milieu est atteint (-51mv), la rézasurine est transformée en résorufine de coloration rose (la réaction est irréversible) [139].

Les plaques seront lues à l'aide d'un spectrofluorimètre à la longueur d'onde d'excitation 490 nm et à 560 nm pour l'émission.

Les résultats sont interprétables lorsque les CMI obtenues pour les souches contrôle de qualité et les souches de référence correspondent à celles données dans la littérature (tableau 13). Aucune souche contrôle ATCC n'a été utilisée dans le laboratoire du Pr. Martine Raymond, les souches contrôles ayant déjà été validés au laboratoire de Nantes.

Tableau 13 : Seuils de CMI (mg.L<sup>-1</sup>) acceptables des souches contrôles ATCC d'après Barry *et al.* [140]

<b>Souches ATCC</b>	<b>Voriconazole</b>	<b>Itraconazole</b>	<b>Amphotericine B</b>
<i>C.krusei</i> ATCC 6258	0,06 – 0,5	0,12 – 0,5	0,5 – 2
<i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	0,015 – 0,12	0,06 – 0,25	0,25 – 1

#### 2.4.5.2. Interprétation des résultats

Les différents seuils d'interprétation clinique ont été établis, après 48 h d'incubation, pour l'itraconazole, le voriconazole ainsi que l'amphotéricine B. Ci-dessous sont présentés les seuils d'interprétation clinique pour la méthode du NCCLS M27-A2 qui ont été rapporté dans cette étude [141]. Les seuils d'interprétation clinique permettent de déterminer à partir de la valeur de CMI si la souche est sensible, sensible dose dépendant (SDD) ou résistante à l'antifongique.

Tableau 14 : Seuils d'interprétation clinique pour la méthode du NCCLS M27-A2 (mg.L<sup>-1</sup>) [141]

<b>Interprétation CMI (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Voriconazole</b>	<b>Itraconazole</b>	<b>Amphotéricine B</b>
Sensible	≤ 1	≤0,125	<0,5
SDD	2	≥0,25≤0,5	≥0,5≤1
Résistante	≥4	≥1	>1

### **2.5.Description du protocole pour la formation de structure de biofilm de *Candida albicans***

Les biofilms de *Candida albicans* sont préparés tels que décrits dans l'article de Pierce *et al.* avec quelques modifications [142]. L'inoculum est préparé comme pour les cellules planctoniques à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules.mL<sup>-1</sup> puis incubé sur une plaque 96 puits pendant 24 h à 35 °C. Après la phase d'adhérence, le surnageant de chaque puit est aspiré puis lavé deux fois avec du PBS pour éliminer les cellules faiblement adhérentes. Le biofilm est exposée à une gamme de concentrations d'antifongique différentes de celle exposé sur les cellules planctoniques (voir tableau 15). Après 24 h de traitement, le milieu est retiré puis 10

$\mu\text{L}$  de rézasurine ( $70 \mu\text{M}$ ) sont ajoutés dans chaque puit. La fluorescence est lue avec un spectrofluorimètre (excitation 490 nm, émission 560 nm). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la croissance en comparant la fluorescence des cellules non traitées avec celles traitées.

Tableau 15 : Gamme de concentrations des différents antifongiques sur les structures de biofilm

<b>Antifongiques</b>	<b>Gamme de concentrations (<math>\text{mg.L}^{-1}</math>)</b>
Voriconazole	0,0625 à 64
Amphotéricine B	0,125 à 8

### 3. Présentation des résultats

#### 3.1. Caractérisation des souches

La caractérisation des souches n'a pas été effectuée au préalable dans les travaux de cette thèse, mais a plutôt été effectuée par des collègues des laboratoires du Pr. Patrice LePape et du Pr. Martine Raymond. Toutefois, il est important de présenter les formes de résistance des souches utilisées. L'impact de ces caractéristiques sur les résultats obtenus sera discuté plus en détail au chapitre 6.

Tableau 16 : Caractérisation des souches de *Candida albicans* provenant du CHU de Nantes. Données provenant de la réf. [143]

souches	CMI FLU <sup>1</sup>	<i>Résistance via CDR1/CDR2</i>	<i>Résistance via MDR1</i>	<i>Résistance ERG3</i>	<i>Résistance via ERG11</i>	
		Surexpr CDR1/CDR2	Surexpr MDR1	Mutations sur ERG3	Mutations sur ERG11	Surexpr de ERG11
<b>DSY735</b>	64	Oui	Non	V351A <sup>h</sup>	D116E, K398N	Oui
<b>CAAL67</b>	32	ND	Oui	V351A	<b>G450E</b>	ND
<b>CAAL74</b>	>64	Non	Oui	V351A	Y132F, E266D, <b>G448V</b> , V488I	Non
<b>CAAL76</b>	>64	Non	ND	Del122-125	D116E*, K128T*	Oui

<sup>1</sup> : Fluconazole

Tableau 17 :Caractérisation des souches d'*Aspergillus fumigatus* provenant du CHU de Nantes. Données provenant de la ref [143]

<b>Souches</b>	<b>Résistance via mutations sur Cyp51A</b>
70041901	TR/L98H
70054925	TR/L98H
70056323	G54R, M220T
70073662	M220T

Tableau 18 : Caractérisation des souches provenant du LSPQ. Données provenant de la ref [137, 138]

<b>Souches</b>	<b>Résistance</b>
<i>Candida albicans</i> 5674	Surexpression CDR1/CDR2
<i>Aspergillus nidulans</i> R153	aucune

L'information qu'il faut retenir des tableaux ci-dessus (tableaux 16, 17 et 18) est :

- Les souches CAAL 67, CAAL 74, DSY 735 ont une surexpression des gènes codant pour les pompes d'efflux en plus d'avoir plusieurs mutations sur le gène codant ERG11 de l'enzyme lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase
- La souche CAAL 76 possède seulement des mutations sur les gènes codant pour ERG3 et ERG11, respectivement des enzymes C-5 stérol désaturase et lanostérol 14  $\alpha$ -déméthylase
- La souche LSPQ 5674 possède seulement une surexpression des gènes codant pour les pompes d'efflux.
- Quant aux souches d'*Aspergillus fumigatus*, elles présentent seulement des mutations sur le gène codant pour Cyp51A de l'enzyme lanostérol 14 $\alpha$ -déméthylase

### **3.2. Résultats *in vitro* de l'activité antifongique sur cellules planctoniques des souches de *Candida spp.***

Le paramètre utilisé pour évaluer la sensibilité d'une souche à un antifongique est la CMI<sub>50</sub>. Elle correspond à la concentration d'antifongique nécessaire pour inhiber 50% de la croissance par rapport à la croissance de champignons du puit contrôle (100% de croissance). Or, il est difficile pour des molécules fungistatiques comme les azolés de définir l'inhibition complète d'une souche, ce qui n'est pas le cas pour l'AMB qui est fongicide. Mais pour simplifier et comparer les résultats, un point de rupture arbitraire mais fixe sera établi pour comparer les CMI. Cette valeur d'inhibition partielle de la croissance des champignons donnera un point de comparaison entre les différents antifongiques et les nouvelles formulations.

La méthode de microdilution du NCCLS recommande un point de lecture à 48 h pour la plupart des souches. Toutefois, certaines études ont montré qu'une lecture à 24 h augmenterait la corrélation *in vitro/in vivo* [144]. Dans le cas des azolés, certaines souches apparaissant tout à fait sensibles après 24 h de traitement, se trouvent moins sensibles voire résistantes après 48 h de traitement [145]. Des auteurs ont rapporté que cette observation pouvait être causé par un phénomène de traîne [145]. Cela correspond à une pousse résiduelle des levures au-delà d'une certaine concentration d'antifongique, expliqué en partie par la nature fungistatique des azolés. Ainsi, avoir un délai d'incubation de 24 h au lieu de 48 h [146] permettrait de s'affranchir du phénomène de traîne [147]

L'utilisation de souches contrôles assure et confirme la validité du test. Cela signifie que les résultats peuvent être considérés comme interprétables lorsque les CMI obtenues pour les souches de référence correspondent à celles données par Barry *et al* [140] (article de référence pour la caractérisation des souches). Nous pouvons confirmer la validité des tests puisque les valeurs des souches contrôles correspondent aux valeurs de Barry *et al*.

De plus, pour chaque test effectué, une formulation de NP sans principe actif (NP seul) a été préparée selon la même procédure que les NP contenant un PA. L'effet antifongique du véhicule (en réalité c'est plutôt un effet toxique) a été évalué sur les différentes souches de champignons selon le même gradient de concentration (en poids de NP vide) que les NP contenant du PA. Un exemple de viabilité cellulaire pour le VRZ et l'AMB est rapporté respectivement dans les graphiques 32 et 33.

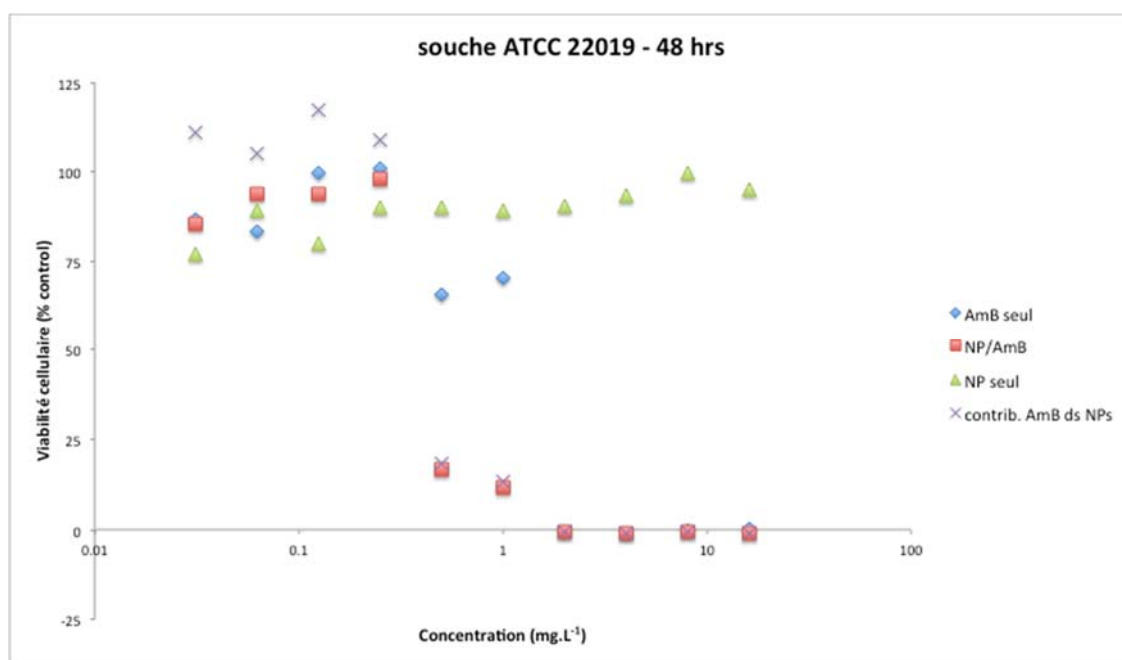


Figure 32 : Graphique de la viabilité cellulaire sur la souche ATCC 22019 après 48 h de traitement de AMB libre en solution, NP/AMB, BI-NP, ainsi que de AMB dans les NP sans la contribution des NP



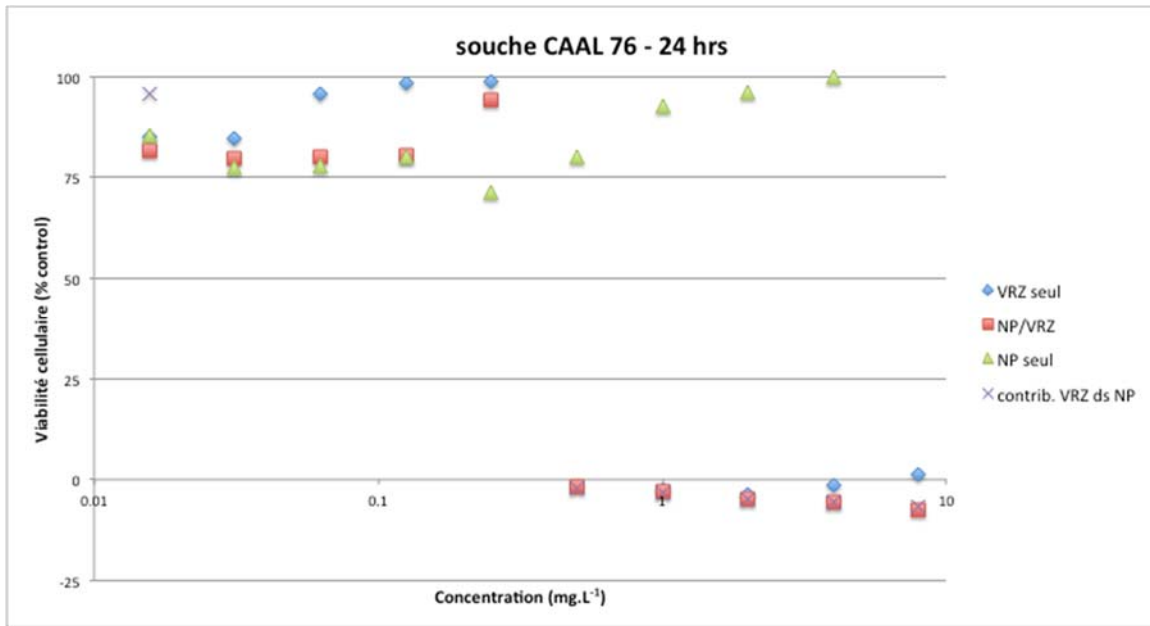


Figure 33 : Graphique de la viabilité cellulaire sur la souche CAAL 76 après 24 h de traitement de VRZ libre en solution, NP/VRZ, BI-NP, ainsi que de VRZ dans les NP sans la contribution des NP

Le tableau 19 représente les valeurs de CMI50 après 24 h de traitement sur 4 souches de *Candida spp* (CAAL 67, 74, 76, DSY 735) et 2 souches contrôles (*Candida parapsilosis*, ATCC 22019 et *Candida krusei*, ATCC 6258) pour le VRZ en solution, l'AMB en solution et leurs nouvelles formulations respectives (NP/VRZ et NP/AMB). Le tableau 20 présente les valeurs de CMI50 après 48 h de traitement pour l'AMB en solution et la formulation NP/AMB.

Tableau 19 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ, AMB, NP/VRZ et NP/AMB sur des souches de *C. albicans*, *parapsilosis* et *krusei* après 24 h<sup>a</sup>

Formulations	Souches					
	CAAL 67	CAAL 74	CAAL 76	DSY 735	ATCC 22019	ATCC 6258
<b>VRZ</b>	0,471±0,161	0,369±0,064	>8	0,354±0,031	0,025±0,011	0,348±0,042
<b>NP/VRZ<sup>b</sup></b>	0,053±0,005	0,027±0,003	>8	0,053±0,006	0,020±0,013	0,039±0,009
<b>AmB</b>	0,418±0,443	0,371±0,385	1,143±0,574	0,294±0,116	0,092±0,010	0,545±0,136
<b>NP/AmB<sup>b</sup></b>	0,424±0,436	0,213±0,214	1,090±0,498	0,325±0,128	0,089±0,032	0,315±0,072

<sup>a</sup>: valeurs représentées sous forme de moyenne (n=2)

<sup>b</sup>: activité du VRZ et AMB encapsulé sans la contribution de la NP

ND : non déterminé

Tableau 20 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de AMB et NP/AMB sur des souches de *C. albicans*, *parapsilosis* et *krusei* après 48 h<sup>a</sup>

Formulations	Souches					
	CAAL 67	CAAL 74	CAAL 76	DSY 735	ATCC 22019	ATCC 6258
<b>AmB</b>	1,232±0,216	1,005±0,528	1,395±0,086	0,846±0,319	1,364±0,109	1,378±0,003
<b>NP/AmB<sup>b</sup></b>	0,502±0,143	0,497±0,267	0,707±0,029	0,422±0,453	0,386±0,017	0,271±0,118

<sup>a</sup> valeurs représentées sous forme de moyenne (n=2)

<sup>b</sup> activité de AMB encapsulé sans la contribution de la NP

De façon générale, nous pouvons remarquer que dans les graphiques 31 et 32, les NP vides (sans PA) ne présentent pas de toxicité importantes sur les souches analysées (respectivement ATCC 22019 et CAAL 76). Toutefois, la viabilité cellulaire n'est pas à 100%. Dans le but d'évaluer seulement l'effet antifongique du PA encapsulé sans l'apport toxique du transporteur polymérique, nous avons soustrait la contribution toxique de la NP. (*Cette contribution est représentée dans les graphiques 32 et 33 par les "x" mauves*). Ainsi, les valeurs de MIC50 représentées dans les tableaux 19 à 23 représentent l'effet antifongique du PA encapsulé sans l'effet "toxique" de la NP. Ceci permet d'évaluer seulement la contribution du PA lorsqu'il est encapsulé dans un transporteur polymérique.

Ensuite, nous pouvons remarquer que les valeurs de CMI50 obtenues pour la nouvelle formulation de VRZ (NP/VRZ) sont 9 fois plus faibles que pour le VRZ en solution (environ une valeur de log de différence). Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par

Peng *et al.* [148]. L'auteur a évalué l'activité antifongique du VRZ encapsulé dans des NP de PLGA sur une souche de *Candida albicans* et sur des souris infectées. Ses résultats ont démontré que sur une période de 7 jours, la formulation de PLGA avait une meilleure efficacité que le principe actif en solution. Toutefois, le plan expérimental différait du plan des expériences de cette thèse. Par exemple, la méthode NCCLS n'a pas été utilisée. Donc, le choix de la gamme de concentration n'a pas été justifié. Il aurait été plus rigoureux de choisir et tester une gamme de concentration encadrant les concentrations seuils et correspondant à des taux plasmatiques efficaces. La caractérisation de la souche n'était pas connue non plus (sensible ou résistante au VRZ). Même si l'effet de l'utilisation d'un nanovecteur semble avoir démontré une efficacité améliorée, il est difficile de pouvoir corrélérer les résultats de cette étude avec les nôtres. Cette efficacité améliorée peut être observée pour toutes les souches excepté la souche CAAL 76. En effet, nous remarquons que la souche CAAL 76 est complètement résistante au VRZ et que le fait d'encapsuler le VRZ n'apporte pas d'amélioration de l'efficacité. Pour la souche ATCC 22019, nous n'observons pas non plus une amélioration de l'activité antifongique. Mais nous pouvons toutefois remarquer que la souche est très sensible au VRZ et que la quantité nécessaire de PA pour inhiber la croissance est très faible. Dans ce cas, probablement que la seule quantité de PA adsorbée sur la surface de la NP est largement suffisante pour un effet pharmacologique sur cette souche.

Quant au traitement de la nouvelle formulation NP/AMB sur les souches de *Candida albicans*, celle-ci ne démontre pas une efficacité améliorée par rapport au PA en solution après 24 h de traitement (tableau 19). Toutefois, sur une période de traitement de 48 h (tableau 20), nous pouvons remarquer que les valeurs de CMI50 de la formulation NP/AMB sont à peu près 2 fois plus faible que les valeurs du PA en solution pour l'ensemble des souches. Or, dans le chapitre précédent, le profil de libération prolongée de la formulation NP/AMB a été effectuée et a montré que 25% de la dose était libérée après 24 h, 35% d'AMB libérée après 48 h (voir chapitre 3, section 3.2.2). En mettant en relation ces résultats, il est possible que le principe actif ne soit pas complètement relargué et/ou dissous, d'où le délai de l'action antifongique. Ses résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Kuhn *et al.* [131]. Dans cette étude, de nouvelles formulations liposomales ont été évaluées sur des souches sensibles de *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*. Après 48 h de traitement sur des souches planctoniques, des

valeurs de CMI50 quatre fois plus faibles que l'AMB en solution ont été obtenues. Toutefois, la caractérisation des souches (sensibles ou résistantes) n'est pas mentionnée dans l'article rapportant l'étude.

Pour évaluer le devenir du PA encapsulé dans des NP, il serait intéressant d'évaluer la quantité de PA internalisé dans les cellules en fonction du temps. Pour ce faire, on pourrait incuber une certaine quantité de la nouvelle formulation NP/AMB et doser la quantité de PA internalisé dans les cellules (à 2h, 6h, 24h par exemple) et la quantité de PA restant dans le surnageant.

Le tableau 21 présente les résultats de CMI50 de ces mêmes formulations sur la souche LSPQ 5674 (souche Labo Pr Martine Raymond) après 24 h de traitement. De façon générale, nous pouvons affirmer que les valeurs de CMI50 des trois nouvelles formulations sont considérablement plus faibles que les valeurs des principes actifs en solution. Plus précisément, la valeur de CMI50 de la formulation NP/VRZ est 30 fois plus faible que la valeur du principe actif en solution. Pour la formulation NP/ITZ, la valeur de CMI est 9 fois plus faible et pour la formulation NP/AMB la valeur de CMI50 est 8 fois plus faible. De plus, les trois formulations ont une meilleure efficacité antifongique sur la souche LSPQ 5674 que sur les souches du CHU de Nantes.

Tableau 21 : CMI50 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) du VRZ, AmB, NP/VRZ et NP/AmB sur la souche *C. albicans* LSPQ 5674 après 24 h<sup>a</sup>

<b>Formulations</b>	<b>Souche</b>
	5674
<b>VRZ</b>	2,917±0,137
<b>NP/VRZ<sup>b</sup></b>	0,094±0,001
<b>ITZ</b>	0,471±0,001
<b>NP/ITZ<sup>b</sup></b>	0,075±0,005
<b>AmB</b>	3,227±0,017
<b>NP/AmB<sup>b</sup></b>	0,469±0,002

<sup>a</sup> valeurs représentées sous forme de moyenne (n=3)

<sup>b</sup> activité de VRZ, AMB, ITZ encapsulés sans la contribution de la NP

En évaluant de façon générale les résultats des tableaux ci-dessus, nous pouvons expliquer cette amélioration de l'activité des nouvelles formulations selon 2 possibilités; soit les NP libèrent l'antifongique tout près de la membrane plasmique et ainsi facilitent la diffusion de l'antifongique à l'intérieur de la cellule, soit les NP sont internalisées et relarguent leur contenu dans le cytosol. Le mécanisme d'action ou l'interaction des NP avec la cellule fongique reste un phénomène nouveau et peu étudié. L'internalisation cellulaire dans les champignons n'est pas encore bien élucidée et nécessite aussi plusieurs études. Ces aspects seront discutés plus en détail dans le chapitre 5.

Par ailleurs, lors de l'élaboration du test NCCLS et de la préparation des PA en solution, la solution mère des PA est dissoute dans le DMSO, assurant une solubilisation complète. Au final, le DMSO ne représente que 1% de la quantité de liquide présent dans le puit de la plaque 96 puits. De plus, lors de la préparation de la gamme de concentration, la dissolution du PA dans le DMSO empêchera la précipitation du PA lors des dilutions dans la phase aqueuse. Ainsi, nous pouvons exclure l'hypothèse d'un problème de solubilité (précipitation du PA par exemple) pour justifier l'amélioration de l'activité antifongique des nouvelles formulations.

### **3.3. Résultats *in vitro* de l'activité antifongique sur cellules planctoniques des souches d'*Aspergillus fumigatus***

Le tableau 22 représente les valeurs de CMI50 après 48 h de traitement sur 6 souches d'*Aspergillus fumigatus* pour le VRZ, l'ITZ, l'AMB en solution, et leurs nouvelles formulations respectives (NP/VRZ, NP/ITZ et NP/AMB).

Pour le tableau 22, les valeurs de CMI50 sont plus faibles pour les azolés en solution (VRZ et ITZ) que pour les nouvelles formulations (NP/VRZ et NP/ITZ). Par contre, la formulation NP/AMB offre une meilleure efficacité sur l'ensemble des souches. Les valeurs de CMI50 sont de deux à trois fois plus faibles que l'AMB en solution.

Le tableau 23 représente les valeurs de CMI50 après 48 h de traitement sur la souche *Aspergillus nidulans* R153 pour le VRZ, en solution et la nouvelle formulation NP/VRZ.

Pour le tableau 23, la nouvelle formulation NP/VRZ a une meilleure efficacité antifongique que le VRZ en solution (souche *A. nidulans* R153). Les résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par Patel *et al.* [149, 150]. L'auteur a évalué des nouvelles formulations d'ITZ encapsulée dans des NP de PLGA sur des plaques de pétri contenant des souches d'*Aspergillus flavus*. Après 72h, 96h et 120h de traitement, il a démontré que les nouvelles formulations avaient une meilleure activité antifongique que l'ITZ en solution. Toutefois, la caractérisation des souches (sensibles ou résistantes) n'est pas mentionnée dans l'étude.

En évaluant de façon générale les résultats des tableaux ci-dessous, nous pouvons nous demander pour quelles raisons les formulations d'azolés sont efficaces sur les souches de *Candida spp.*, d'*Aspergillus nidulans* mais pas sur les souches d'*Aspergillus fumigatus*.

Nous pouvons tenter d'expliquer cette situation par l'alternative suivante: soit les caractéristiques des souches (résistantes ou sensibles) ont un impact sur l'efficacité des nouveaux traitements, soit une différence au niveau morphologique entre le *Candida* et *Aspergillus fumigatus* expliquent cette différence d'efficacité.

En effet, l'*Aspergillus fumigatus* présente dans sa paroi cellulaire des composantes différentes de celle de *Candida albicans* [151, 152]. Par exemple, les parois cellulaires des champignons filamenteux contiennent des niveaux plus élevés de chitine que les levures. Aussi, les chaînes de mannanes se trouvent directement liées au glucans comparativement aux levures où les chaînes de mannanes sont liées seulement aux protéines de la paroi cellulaire. Ainsi, il se pourrait que les NP aient une affinité avec ses composantes menant à un relargage difficile.  
[29, 153].

Tableau 22 : MIC50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ, ITZ, AmB, NP/VRZ, NP/ITZ et NP/AmB sur des souches d'*A. Fumigatus*<sup>a</sup>

Formulations	Souches					
	70056323	70041901	70073662	70054925	AF 7	AF 350
<b>VRZ</b>	0,086±0,014	0,394±0,014	0,079±0,007	0,483±0,111	0,058±0,013	0,085±0,058
<b>NP/VRZ<sup>b</sup></b>	0,179±0,019	0,723±0,006	0,185±0,004	0,760±0,066	0,125±0,034	0,182±0,116
<b>ITZ</b>	1,395±0,090	1,331±0,205	1,145±0,237	1,434±0,031	0,568±0,281	0,636±0,167
<b>NP/ITZ<sup>b</sup></b>	2,339±0,972	2,149±0,694	2,550±0,758	3,038±1,082	0,797±0,632	0,849±0,642
<b>AmB</b>	1,486±0,148	0,828±0,059	0,856±0,153	1,130±0,071	1,187±0,091	1,090±0,051
<b>NP/AmB<sup>b</sup></b>	0,438±0,041	0,375±0,007	0,447±0,015	0,384±0,005	0,382±0,002	0,344±0,007

<sup>a</sup> valeurs représentées sous forme de moyenne (n=2)

<sup>b</sup> activité du VRZ, AMB, ITZ encapsulé sans la contribution de la NP

Tableau 23 : CMI50 ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) du VRZ et NP/VRZ sur la souche *A. nidulans* R153 après 48h<sup>a</sup>

Formulations	Souche
	R153
VRZ	1,514±0,005
NP/VRZ <sup>b</sup>	0,876±0,023

<sup>a</sup> valeurs représentées sous forme de moyenne (n=3)

<sup>b</sup> activité du VRZ encapsulé sans la contribution de la NP

Pour conclure sur les résultats de l'activité antifongique *in vitro* sur les cellules de champignons, nous pouvons essayer d'analyser ces résultats en juxtaposant les caractéristiques des souches présentées dans les tableaux 16 à 18 avec les valeurs de CMI50 des tableaux 19 à 23. Cette juxtaposition est présentée au tableau 24.

Tableau 24: Efficacité antifongique des nouvelles formulations NP/VRZ et NP/AMB<sup>1</sup>

Formes de résistance des souches	Efficacité antifongique de NP/VRZ	Efficacité antifongique de NP/AMB
Surexpression des pompes d'efflux	+ + + + + + + + + +	+ + + + + + + + + +
Mutations génétiques	Ø	+ + + + + + + + + +
Surexpression des pompes d'efflux + Mutations génétiques	+ +	+ + + + + + + + + +

1 : le signe + représentent qualitativement l'importance de l'efficacité antifongique des nouvelles formulations par rapport aux formes de résistance des souches. Plus la quantité de + est importante, plus l'efficacité antifongique est importante. Le signe Ø signifie qu'il n'y a aucune efficacité antifongique

Ainsi, pour les nouvelles formulations d'azolés, nous observons une amélioration du traitement antifongique lorsque les souches présentent une surexpression des gènes codant pour les pompes d'efflux (LSPQ 5674). D'un autre côté, lorsque les souches présentent plusieurs mécanismes de résistances telles qu'une surexpression des pompes d'efflux **combinée** à une mutation sur les gènes ERG3 et ERG11 (les souches CAAL67, 74 et DSY735), on remarque une amélioration du traitement antifongique mais l'effet est un peu moins important que lorsqu'il y a seulement une surexpression des pompes d'efflux.

Finalement, les nouvelles formulations d'azolés ne présentent aucun avantage lorsque les souches ont des mutations sur les gènes codant les enzymes menant à la synthèse de l'ergostérol. C'est en effet le cas des nouvelles formulations d'azolés sur les souches d'*Aspergillus fumigatus* qui présentent des résistances dues à des mutations génétiques de ce type.

Toutefois, pour la formulation NP/AMB la situation est différente puisque le mécanisme d'action de l'AMB se déroule principalement au niveau de la membrane plasmique (en se liant à l'ergostérol) [55]. Ainsi, même si les souches présentent des résistances dues à des mutations sur les gènes codant ERG11 et ERG3, ces mutations n'affecteront pas l'activité de la nouvelle formulation NP/AMB. En effet, la formulation est efficace sur toutes les souches analysées dans cette étude.



Une discussion plus approfondie quant aux implications de ces résultats et l'élaboration d'hypothèses sur les mécanismes d'action des nouvelles formulations seront amenées au chapitre 6 (discussion générale).

### **3.4.Résultats *in vitro* de l'activité antifongique de différentes formulations pour l'étude préliminaire du rôle du PEG**

Dans le but de comprendre si le PEG présent dans le polymère PEG-g-PLA a un rôle dans les résultats d'efficacité antifongiques des nouvelles formulations, nous avons testé différentes combinaisons découlant de la formulation initiale. Les différentes formulations de VRZ ont été préparées de façon similaire aux formulations décrites au chapitre 3. Les différentes combinaisons ont été testées selon le protocole NCCLS sur la souche LSPQ 5674 (qui présente une surexpression des pompes d'efflux). L'activité antifongique a été évaluée après 24 h de traitement et les résultats sont présentés au tableau 25. Différentes CMI<sub>50</sub> ont été obtenues. Nous remarquons que les formulations 1 à 4 ont des valeurs de CMI<sub>50</sub> à peu près semblables et avoisinant 3 mg.L<sup>-1</sup>. Quant aux formulations 5 à 7, elles ont des valeurs de CMI<sub>50</sub> similaires de l'ordre de 0,100 mg.L<sup>-1</sup>.

Tableau 25 : CMI50 (mg.L<sup>-1</sup>) de différentes formulations sur la souche *C. albicans* LSPQ 5674 après 24 h de traitement<sup>a</sup>

No	Formulations	Description des formulations	Valeur CMI50 (mg.L <sup>-1</sup> )
1	VRZ libre	VRZ libre en solution	2,917±0,137
2	BI NP + VRZ	Mélange physique : NP de PEG-g-PLA vide + VRZ libre en solution	3,255±0,038
3	PEG + VRZ	Mélange physique : PEG2000 libre en solution + VRZ libre en solution	3,334±0,324
4	BI-PLA-NP + VRZ	Mélange physique : NP de PLA vide + VRZ libre en solution	3,260±0,033
5	NP/VRZ	VRZ encapsulé dans une NP de PEG-g-PLA	0,094±0,001
6	PLA-NP/VRZ	VRZ encapsulé dans une NP de PLA	0,095±0,001
7	PLA-NP/VRZ + PEG	Mélange physique : VRZ encapsulé dans une NP de PLA + de PEG2000 libre en solution	0,187±0,002

a : valeurs représentées sous forme de moyenne ± É.T. (n=3)

D'après les valeurs du tableau 25, nous pouvons remarquer que les formulations 1 à 4 ont été testées pour démontrer l'effet de l'encapsulation sur l'activité antifongique. Nous pouvons constater que lorsque le PA n'est pas encapsulé (avec ou sans présence de PEG), nous n'observons pas d'amélioration de l'activité antifongique par rapport à l'agent libre. Par exemple, la formulation 2, qui contient des NP à base de PEG-g-PLA vides (sans PA) additionnées de VRZ libre (non encapsulé), a une valeur de CMI50 similaire au VRZ libre (formulation 1).

Quant aux combinaisons du 2<sup>e</sup> groupe, les formulations 6 et 7 démontrent un effet antifongique semblable à la formulation 5 (NP/VRZ). Plus précisément, l'utilisation du PEG en surface de la NP ou l'utilisation du PEG libre dans la formulation ne semble pas avoir un rôle dans l'action antifongique. Pourtant, de nombreux chercheurs ont démontré, dans les cellules endothéliales et cancéreuses, que l'utilisation du PEG dans une matrice ou dans une formulation de PA facilitait l'endocytose du vecteur ou inhibait l'action des pompes d'efflux et ainsi améliorait l'efficacité du PA[85]. Or, dans les tests préliminaires effectués ici, le PEG ne semble pas être essentiel au phénomène d'endocytose puisque le VRZ encapsulé dans les

NP de PLA (formulation 6) démontre le même effet antifongique que le VRZ encapsulé dans les NP de PEG-g-PLA (formulation 5).

Ainsi, l'utilisation du PEG pour une application antifongique ne semble pas avoir un rôle essentiel dans ce type de test. Ces résultats demeurent toutefois préliminaires et d'autres travaux sont nécessaires afin de comprendre pour quelles raisons le PEG ne semble pas avoir de rôle dans le champignon au regard des résultats obtenus. Par exemple, il serait important d'évaluer le dosage du PA dans les NP de PLA et de PEG-g-PLA, la taille des NP fabriquées, les efficacités d'encapsulation, la concentration de PA intracellulaire.

Une discussion plus approfondie quant aux implications de ces résultats et l'élaboration d'hypothèses sur les mécanismes d'action des nouvelles formulations seront amenées au chapitre 6 (discussion générale).

### **3.5. Résultats de sensibilité antifongique sur des structures de biofilms de *Candida albicans***

Les levures formant des biofilms sont connues pour se développer sur des dispositifs médicaux tels que des cathéters et/ou des implants. De par leur complexité structurale, les infections à biofilms sont connues pour être moins sensibles que les formes planctoniques aux traitements antifongiques. Le peu d'études concernant les nanovecteurs dans la littérature, démontrant une activité sur des biofilms, a été effectué à partir de formulations liposomales et lipidiques d'AMB. Les résultats, quoique prometteurs, restent pourtant limités [154-156]. De façon générale, la stabilité des liposomes et des préparations lipidiques est précaire et l'efficacité d'encapsulation n'est pas optimale.

La résistance des biofilms aux différentes molécules antifongiques nous a poussés à évaluer l'apport de ces NP sur la sensibilité des biofilms aux agents antifongiques. Ainsi, deux nouvelles formulations ont été évaluées (NP/AMB et NP/VRZ) sur différentes souches formant du biofilm.

Pour évaluer l'efficacité de la formulation NP/VRZ sur les biofilms, nous avons déterminé une gamme de concentrations plus élevées que ce que propose le NCCLS pour les tests sur les cellules planctoniques puisque la gamme de concentrations de PA testés sur cellules planctoniques n'est pas efficace sur les biofilm. Ainsi, les concentrations ont été choisies de 10 à 40 fois plus concentrées (1 à 64 mg.L<sup>-1</sup>) que les concentrations utilisées sur les cellules planctoniques (0,0154 à 16 mg.L<sup>-1</sup>). Toutefois, on retrouve très peu de résistance pour l'AMB. C'est pour cette raison que la même gamme de concentrations a été utilisée.

L'activité antifongique a été évaluée après 24 h de traitement et les résultats sont présentés aux figures 34 et 35. La figure 34 représente les traitements du VRZ et de la nouvelle formulation NP/VRZ tandis que la figure 35 représente les traitements de l'AMB et la nouvelle formulation NP/AMB. Chaque figure rassemble l'activité antifongique de 6 souches cliniques formant du biofilm. Les souches sont pour la plupart résistantes aux azolés mais sensibles à l'AMB. L'activité antifongique, contrairement aux tests sur cellules planctoniques, a été rapportée sous forme de courbe de viabilité cellulaire en fonction d'une gamme de concentration puisque la CMI50 n'est pas atteinte sur la plupart des souches. Dans la figure 34, on peut remarquer une activité antifongique à la plus haute concentration (64 mg.L<sup>-1</sup>) sur la plupart des souches avec la nouvelle formulation NP/VRZ, ce qui n'est pas le cas pour le traitement conventionnel. Exception, la souche ck818 qui est sensible au VRZ en solution (CMI50: 2,10±0,50 mg.L<sup>-1</sup> pour NP/VRZ et CMI50: 1,30±0,27 mg.L<sup>-1</sup> pour VRZ en solution). On remarque pour cette souche, la nouvelle formulation n'apporte pas d'avantage.

Quant à la figure 35, on remarque que la plupart des souches sont sensibles à l'AMB et que la nouvelle formulation NP/AMB apporte une légère efficacité antifongique sur les biofilms (sauf pour la souche ck818).

Plus précisément, nous pouvons remarquer que pour les souches ct366, ct573 et ca134, il y a eu une légère amélioration de l'activité antifongique, à la concentration la plus élevée. Toutefois, pour les autres souches, ca845, ca073 et ck818, l'AMB en solution semble un peu plus efficace que les nouvelles formulations. Nous pouvons aussi remarquer que les écarts-

types sont un peu plus important que pour la figure 34. Les manipulations ayant été faites par deux opérateurs peuvent expliquer une plus grande variabilité des résultats.

Pour conclure correctement, il aurait été important d'évaluer les NP vides avec le PA non encapsulé pour confirmer que l'efficacité antifongique améliorée des nouvelles formulations provient de l'encapsulation du PA dans un nanotransporteur polymérique. De plus, à ce stade-ci nous ne connaissons pas les caractéristiques des souches de biofilm avec lesquelles nous avons travaillé (sensibilité ou résistance). Ainsi, il est difficile d'interpréter les résultats d'efficacité obtenus des nouvelles formulations d'AMB sur les biofilms.

L'interaction, la diffusion et/ou la pénétration des nanovecteurs dans le biofilm fongique restent à ce jour un phénomène inconnu et peu étudié. On ignore pour quelles raisons les nouvelles formulations ont un effet antifongique sur les biofilms. Toutefois, quelques hypothèses seront amenées pour tenter de justifier les résultats obtenus.

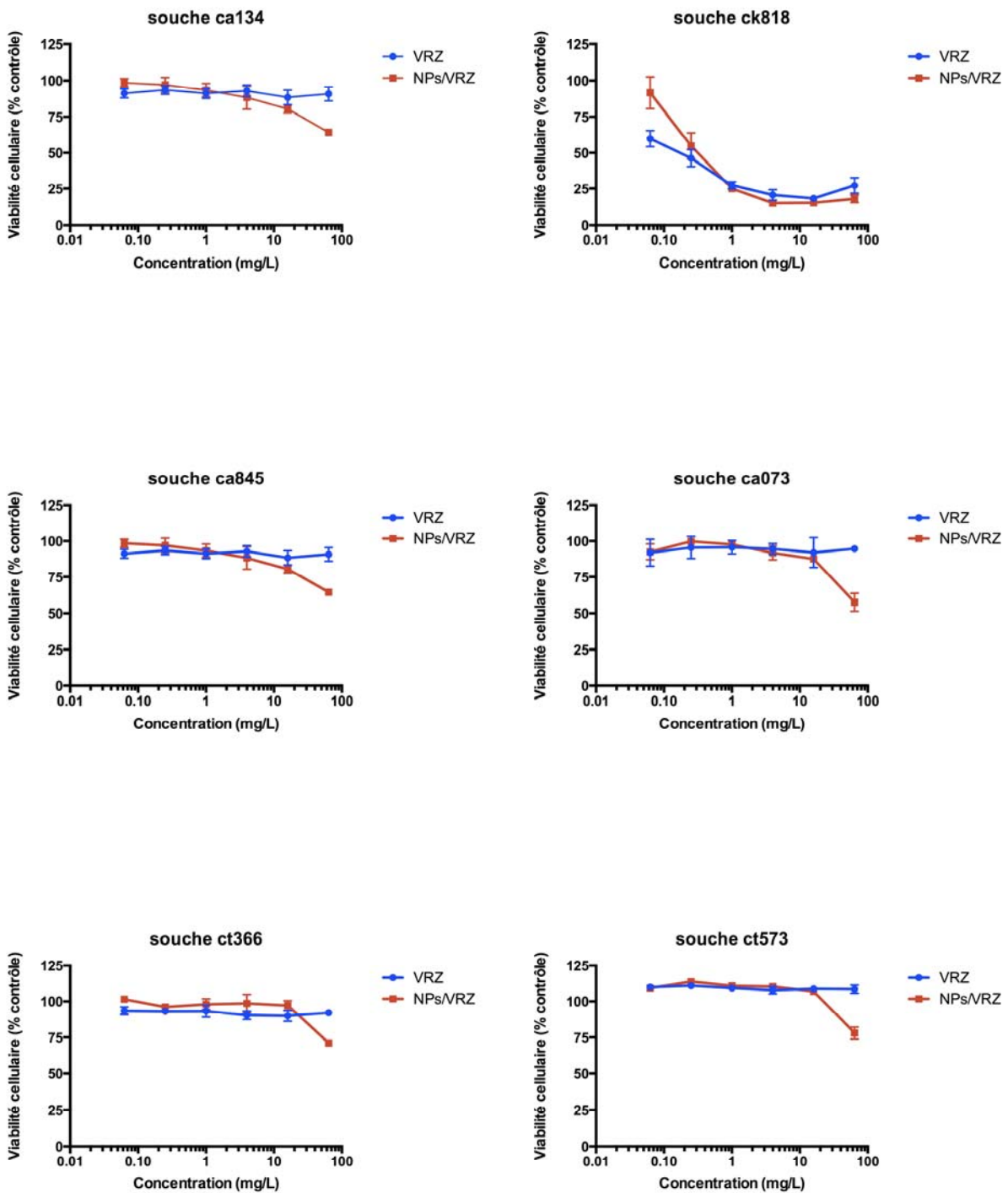


Figure 34 : Courbes de viabilité cellulaire de différentes souches de *Candida spp.* formant du biofilm après 24 h de traitement avec du VRZ et NP/VRZ. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3)

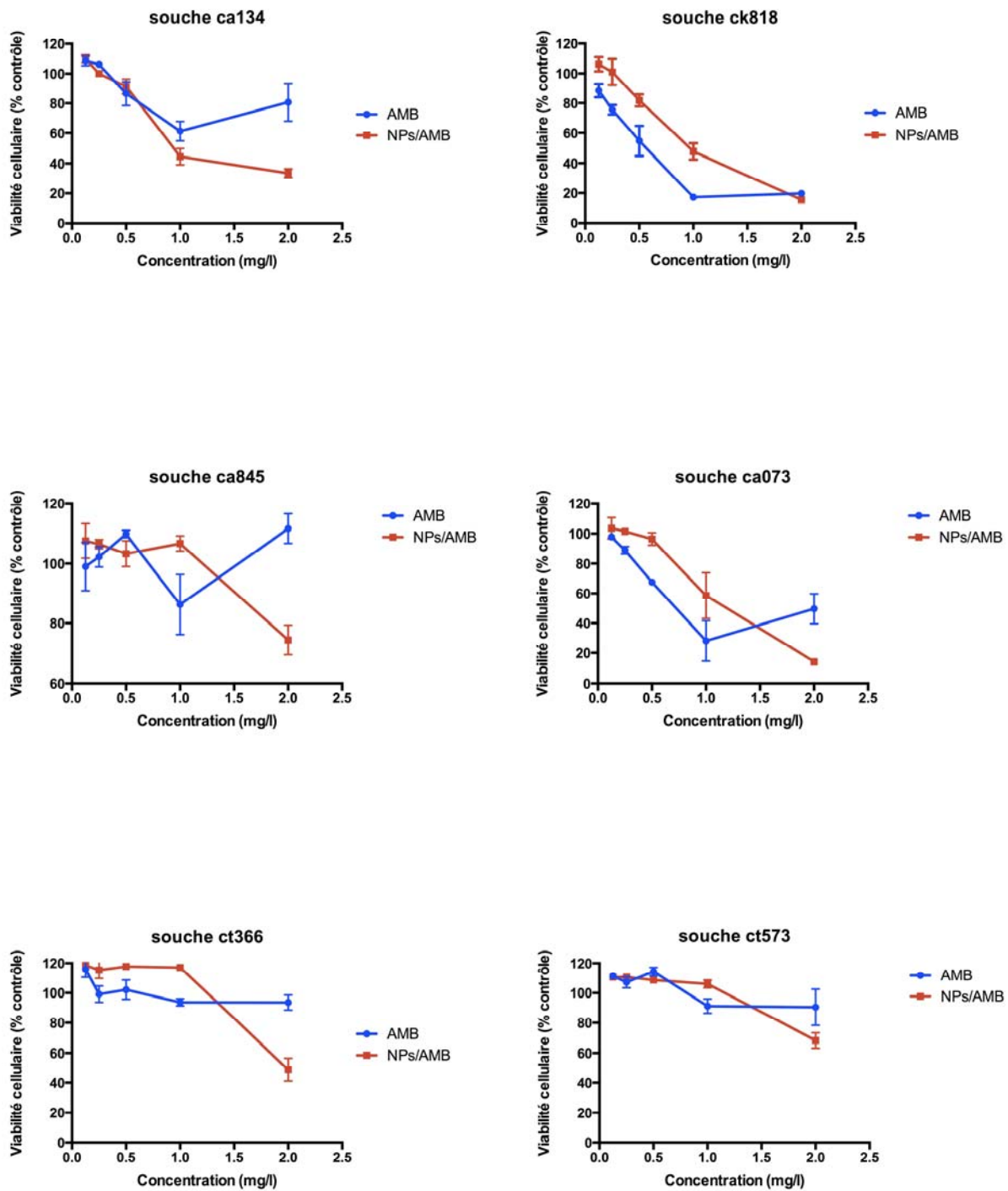


Figure 35 : Courbes de viabilité cellulaire de différentes souches de *Candida spp* formant du biofilm après 24 h de traitement avec de l' AMB et NP/AMB. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne (n=3)

### **3.6. Discussion de l'activité des nouvelles formulations d'antifongiques sur les souches formant du biofilm**

Tel que discuté précédemment, les infections fongiques causées par des souches formant du biofilm restent de nos jours extrêmement difficiles à traiter et à éradiquer. Le problème de l'efficacité des ces traitements restent donc un sujet très préoccupant et toujours d'actualité. Face à des patients de plus en plus résistants aux traitements antifongiques, les cliniciens n'ont pas d'autre choix que d'augmenter les doses de PA pour éradiquer les biofilms. Or, l'augmentation des doses n'est pas toujours corrélée avec une augmentation de l'efficacité du traitement, sans oublier que les effets secondaires deviennent alors très importants. Puisque la découverte de nouveaux agents antifongiques est une alternative coûteuse et fastidieuse, l'encapsulation de PA dans des NP polymériques peut être une alternative intéressante advenant qu'elle permette d'améliorer l'action antifongique sur les biofilms voire de les éradiquer. Or, à ce jour, aucune étude d'efficacité d'antifongiques encapsulés dans des NP sur des souches de patients infectés par des biofilms fongiques n'a été publiée.

Les mécanismes de résistance dus aux biofilms sont différents des mécanismes de résistance des cellules planctoniques. La résistance des biofilms aux antifongiques est un phénomène complexe et relève de plusieurs facteurs. Il est bien établi dans la littérature que les biofilms sont résistants en raison de leur structure physique et de leur densité cellulaire. Mais à ce jour, les mécanismes de résistance des biofilms de *Candida* ne sont pas très bien décrits et restent incompris. Très peu de chercheurs se sont penchés sur la caractérisation structurale des biofilms fongiques. Toutefois, de récentes publications ont proposé plusieurs explications et celles-ci sont présentées à la figure 36 [23, 29, 157]. En plus de l'architecture propre au biofilm et de l'importante densité cellulaire, il semblerait que la surexpression des cibles d'action, l'efficacité d'expulsion des pompes d'efflux et le phénomène de diffusion limitée auraient aussi un rôle dans la résistance [158]. Toutes ses formes de résistances sont utilisées par le champignon pour combattre les traitements antifongiques.



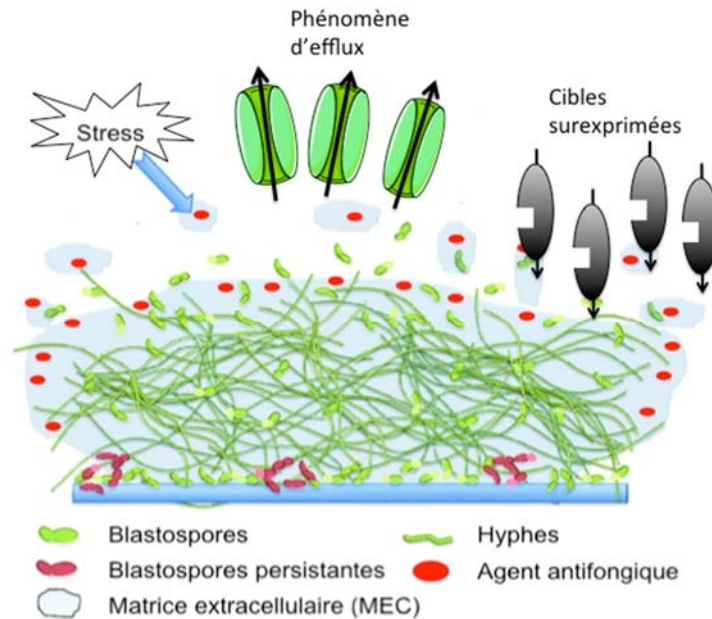


Figure 36 : Aperçu général des mécanismes de résistance des biofilms associés au *C. albicans*, mais qui sont susceptibles d'être communs à d'autres champignons. Cette figure illustre la densité et la complexité du biofilm de *C. albicans*, avec différents morphotypes présents entourés par MEC. Les flèches représentent les différents facteurs qui déterminent la résistance antifongique dans le biofilm[159]

En mettant en relation les résultats d'efficacité antifongique, les propriétés physicochimiques des NP et les mécanismes présentés à la figure 36, nous pouvons avancer quelques hypothèses permettant d'expliquer les résultats obtenus.

- Processus de diffusion dans le biofilm

Les processus de diffusion par les canaux aqueux des espèces chimiques dans un biofilm sont importants car ils contrôlent en partie la disponibilité des nutriments pour les microorganismes. Les composantes limitant la diffusion peuvent provenir de la densité cellulaire ainsi que de la matrice extracellulaire. Ces phénomènes sont bien décrits dans le cas du biofilm bactérien [160, 161]. Toutefois, le mécanisme de diffusion dans les biofilms fongiques reste encore aujourd'hui inconnu. Néanmoins, la perfusion des nutriments et l'expulsion des déchets sont nécessaires à la survie des cellules fongiques. C'est pour cette raison que quelques auteurs estiment que la présence de canaux aqueux dans les biofilms fongiques est possible par analogie aux biofilms bactériens [30, 157, 162].

Sachant que la plupart des antifongiques sont hydrophobes, la diffusion par les canaux aqueux dans les biofilms fongiques n'est peut-être pas favorable, d'où leur diffusion limitée. Mais cela pourrait être différent pour les nouvelles formulations. En effet, les NP sont recouvertes de PEG en surface, ce qui confère un caractère hydrophile et neutre à la particule. Cette caractéristique pourrait permettre aux NP de mieux diffuser et de circuler dans les canaux aqueux du biofilm. En effet, des chercheurs ont récemment démontré la présence de NP pegylées de polystyrène dans des canaux aqueux de biofilms bactériens [163]. Dans cette étude, les auteurs ont prouvé par microscopie de fluorescence (100x), microscopie confocale (60x) et par microscopie de suivi particulière (« *single-particle tracking* ») que les particules pegylées de taille de 100 ou 200 nm avec un potentiel zêta neutre en surface diffusaient principalement dans les canaux aqueux. Par conséquent, ces particules n'étaient pas en contact avec les amas de cellules bactériennes et donc sans interactions directes possibles. Ainsi, ces travaux nous permettent de faire une analogie avec nos propres résultats sur les biofilms fongiques. Par comparaison avec le biofilm bactérien, nous pouvons avancer l'hypothèse que les NP se retrouveraient principalement dans les canaux aqueux et y resteraient puisque leur nature hydrophile ne serait pas favorable à une interaction avec les amas de cellules (ou MEC) de nature plutôt hydrophobe. Cette hypothèse justifierait la raison pour laquelle les

formulations ont peu d'activité antifongique sur les biofilms, même si elles pénètrent dans la structure de celui-ci.

- La chimie de surface des NP et la MEC

La matrice extracellulaire est une composante du biofilm fongique qui fournit aux cellules une protection immunitaire et contre les agents antifongiques. La composition de la matrice extracellulaire est complexe. Toutefois, quelques études ont réussi à la caractériser [24]. En effet, la MEC contient des protéines, de l'hexosamine, du phosphore, de l'acide uronique ainsi que des carbohydrates. Toutefois, le principal carbohydrate rentrant dans la composition du biofilm est le beta-1,3-glucan. Le beta-1,3-glucan est un polysaccharide de nature hydrophile et soluble dans l'eau. Plusieurs auteurs ont montré que la quantité de beta-1,3-glucan était plus importante dans le biofilm que dans la paroi des cellules planctoniques [133, 164]. Il se retrouve en grande quantité dans la MEC ainsi que dans la paroi cellulaire. Sa participation au déclenchement d'une forme de résistance a aussi été évaluée. Des études ont montré que la MEC freinait la diffusion des PA libres. En effet, il a été démontré dans une étude que le beta-1,3-glucan agissait comme une « éponge » vis-à-vis l'AMB en retenant 4 à 5 fois plus d'antifongique que lorsque l'AMB a été utilisé sur des cellules planctoniques [165]. Ce phénomène confère un important mécanisme de résistance au biofilm fongique[23]. Les auteurs ont aussi démontré que l'AMB se liait physiquement au beta-1,3-glucan [27, 134]. Ainsi, ces travaux nous permettent de faire une analogie avec nos propres résultats sur les biofilms fongiques. Nous pouvons avancer l'hypothèse que les NP ne peuvent pas atteindre les cellules fongiques puisque le PEG en surface des NP aurait une affinité avec le beta-1,3-glucan. En effet, le beta-1,3-glucan a un caractère hydrophile tout comme le PEG. Ainsi, une fois l'AMB relarguée de la NP, nous émettons l'hypothèse que la partie hydrophile de l'AMB serait retenue par le beta-1,3 glucan, ce qui expliquerait la faible efficacité antifongique. La même hypothèse pourrait être avancée pour le VRZ puisqu'il a un log P de 1,8 (un peu hydrophile).

**Chapitre 5. Études de l'internalisation des nouvelles  
formulations sur des souches de *Candida albicans* ainsi que  
*Aspergillus nidulans***

## 1. Introduction

Un des défis lors de l'élaboration d'un nouveau nanovecteur est de comprendre les mécanismes d'interaction et d'internalisation avec les cellules. À ce jour, il y a peu de renseignements connus concernant le comportement et le devenir de nanovecteurs à base de polymères dans les cellules de champignons. Des propriétés telles que la taille des particules, la charge et la chimie de surface sont connues pour avoir une influence sur le processus d'internalisation dans les cellules eucaryotes. De façon générale, les particules inférieures à 200 nm de diamètre subissent une endocytose, mais les mécanismes provoquant cette internalisation restent encore mal connus [150, 166-169].

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré une amélioration significative du traitement antifongique avec de nouvelles formulations de NP/VRZ et NP/AMB. Dans ce chapitre, nous évaluerons si cette amélioration est due à une internalisation cellulaire dans des souches de *Candida albicans* et d'*Aspergillus nidulans*. En effet, il serait intéressant de comprendre de quelle façon le vecteur agit au niveau de la paroi cellulaire et/ou de la membrane plasmique.

Une connaissance plus approfondie de l'internalisation des nanovecteurs polymériques permettra de prévoir et de contrôler leur capacité de livraison extra ou intracellulaire dans les cellules de champignons. Du VRZ ainsi que de l'AMB encapsulé dans des nanoparticules de taille avoisinant les 200 nm seront préparées à partir d'un polymère de PEG-g-PLA greffé avec une sonde fluorescente (rhodamine). Leur localisation intracellulaire sera évaluée par microscopie de fluorescence et microscopie confocale.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1. Matériel**

Le VRZ et l'AMB proviennent de AK scientific (Union City, CA, USA). La sonde fluorescente PEG-Rhodamine-azide provient de Click Chemistry Tools (Scottsdale, AZ, USA). Tous les autres produits chimiques ont été achetés chez Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Les solvants proviennent de Laboratoire Mat (Montréal, Canada). Les produits chimiques ainsi que les solvants ont été utilisés tels quels, sans purification.

### **2.2. Matériel biologique**

Pour les études de localisation intracellulaire, des souches fournies par le laboratoire du Pr. Martine Raymond de l'IRIC ont été utilisées. La souche de *Candida albicans* 5674 et d'*Aspergillus nidulans* R153 ont été isolées d'échantillons provenant de la région buccale. Ces souches proviennent de la banque du laboratoire de Santé Publique du Québec (LSPQ). Les gènes CDR1 et CDR2, qui codent pour les pompes d'efflux, sont surexprimés sur la souche 5674 [137, 138]. La souche *Aspergillus nidulans* R153 est sensible aux azolés.

### **2.3. Synthèse du polymère PEG-g-PLA avec une sonde fluorescente (rhodamine-azide)**

La synthèse a été effectuée de la même façon que celle du PEG-g-PLA avec quelques modifications pour être en mesure de greffer la sonde fluorescente (chapitre 3) [82]. La structure de la sonde fluorescente est présentée à la figure 37.

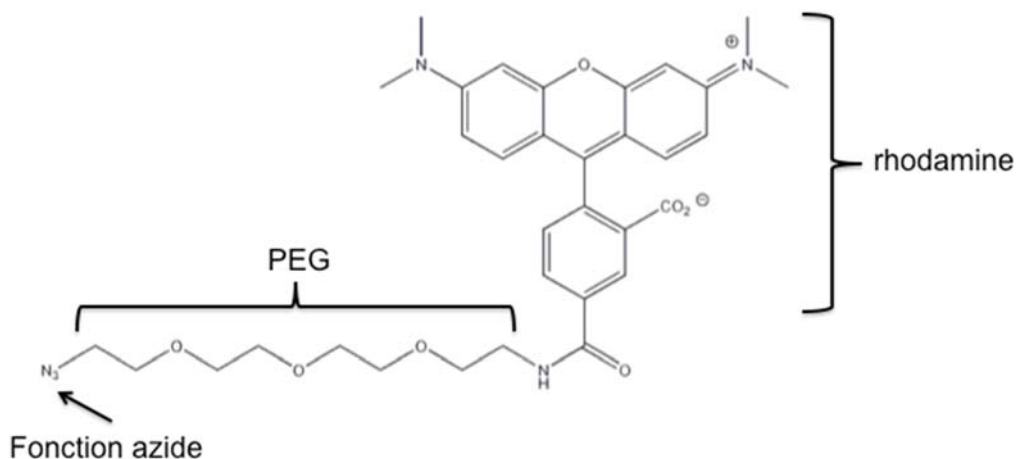


Figure 37 :Structure chimique de la sonde fluorescente; PEG-Rhodamine-azide (PEG MM 132)

Le schéma de synthèse du polymère fluorescent est présenté à la figure 38. Brièvement, le dilactide est mélangé à un catalyseur en présence de propargyl glycidyl éther pour obtenir un polylactide-co-éther portant des groupements latéraux alcyne. Après avoir séché le polymère sous vide, une quantité d'un gramme de polymère est dissoute dans du THF dégazé à l'azote. Cinq mg de sonde fluorescente (PEG-rhodamine-azide, MM 631,7 , 8 mM) sont dissous avec le polymère en présence du ligand PMDETA et du catalyseur CuBr(I). L'ajout de PEG-rhodamine-azide (PEG MM 132  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) correspond à 5 % du 1% de fonction alcyne disponible. Le tout est mis à 40 °C sous agitation pendant 48 h. Ensuite, le restant d'alcyne non réagit sera greffé avec du PEG-azide (270 mg) pendant 24 h. Le solvant est évaporé puis une extraction DCM/eau est effectuée. La phase organique devient rose, confirmant la présence de rhodamine et la phase aqueuse reste translucide. La caractérisation est effectuée selon les méthodes habituelles, soit par RMN et GPC.

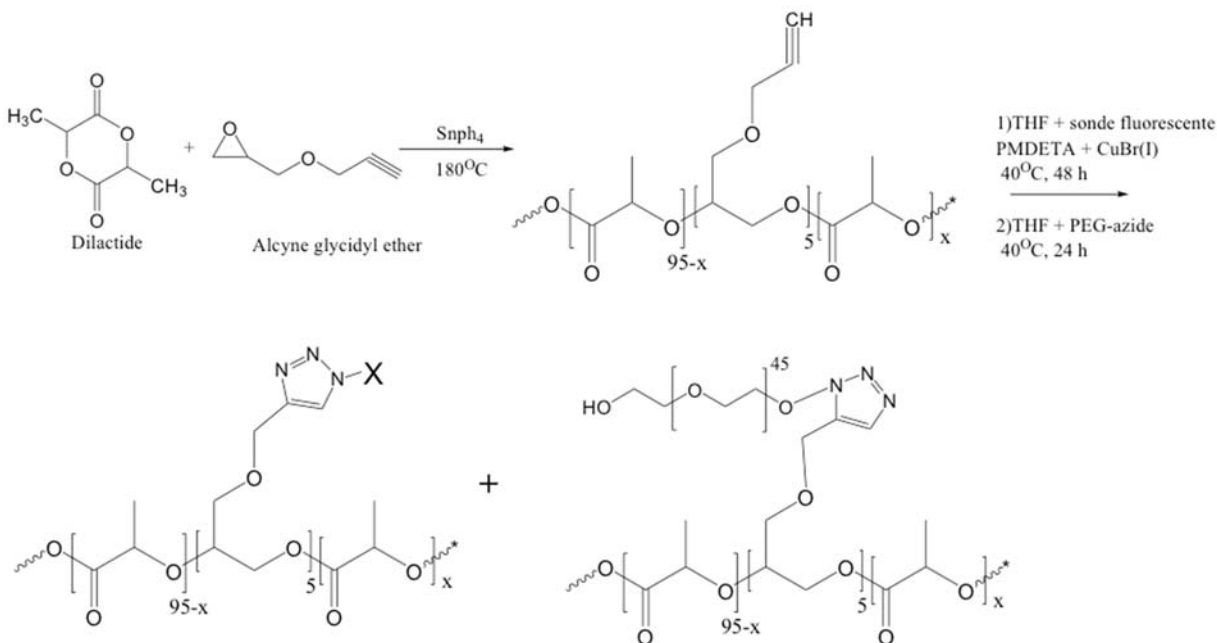


Figure 38 Schéma de synthèse du polymère fluorescent. X représente la sonde fluorescente représentée à la figure 37

## 2.4. Fabrication et caractérisation des NP

La fabrication des NP vides et d'antifongique encapsulé est effectuée de façon similaire à la fabrication des NP du chapitre 3. Les NP sont préparées par une méthode classique d'évaporation/élimination de solvant. L'émulsion est obtenue grâce à un homogénéiseur à haute pression. Brièvement, les polymères et les principes actifs sont dissous dans un solvant organique ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Le polymère fluorescent est mélangé avec le polymère non fluorescent dans une proportion de 1/39 (2,5% m/m). La solution est ensuite émulsionnée à une phase aqueuse contenant un tensioactif non ionique (PVA 0,5 % v/v). Le solvant organique est ensuite éliminé par extraction et évaporation. Les nanoparticules sont récupérées par centrifugation. Elles sont conservées, congelées ou séchées par lyophilisation [83, 170].

La taille des particules a été évaluée en milieu aqueux par diffusion dynamique de la lumière (DLS, Zetasizer NS, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Le potentiel zêta a



été mesuré en utilisant le même instrument dans une solution saline NaCl (0,25%). Les résultats ont été rapportés sous forme de moyenne de trois mesures différentes.

## **2.5. Études d'internalisation des nouvelles formulations dans des cellules de *Candida albicans* et *Aspergillus nidulans***

Les nouvelles formulations de NP/VRZ et NP/AMB contenant la molécule fluorescente (RHO) greffée sur le polymère PEG-g-PLA ont été préparées en vue d'étudier leur localisation intracellulaire sur une souche de *Candida albicans* et d'*Aspergillus nidulans*. Les souches ont été cultivées pendant 24 heures, à 37 °C, dans une plaque de 96 puits contenant du milieu de culture YPD supplémenté avec 2% (v/m) de glucose. La concentration fongique finale est de  $0,5-2,5 \times 10^3$  cellules.mL<sup>-1</sup>. Les formulations ont été ajoutées aux puits pour une durée de 2 h. La concentration utilisée pour chaque antifongique a été la plus haute concentration du protocole NCCLS. Pour la formulation NP/VRZ, une concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup> en VRZ a été utilisée. Pour la formulation NP/AMB, la concentration était de 4 mg.L<sup>-1</sup> en AMB. Ensuite, les cellules traitées ont été nettoyées avec une solution de PBS. Puis, un aliquot de 10 µL de cellules traitées en suspension a été pris puis placé sur une lame de microscope enduite de poly-lysine, le tout recouvert d'une lamelle. Les lames ont ensuite été observées par microscopie à fluorescence et microscopie confocale.

### **2.5.1. Microscope à fluorescence**

Les images de fluorescence ont été obtenues par le canal rouge lointain (TRITC longueur d'onde 400 nm) et de contraste de phase (DIC) avec un microscope à fluorescence (microscope Olympus IX81, Markham, ON) à l'aide d'un objectif 100X avec immersion à huile. Les images de fluorescence et de DIC ont été acquises simultanément avec les mêmes réglages de mise au point puis fusionnées avec le logiciel MetaMorph® Advanced Software (Olympus).

### **2.5.2. Microscope confocal à balayage laser**

La fluorescence a aussi été détectée par un microscope confocal à balayage laser Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Exton, PA) à l'aide d'un objectif 100X (n.a. 1,40–0,7) avec immersion à huile. Les images de fluorescence ont été obtenues par le canal rouge lointain sur des lamelles optiques de 0,9  $\mu\text{m}$  d'épaisseur enduites de poly-lysine. Les lamelles ont été balayées avec une résolution de 2048x2048 pixel. Les images sans fluorescence ont été obtenues sans filtre, soit en contraste de phase interférentiel. Les images ont ensuite été traitées et assemblées par le logiciel Figi [171]. Les reconstitutions des coupes transversales des images ont été effectuées avec le logiciel Leica LCS (version 2.61).

### 3. Résultats

#### 3.1. Synthèse et caractérisation du polymère PEG-g-PLA-Rhodamine

Le polymère fluorescent a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle et sa structure est présentée à la figure 39. Pour éviter la fuite de la sonde fluorescente, celle-ci a été greffée de façon covalente au polymère. Ainsi, la fluorescence présente dans les figures de microscopie représente bien les NP et non pas la sonde libre.

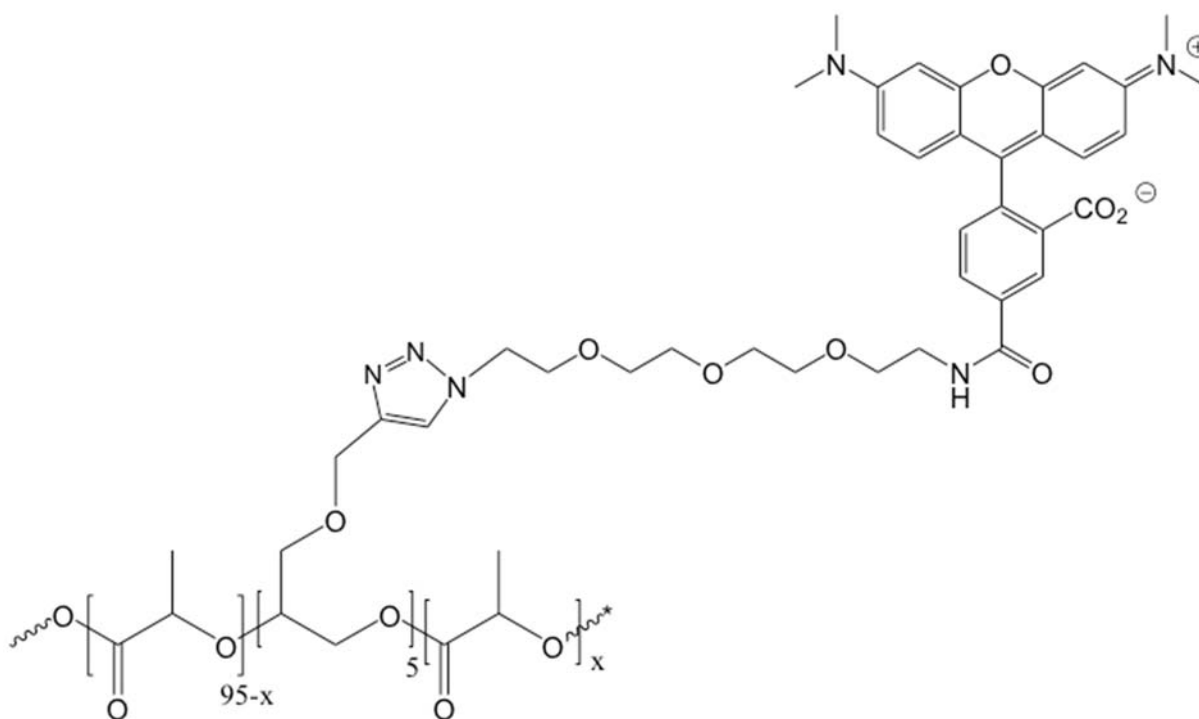


Figure 39 :Structure chimique du polymère fluorescent

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du polymère est présenté à la figure 40.

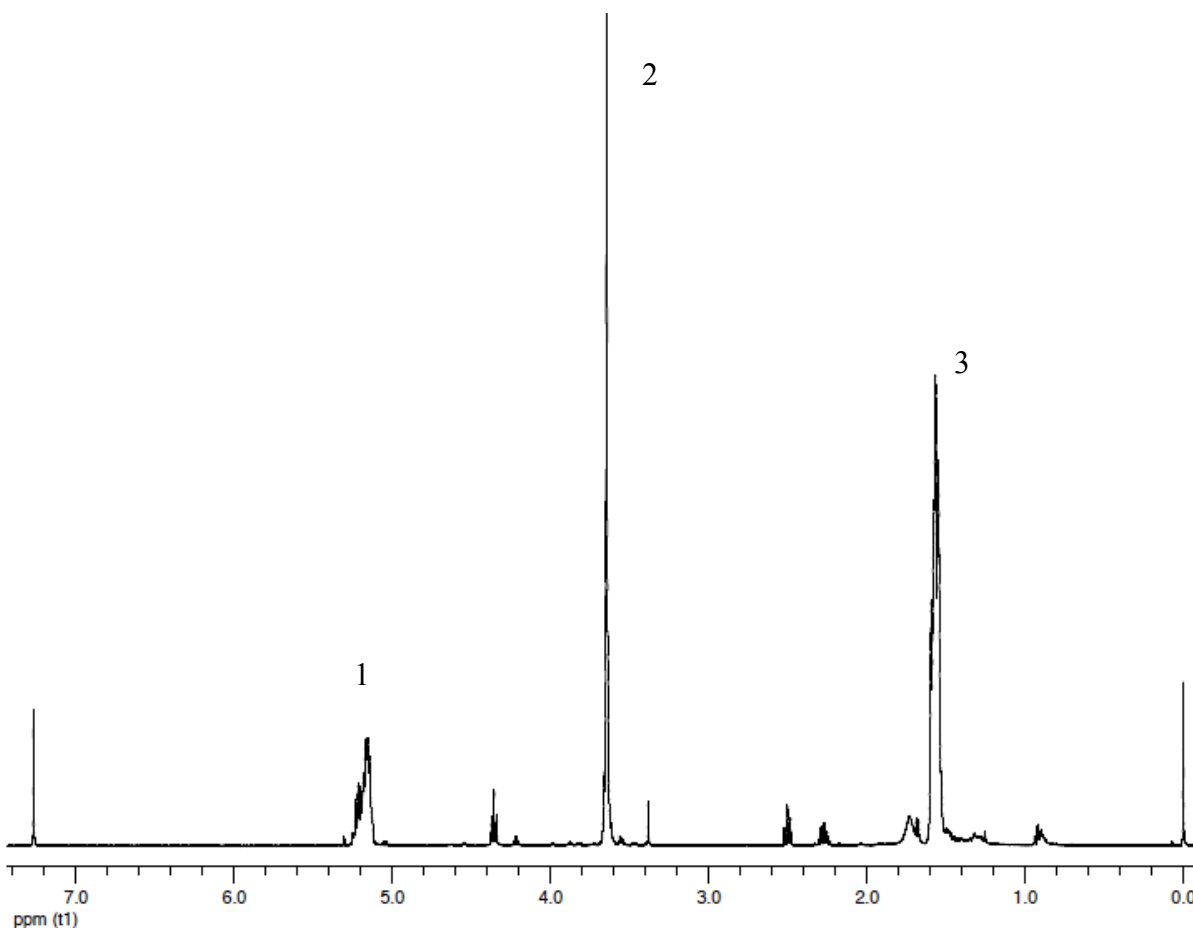


Figure 40 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du polymère fluorescent Rh-PEG-g-PLA dans le  $\text{CDCl}_3$

L'analyse RMN  $^1\text{H}$  permet de confirmer la structure et de déterminer le ratio de la quantité de chaînes de PEG greffées par rapport à la quantité de chaînes de PLA. Comme le montre la figure 40, les signaux à 5,14; 1,54 et 3,62 (pics représentés respectivement par 1, 3, 2) peuvent être attribués respectivement aux protons des groupes CH,  $\text{CH}_3$  de la chaîne PLA et  $\text{CH}_2$  de la chaîne de PEG (PEG non fluorescent). L'intégration des pics CH et  $\text{CH}_2$  a été utilisée pour calculer le pourcentage de chaînes de PEG par rapport aux chaînes de PLA et les résultats de cette analyse sont présentés au tableau 26. Le rapport calculé par RMN  $^1\text{H}$  est semblable à la valeur visée expérimentalement. Il est important de spécifier que le pourcentage d'alcyne greffé sur la chaîne de PLA correspond à 1%. La quantité de sonde fluorescente qui a été ajoutée correspond à 5 % du 1% d'alcyne disponible. Le restant de groupes alcyne, qui n'a

pas réagi avec la sonde fluorescente, a été dérivé avec du PEG-azide (non fluorescent). Ainsi, les protons ( $^1\text{H}$ ) spécifiques du PEG de la sonde fluorescente ne sont pas visibles sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  étant donné que la quantité greffée est très faible (quantité presque non détectable par RMN  $^1\text{H}$ ) ou que le pic est fusionné avec le pic représentant les  $^1\text{H}$  du PEG-azide. On a supposé que la sonde a été greffée sur le polymère sur la base de la dernière étape de la synthèse alors que l'extraction dans le DCM permet d'obtenir une phase organique rose. Sachant que la sonde est soluble dans l'eau, si le greffage avait échoué, la sonde se serait retrouvée également dans la phase aqueuse. Or, lors de l'extraction, seule la phase organique était colorée. Quant aux  $^1\text{H}$  aromatiques de la fonction rhodamine, ils ne sont pas visibles sur le spectre étant donné la quantité très faible ajoutée.

Tableau 26 : Caractérisation du polymère Rh-PEG-g-PLA par GPC, DSC et RMN  $^1\text{H}$

<b>Polymère</b>	<b>Greffage théo. du PEG-Rh (mol%)</b>	<b>Greffage du PEG visé/calculé exp.</b>	<b>Mn</b>	<b>Mw</b>	<b>Mw/Mn</b>
Rh-PEG-g-PLA	0,05%	0,95%/0,98%	16700	22600	1,36

Le greffage du PEG (et non pas du PEG-Rh) a également été confirmé par analyse GPC. La GPC a permis de déterminer la masse molaire moyenne et la polydispersité du polymère. Les résultats sont présentés au tableau 26. Le chromatogramme GPC démontre un pic important à 22 600 Da ce qui confirme la polymérisation. La présence d'un petit pic autour de 1700 Da confirme qu'une petite quantité de PEG 2000 Da n'a pas réagi. Toutefois, le faible indice de polydispersité du pic principal confirme que les longueurs de chaînes de polymère sont homogènes, indiquant une polymérisation contrôlée et une préparation du polymère fluorescent bien définie. Au final, il est important de noter que la quantification de la sonde fluorescente n'est pas possible avec les techniques utilisées. Cela dit, l'élément important reste que la sonde soit greffée, ce qui a été prouvé. Lors de la fabrication des NP, seulement 5% du polymère fluorescent est utilisé (95% provient du polymère non-fluorescent). On peut estimer que la sonde fluorescente n'aura pas d'influence sur l'internalisation (étant donné qu'elle est utilisée en petite quantité). Toutefois, la quantité de polymère fluorescent reste adéquate

puisqu'il est possible de suivre les NP par fluorescence (son utilisation est qualitative et non quantitative).

### 3.2. Caractérisation des NP

Des NP fluorescentes vides et contenant du VRZ ou de l'AMB ont été préparées et la caractérisation est présentée au tableau 27. Les tailles de particules concordent avec les tailles des NP fabriquées au Chapitre 3.

Tableau 27 : Caractérisation des NP

Formulations	Taille±É.T <sup>1</sup> (nm)	PdI <sup>2</sup>
Rh-NP vides	165±6	0,163
Rh-NP/VRZ	180±3	0,058
Rh-NP/AMB	187±5	0,108

<sup>1</sup> Écart-type sur moyenne des tailles par DLS

<sup>2</sup> indice de polydispersité

### 3.3. Internalisation des NP dans les cellules de *Candida albicans* ainsi que d'*Aspergillus nidulans*

#### 3.3.1. Microscopie de fluorescence « classique »

Souches *Candida albicans*

Les nouvelles formulations ont été évaluées par microscopie de fluorescence et les images sont représentées aux figures 41 à 43. La figure 41 représente des cellules de *Candida albicans* ayant été traitées avec des NP vides selon une concentration de 3,2 mg.mL<sup>-1</sup>

(concentration la plus élevée selon le test NCCLS). Lors des tests de susceptibilité aux antifongiques *in vitro* effectués au chapitre 4, nous avons démontré que les NP vides (sans PA) ne présentaient pas de toxicité importante sur les souches analysées (figures 32 et 33). Toutefois, la viabilité cellulaire n'était pas à 100%. Cette toxicité non spécifique est due à une forte concentration de NP et non pas à un effet antifongique. Or, en mettant en relation ces résultats avec les images de microscopie, nous pouvons noter que certaines cellules semblent abîmées. Nous pouvons aussi remarquer que les NP se retrouvent à l'intérieur du noyau.

La figure 42 représente les images obtenues avec la formulation NP/VRZ. Les formulations ont été testées à la concentration la plus élevée du test NCCLS, soit pour le NP/VRZ, une concentration de 0,1 mg.L<sup>-1</sup>. Trois formes morphologiques sont présentes, soient les formes levure, pseudohyphe et hyphe (respectivement représenté par 1-2-3 dans la figure 42). Nous pouvons remarquer qu'il y a internalisation des NP dans les cellules de *Candida albicans* avec une accumulation de NP importante dans la forme hyphe. Cette accumulation est tellement importante que l'on peut apercevoir une texture granulée confirmant l'accumulation de NP. Au niveau structural et morphologique, il est bien établi dans la littérature que la forme hyphe et pseudohyphe sont différentes de la forme levure (ovoïde) [172]. Cette différence pourrait être à l'origine d'une plus grande perméabilité des NP dans les formes pseudohyphes.

Nous remarquons aussi que dans 2 levures « ovoïdes » de la figure 42 (flèche 2) pour lesquelles nous observons une internalisation, les noyaux sont granuleux. Il semble que les NP aient réussi à pénétrer dans le noyau. Il serait légitime de se demander si les NP peuvent interagir avec l'ADN et ainsi interférer au niveau de la synthèse de l'ARN. La figure 43 représente les images de fluorescence de cellules de *Candida albicans* suite à un traitement avec la formulation NP/AMB. Nous pouvons noter les mêmes observations que pour la formulation NP/VRZ.

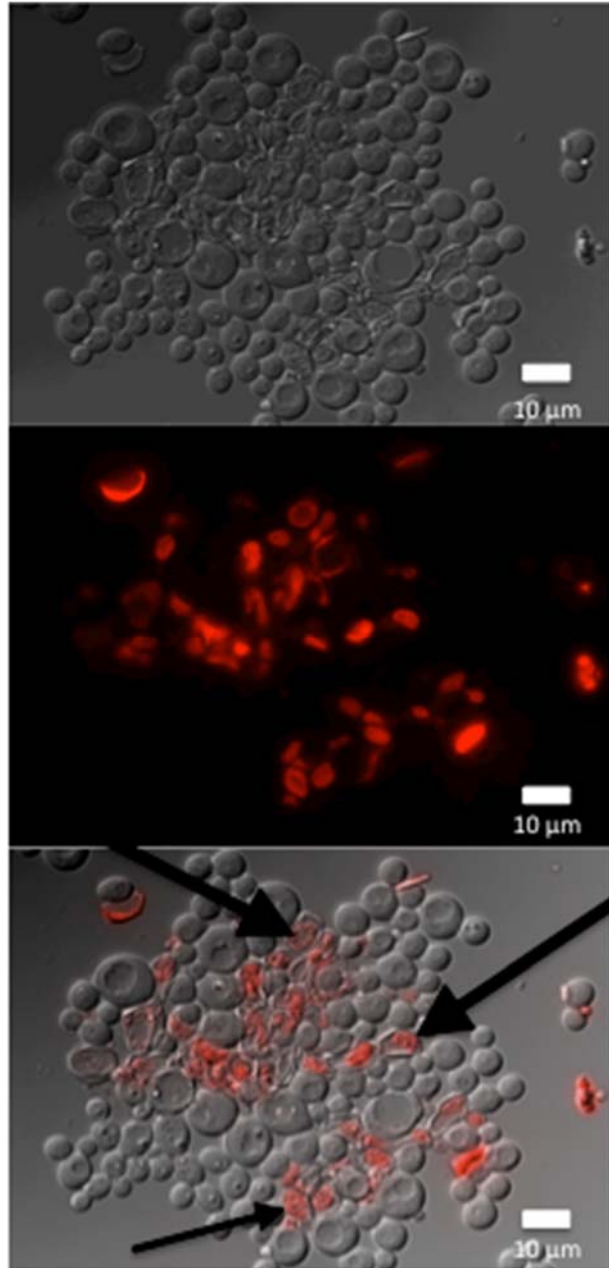


Figure 41 : Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de **Rh-NP vides** après 2h de traitement sur des cellules de *Candida albicans* souche LSPQ 5674. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC



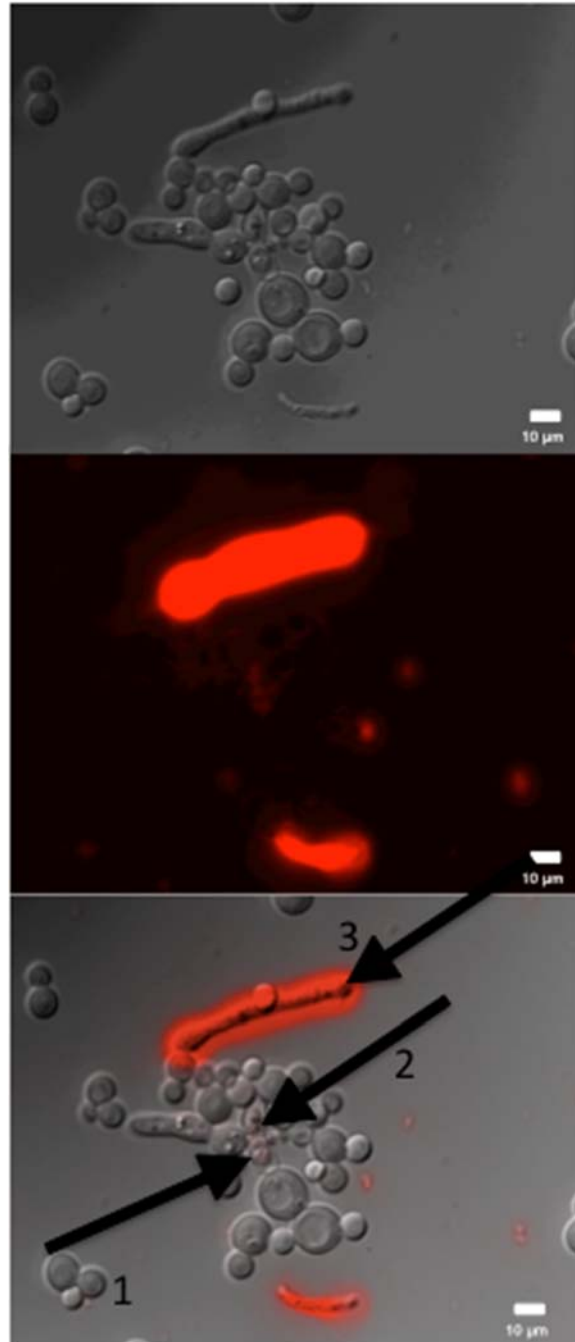


Figure 42 : Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de **Rh-NP/VRZ** (NP fluorescentes encapsulées de VRZ) après 2h de traitement sur des cellules de *Candida albicans* souche LSPQ 5674. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC

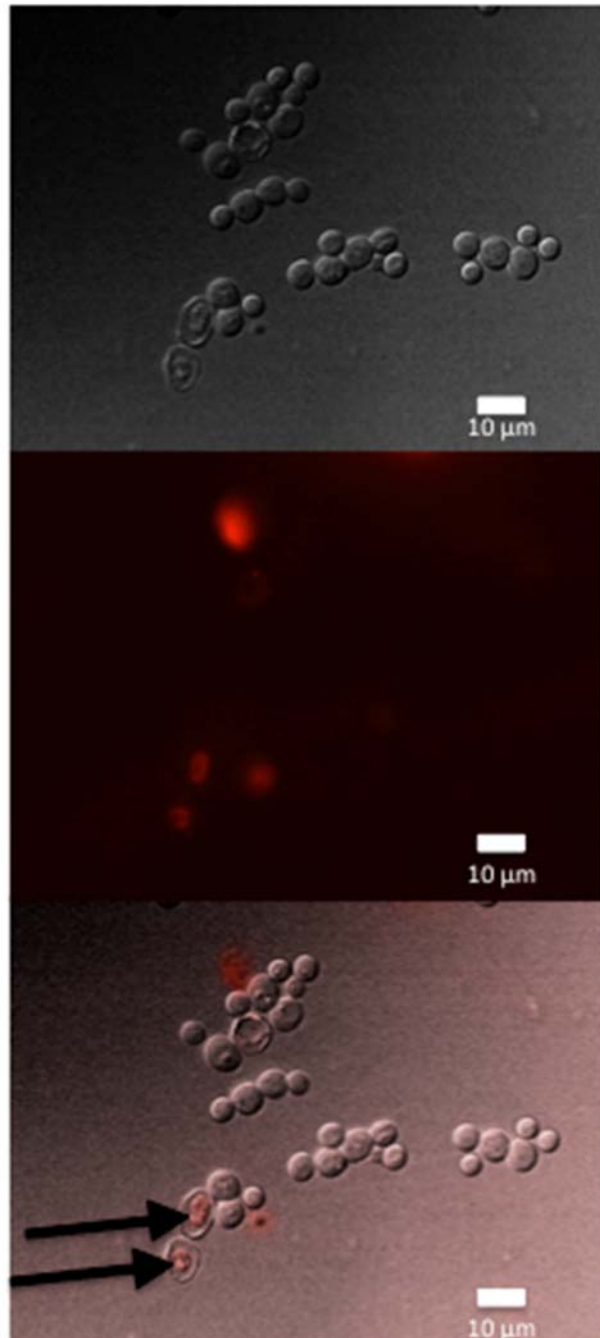


Figure 43 : Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de **Rh-NP/AMB** (NP fluorescentes encapsulées de AMB) après 2h de traitement sur des cellules de *Candida albicans* souche LSPQ 5674. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC

## Souches *Aspergillus nidulans*

En raison de différentes contraintes techniques, nous n'avons pas été en mesure de tester les formulations d'antifongiques sur une souche d'*Aspergillus fumigatus*. Une souche d'*Aspergillus nidulans* a plutôt été utilisée et traitée avec la formulation NP/AMB. Les images de microscopie sont présentées à la figure 44. La souche *Aspergillus nidulans* R153 est sensible aux azolés et aux polyènes. Lorsque nous avons testé *in vitro* la nouvelle formulation d'AMB sur la souche d'*Aspergillus nidulans*, nous avons remarqué une amélioration du traitement antifongique par rapport aux antifongiques en solution (traitement conventionnel) (voir Chapitre 4, section 3.3). Il est intéressant de noter que les NP s'internalisent dans les hyphes de l'*Aspergillus nidulans* et que l'amélioration de l'activité antifongique est probablement causée par l'internalisation des NP.

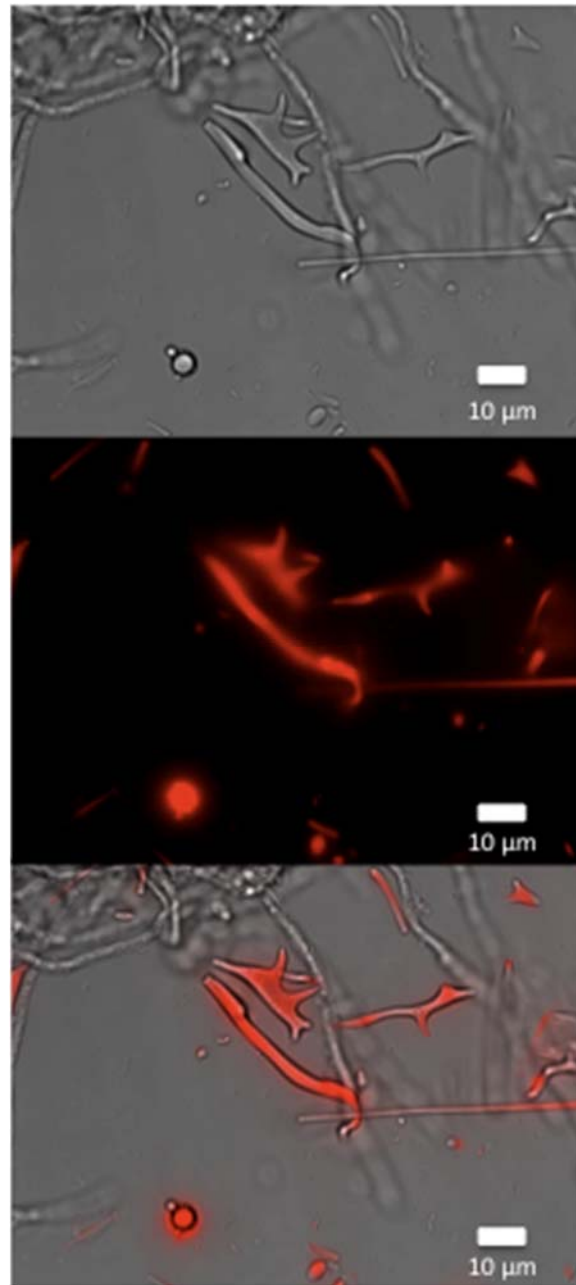


Figure 44: Images de microscopie de fluorescence à grossissement 100X de **Rh-NP/AMB** (NP fluorescentes encapsulées de AMB) après 2h de traitement sur des cellules *d'Aspergillus nidulans* souche R153. Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h. Les images de haut en bas représentent respectivement le filtre DIC, TRITC et la superposition des images DIC et TRITC

### 3.3.2. Microscopie confocale

La microscopie de fluorescence ne permet pas de confirmer à elle seule l'internalisation. Pour confirmer l'internalisation des NP et rejeter la possibilité d'une simple adhésion des NP sur la surface des levures, nous avons effectué des analyses de microscopie confocale et les figures sont présentées ci-dessous (figures 45 à 47). La microscopie confocale permet de déterminer la fluorescence dans les 3 dimensions (plans X, Y et Z) incluant la profondeur en « Z », ce que ne permet pas la microscopie fluorescence « classique ».

Les images de microscopie confocale pour les formulations BI-NP, NP/VRZ et NP/AMB sont présentées respectivement aux figures 45, 46 et 47. Chaque image de microscopie confocale ci-après représente un empilement de 6 coupes d'épaisseurs de 0,5  $\mu\text{m}$  avec des coupes transversales correspondantes. Pour l'ensemble des figures, nous remarquons que la fluorescence se retrouve à l'intérieur de la cellule. Plus précisément, la fluorescence se trouve au centre des coupes transversales, confirmant la présence de NP dans le cytosol et/ou noyau et pas seulement en surface de la cellule. Ainsi, nous pouvons clairement exclure l'hypothèse des NP se trouvant uniquement sur la membrane plasmique.

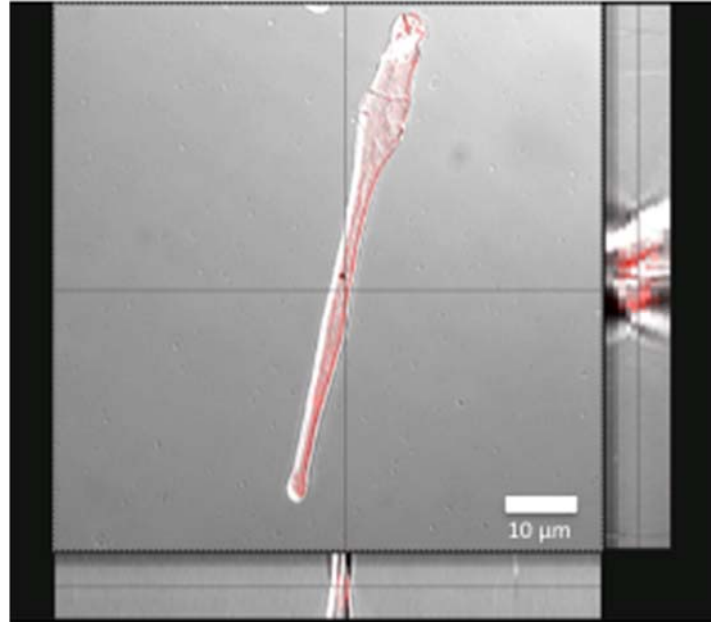


Figure 45 : Images de microscopie confocale à grossissement 100X sur une cellule unique sous forme hyphe de *Candida albicans* souche LSPQ 5674 traitée pendant 2 h avec **Rh-NP vides**. La cellule a été cultivée préalablement pendant 24 h.

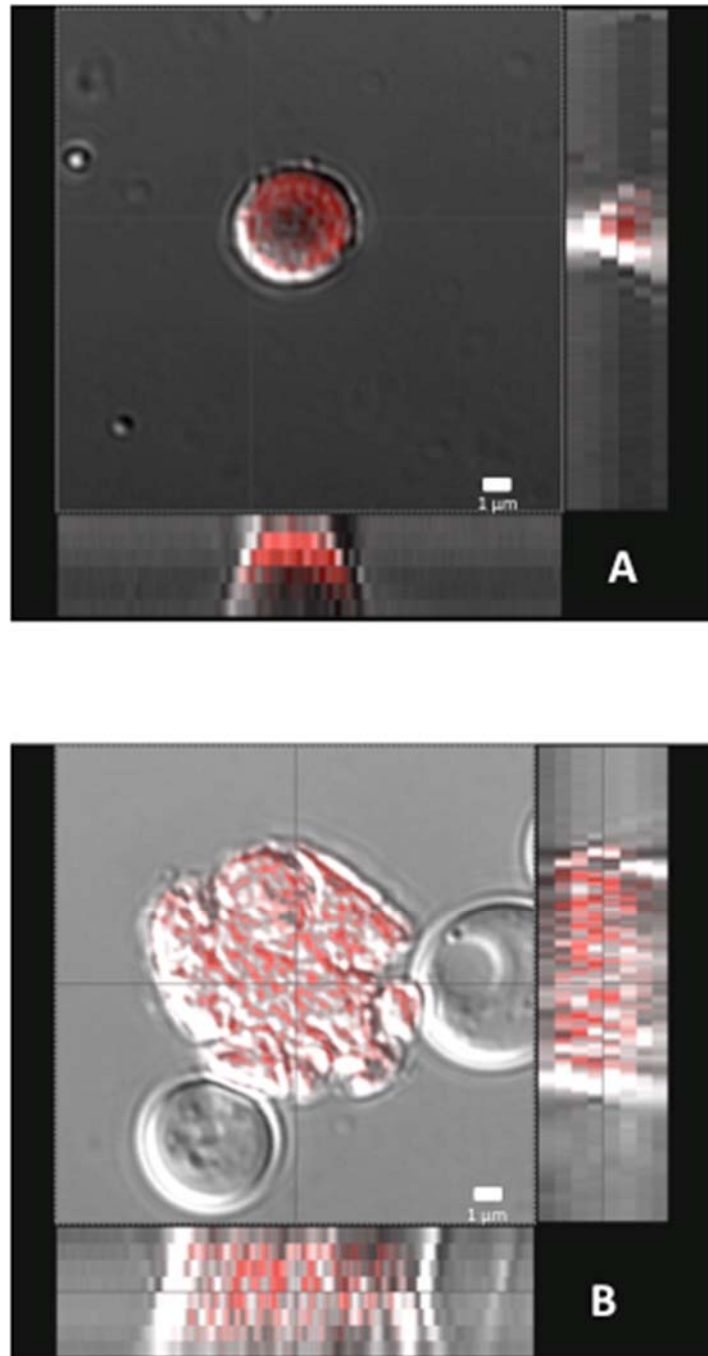


Figure 46: Images de microscopie confocale à grossissement 100X sur 2 cellules différentes (A et B) *Candida albicans* souche LSPQ 5674 en forme levure traitées pendant 2 h avec **Rh-NP/VRZ** (NP fluorescentes encapsulées de VRZ). Les cellules ont été cultivées préalablement pendant 24 h

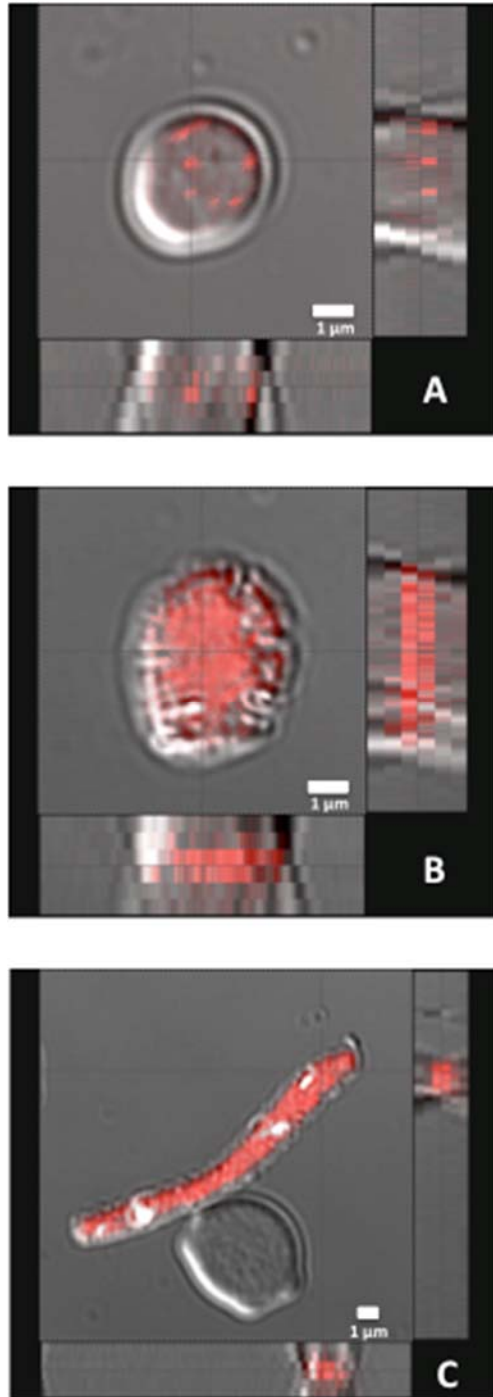


Figure 47 : Images de microscopie confocale à grossissement 100X de 3 cellules différentes de *Candida albicans* souche LSPQ 5674. Figure A et B représente la forme levure, figure C représente la forme hyphé. Les cellules ont été traitées pendant 2 h avec **Rh-NP/AMB** (NP fluorescentes encapsulées de AMB) et cultivées préalablement pendant 24 h.



## 4. Discussion

Différentes formulations d'antifongiques (NP/VRZ et NP/AMB) ont été préparées dans le but d'évaluer la localisation intracellulaire des NP avec des cellules de *Candida albicans* et des cellules d'*Aspergillus nidulans* et de corréler nos résultats avec les tests d'efficacité antifongiques *in vitro*. Les formulations ont été testées sur des cellules ayant été incubées préalablement pendant 24 h. Nous avons procédé ainsi pour être certain de pouvoir observer le phénomène d'internalisation dans les levures. Généralement, les levures ne sont pas confluentes à l'étape de l'ensemencement lors d'une étude d'efficacité antifongique. La tentative d'observer les cellules à ce stade de croissance est difficile. Pour s'assurer d'avoir une population confluyente pour les études de microscopie, nous avons laissé incuber les cellules pendant 24 h. Il faut tenir compte aussi que les cellules traitées après 24 h ne sont pas au même stade de croissance que les cellules au tout début de l'ensemencement. En effet, les cellules après 24 h de croissance ont atteint la maturité et présentent différentes formes morphologiques. Les levures peuvent changer de façon réversible entre les formes levure, pseudohyphes et hyphes. La double paroi (paroi cellulaire et membrane plasmique) est généralement bien en place dans les cellules à maturité, ce qui n'est pas le cas pour les cellules plus précoces.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'internalisation des NP est rendue possible puisque celles-ci sont couvertes d'une couche de PEG. Or, il est bien établi dans la littérature que le PEG favorise l'endocytose dans les cellules eucaryotes, bien que ce ne soit pas démontré pour les champignons [173, 174].

Nous avons aussi constaté que le potentiel zêta des NP est proche de zéro, ce qui confirme une surface neutre. Cette neutralité par la présence de PEG peut réduire la répulsion électrostatique du PLA (chargé négativement) et la membrane plasmique chargée aussi négativement, ce qui pourrait faciliter la mucoadhésion des particules sur la surface de la cellule et induire l'internalisation.

Il est bien établi dans littérature que la taille des particules joue un rôle clé dans l'adhésion et dans l'interaction avec les cellules vivantes. À cet égard, les NP de taille variant entre 100 nm et 250 nm peuvent s'internaliser par différents mécanismes d'endocytose, comparativement aux particules de taille d'environ 500 nm qui s'internalisent par phagocytose [175, 176]. Avec les résultats d'internalisation obtenus et une taille de particules avoisinant les 200 nm, nous postulons que l'absorption des NP se fait principalement par la voie d'endocytose.

## **Chapitre 6. Discussion générale**

# **1. Mise au point de nanoparticules à base de PEG-g-PLA pour l'administration d'antifongiques**

Les travaux effectués dans le cadre de ce doctorat ont pour but de mettre au point des nouvelles formulations d'antifongiques sous forme de nanoparticules polymériques en vue d'améliorer l'efficacité et la spécificité des traitements antifongiques sur des souches sensibles et résistantes de *Candida spp*, d'*Aspergillus spp* et des souches de *Candida albicans* formant du biofilm. Il est important de noter que peu d'études ont mis l'accent sur l'élaboration de nouvelles formulations d'antifongiques à base de polymères non-toxiques destinées aux traitements des mycoses, donnant ainsi une grande importance et originalité aux travaux effectués dans cette thèse.

Depuis maintenant plus d'une décennie, l'équipe du Pr. Patrice Hildgen travaille sur le développement de polymères polyesters-co-éthers greffés latéralement par divers groupes fonctionnels dans le but de préparer des nanovecteurs de médicament pour différentes applications. Au cours des années, il a été démontré à maintes reprises le potentiel du polymère PEG-g-PLA pour la vectorisation de différents principes actifs [83, 107, 119, 135].

Dans la première partie de cette thèse, nous avons synthétisé et caractérisé un polymère à base de polyester-co-polyéther branché avec du polyéthylène glycol (PEG-g-PLA). Les polymères PLA et PEG sont des matériaux déjà utilisés en clinique, ce qui diminue les risques de toxicité dans une perspective de développement. En plus d'être original et innovateur, le co-polymère PEG-g-PLA a démontré dans des travaux antérieurs son innocuité sur des tissus (cellules de mélanome de souris et cellules aortiques de rat) et chez des animaux. Ce co-polymère possède en plus la caractéristique de pouvoir libérer un principe actif sur une période prolongée [119, 122].

La structure du polymère en forme de peigne permet, contrairement aux formes linéaires, une densité de greffage ajustable, ce qui donne la possibilité d'y greffer

indépendamment des éléments de furtivité sur la chaîne (dans notre cas, le PEG) ou de ciblage (par exemple une molécule de glucosamine) [177-180]. Cette structure du polymère permettra de créer des NP en forme de brosse.

Trois antifongiques couramment utilisés en clinique et présentant une biodisponibilité non optimale, en raison de leurs propriétés physicochimiques, ont été choisis, soit deux azolés, le VRZ et ITZ et un polyène, l'AMB. Ces principes actifs (PA) présentent aussi d'importants problèmes de toxicité. Des NP polymériques contenant ces PA ont été préparées par une technique d'émulsion huile-dans-l'eau (H/E) suivie d'évaporation de solvant. Pour chaque PA, nous avons utilisé différents solvants (tableau 4 chapitre 3) assurant leur solubilisation, avant émulsification dans une phase aqueuse contenant un surfactant, le PVA. Durant l'émulsification, de fines gouttelettes de solvant contenant le polymère et le PA se sont formées. Suite à cette étape, l'évaporation du solvant a provoqué la précipitation du polymère et par conséquent la formation de NP entourées d'une couronne de PEG ancrée à la surface des particules.

Une fois fabriquées, les NP ont été purifiées puis caractérisées et des particules de taille d'environ 200 nm de diamètre ont été obtenues. La mesure du potentiel zêta a révélé que l'utilisation du PEG camouflait la charge négative du PLA en surface de la NP. Les NP ont été conçues pour avoir une structure cœur/couronne avec un cœur constitué de polymère hydrophobe (PLA) et une couronne hydrophile de PEG. Le cœur hydrophobe permet d'agir comme matrice réservoir pour le PA hydrophobe tandis que la couronne de nature hydrophile stabilise les NP et prolonge le temps de circulation plasmatique. Une faible efficacité d'encapsulation a été obtenue pour le VRZ. Toutefois, l'AMB encapsulée dans les NP a montré des taux d'encapsulation satisfaisants. En effet, le caractère hydrophobe du PLA assure une bonne affinité avec les PA faiblement hydrosolubles, particulièrement l'AMB qui est le plus hydrophobe des agents sélectionnés.

Par la suite, nous avons étudié les profils de libération des PA à partir des NP. Les cinétiques de libération présentées au chapitre 3 ont démontré un effet *burst* important qui pourrait être attribué à la présence de molécules de PA près de la surface des NP. Les études

de libération contrôlée ont montré un relargage des PA sur plusieurs jours. Quant à l'effet *burst* de la formulation AMB, nous avons observé un effet relativement moins prononcé comparativement aux azolés. Ce phénomène peut être expliqué par une localisation plus profonde du PA dans la matrice, ou simplement que le PA est hydrophobe et que les conditions sink n'ont pas été atteintes.

Dans la dernière partie de ce chapitre de caractérisation, nous avons testé la capacité de la nouvelle formulation à atteindre les parties inférieures du système pulmonaire jusqu'à la région de l'alvéole. Pour ce faire, l'USP recommande des tests sur un modèle mécanique de poumons, l'impacteur en cascade. Ainsi, nous avons procédé à des études de simulation du devenir de la nouvelle formulation nébulisée. Ces études appuient le rationnel de l'utilisation de nanoparticules pour l'administration pulmonaire. La formulation NP/AMB a été testée sur un modèle mécanique de poumon, un impacteur en cascade, et a permis de démontrer le potentiel de cette formulation à être administrée par voie pulmonaire. En effet, les résultats sur l'impacteur en cascade ont montré que la majorité de la formulation s'est déposée sur la cupule correspondant aux bronches, endroit où se situent majoritairement les infections fongiques pulmonaires.

Pour administrer un PA par inhalation, il est important de tenir compte de plusieurs paramètres qui sont d'une part la pénétration et le dépôt de l'aérosol de la molécule considérée dans les voies aériennes. Celles-ci dépendent des caractéristiques physiques de l'aérosol, notamment de ses propriétés aérodynamiques, des paramètres respiratoires du patient et de l'anatomie des voies aériennes. Par ailleurs, il faut aussi considérer les modalités de libération du PA de la formulation, sa diffusion au site action cellulaire.

Tel que discuté dans le chapitre 3, pour cibler les bronches dans le poumon, il est nécessaire d'avoir des tailles de particules entre 2 et 5  $\mu\text{m}$ . Par contre si nos particules encapsulant l'antifongique ont cette taille, elles n'auront pas les caractéristiques pour diffuser dans le mucus pulmonaire pour entrer par la voie d'endocytose dans les cellules pulmonaires (ou fongiques) ou encore pour libérer rapidement leur PA. Ces propriétés ne seront obtenues que lorsque les tailles sont nanométriques (ici < 200 nm)

Il est important de noter que la taille des NP (environ 200 nm) n'est pas adaptée pour un ciblage direct des bronches par inhalation. Cependant, lorsque l'on procède à la nébulisation de la formulation, les NP ne sont pas sous forme sèche mais en suspension dans une phase liquide. C'est cette phase liquide sous forme de gouttelettes qui est transportée dans le système respiratoire. Lors de la nébulisation, chaque gouttelette contiendra une certaine quantité de NP et les gouttelettes qui auront une taille entre 2 et 5  $\mu\text{m}$  et une densité optimale pourront atteindre les bronches.

La gouttelette doit être « optimisée » en taille pour cibler les bronches. Pour optimiser les paramètres de taille de la gouttelette, nous pouvons faire varier les paramètres de nébulisation, soit le type de solvant (sa viscosité), la pression et le débit du gaz vecteur et surtout le type de nébuliseur (type de buses).

À ce jour et à notre connaissance, l'administration par les voies aériennes supérieures n'a jamais été abordée dans ce sens, alors que ce sont soit des poudres sèches qui sont administrées par inhalateur, soit ce sont des liquides qui sont nébulisés. Pour mieux comprendre ces explications la figure 48 ci-dessous schématise le devenir de la NP envisagé dans le poumon.

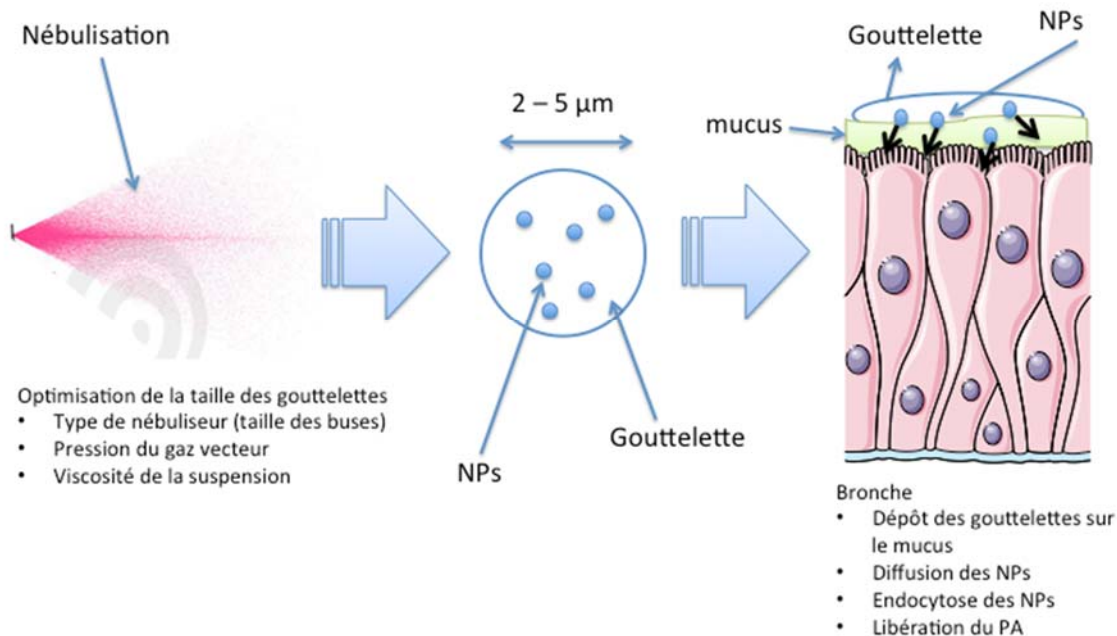


Figure 48 : Vue schématique du devenir des NP dans le poumon

En conclusion, nous avons démontré qu'il était possible de préparer des NP biodégradables de taille appropriée puisque la majorité de la formulation nébulisée s'est déposée sur les cupules du modèle mécanique de poumon correspondant à la localisation des bronches (figure 29, chapitre 3). Ce procédé permet d'incorporer des PA dans les NP ayant une solubilité aqueuse limitée. Enfin, bien que ces NP présentent un effet *burst* important, elles assurent une libération sur plusieurs jours. Ces résultats demeurent toutefois préliminaires et d'autres travaux sont nécessaires afin d'élucider le comportement des NP *in vitro*. Par exemple, il serait important d'évaluer si le taux d'absorption des nouvelles formulations est plus lent au travers des cellules épithéliales pulmonaires et au travers du mucus que les PA dissous en solution. Si cette expérience s'avérait concluante, l'encapsulation de PA dans des NP constituerait un grand avantage par rapport au traitement conventionnel.

Les études d'absorption et de perméabilité pourront être réalisées sur des lignées cellulaires épithéliales du système respiratoire, telles que les Calu-3 ou les A-549. Une fois les études *in vitro* réalisées, nous pouvons aussi évaluer la capacité des NP à cibler les bronches sur des modèles animaux infectés par imagerie en fluorescence.



## 2. L'amélioration de l'activité antifongique par la vectorisation

Suite aux résultats obtenus dans la première partie, nous avons décidé de poursuivre nos travaux en direction d'une évaluation du potentiel antifongique de ces nouvelles formulations. Dans ce but, différentes souches de champignons ont été choisies, des souches résistantes et sensibles de *Candida spp.* et d'*Aspergillus fumigatus*.

Plus précisément, nous avons travaillé avec des souches ayant les caractéristiques suivantes :

- Des souches présentant une surexpression des gènes codant pour les pompes d'efflux
- Des souches présentant des mutations des gènes codant pour les cibles d'action, soit ERG11 ou CYP51
- Des souches présentant à la fois une surexpression des pompes d'efflux et des mutations des gènes codant pour ERG11 ou CYP51

Les tests de sensibilité aux antifongiques ont été effectués à partir d'un test standardisé de microdilutions lequel dérive du protocole de macrodilutions du NCCLS. Ce test est un outil important utilisé par la communauté médicale et scientifique lors de prises de décisions cliniques. Il est important de spécifier qu'aucune formulation d'antifongique encapsulé dans des nanoparticules de polymère n'a jamais été testée par des procédures standardisées. Cette nouvelle façon de procéder donne une grande valeur aux résultats obtenus et permet d'établir une base de comparaison solide avec les antifongiques généralement utilisés. Ceci sera utile pour les études d'évaluation de l'amélioration des traitements à venir. Le paramètre employé pour évaluer la sensibilité des souches aux antifongiques est la CMI50. Les valeurs de CMI50 ont été obtenues pour le PA libre et le PA encapsulé sur des souches de *Candida spp.* et *Aspergillus spp.*

Les résultats que nous avons présentés au chapitre 4 ont démontré trois points importants :

1. La première, nous avons démontré de façon non équivoque que l'effet antifongique des azolés encapsulés était, à dose équivalente, généralement supérieur à celui des molécules libres dans le cas où les souches présentaient une surexpression des pompes d'efflux.
2. Deuxièmement, nous avons démontré que l'encapsulation des azolés n'apportait aucun avantage en terme de CMI lorsque les souches présentaient des mutations des gènes codant pour les cibles ERG11 ou CYP51.
3. Troisièmement, nous avons démontré que l'AMB encapsulée avait un effet antifongique amélioré par rapport à la forme libre, quelle que soit l'état de résistance des souches.

Ensuite, pour essayer de mettre en lumière le mécanisme responsable de cette efficacité améliorée, le comportement des NP en présence des cellules a été évalué. Tels qu'attendus, les résultats de microscopie de fluorescence et confocale (chapitre 5) ont démontré une localisation intracellulaire des NP encapsulant des antifongiques dans les cellules de *Candida albicans* et d'*Aspergillus nidulans*.

En mettant en relation les résultats obtenus dans les chapitre 4 et 5, nous postulons que les polymères synthétiques pourraient agir comme inhibiteurs des pompes d'efflux. En effet, divers composés d'origine naturelle et synthétique ont déjà démontré leur capacité à inhiber l'activité des pompes d'efflux dans les cellules épithéliales et cancéreuses (les P-gp), résultant en une meilleure accumulation intracellulaire du PA ou une meilleure absorption par voie orale [181-184]. La capacité des P-gp des cellules endothéliales et cancéreuses à expulser un large éventail de composés tels que des anticancéreux, immunosuppresseurs et bloqueurs de canaux calciques est bien établie dans la littérature. En effet, l'action des P-gp est un des phénomènes importants de résistance à la thérapie cytotoxique. Ainsi, dans notre cas, l'inactivation des pompes par des polymères synthétiques causerait une accumulation

intracellulaire d'azolés, ce qui justifierait l'efficacité augmentée des nouvelles formulations sur les souches présentant une surexpression des pompes d'efflux.

Parmi les composés actifs, il a été rapporté que le PEG démontre une inhibition ou interférence dans l'action des P-gp [85, 181, 185]. Comme plusieurs auteurs l'ont démontré dans différentes lignées cellulaires, nous pouvons émettre l'hypothèse que, dans notre cas, une fois la NP internalisée, la présence de la couronne de PEG à la surface de la NP (figure 49) viendrait inhiber ou interférer dans l'action des pompes d'efflux des champignons. Cette inhibition ou interférence par le PEG expliquerait la raison pour laquelle la nouvelle formulation a un effet positif sur l'activité antifongique.

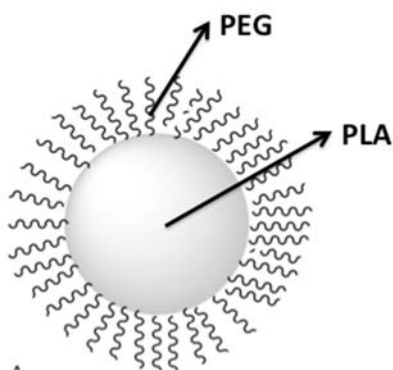


Figure 49 : Schéma représentant d'une NP cœur/couronne. Le cœur est hydrophobe principalement composé de PLA et la couronne est hydrophile composée de PEG. À noter que le schéma n'est pas à l'échelle. Le PEG fait quelques nm de longueur comparativement à la particule qui fait ~150 nm de diamètre

Le PEG pourrait avoir un rôle très précis dans l'action antifongique. Plusieurs hypothèses sur le mode d'action précis du PEG peuvent être amenées par analogie avec les hypothèses émises pour les P-gp. Le PEG pourrait perturber la membrane plasmique et affecter le fonctionnement de la pompe d'efflux, ou pourrait venir interférer dans l'action de l'ATP. L'ATP permet de fournir l'énergie qui assure le fonctionnement de la pompe d'efflux. Et finalement, le PEG pourrait bloquer physiquement le canal de la pompe de l'extérieur ou de l'intérieur de la cellule.

Pour mieux appréhender ces phénomènes énoncés, nous avons schématisé ces situations sur les figures 50 et 51. La figure 50 représente une cellule de champignon comportant une surexpression des pompes d'efflux. Nous pouvons remarquer que dans la partie A du schéma, les molécules de PA sont expulsées de la cellule par les pompes d'efflux, empêchant l'azolé d'agir efficacement sur la cible CYP51 (intra-cellulaire). Ce sont les substitutions sur ERG3 (ou ERG11) qui empêche la formation des dérivés méthylés toxique pour la cellule qui est à l'origine de la résistance. Toutefois, lorsque l'on traite la levure avec un azolé encapsulé dans une NP, situation représentée par la partie B du schéma, il y aura tout d'abord une internalisation de la NP. Ensuite, le principe actif va diffuser et agir sur la cible. Simultanément, le PEG viendra, par un mécanisme encore inconnu, interférer avec les pompes. Cette action favorisera l'accumulation intracellulaire du PA qui agira efficacement sur la cible.

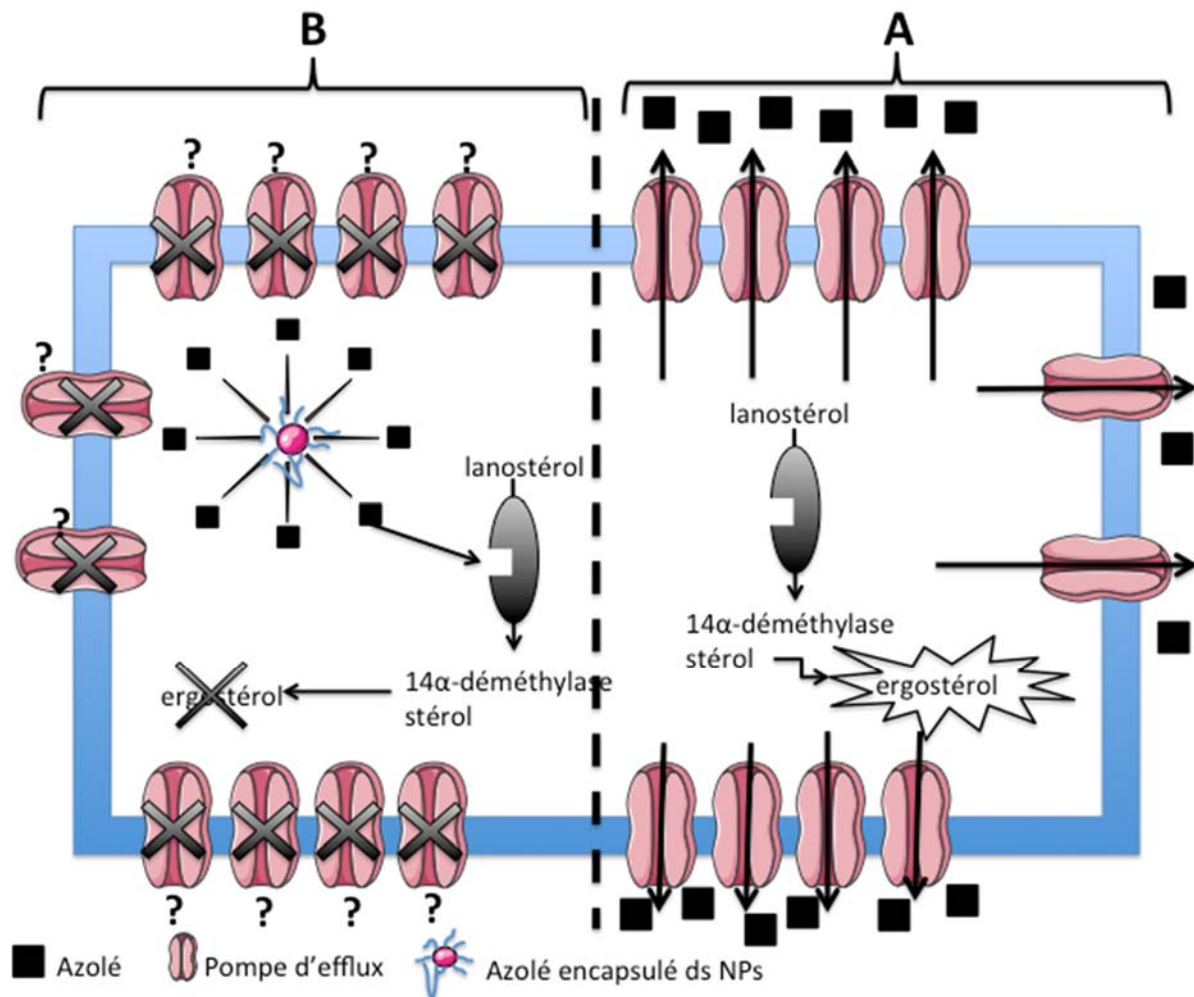


Figure 50 : Schéma représentant à droite (A) l'action du VRZ en solution dans une cellule résistante aux azolés, et à gauche (B) l'action antifongique de la formulation de NP/VRZ. Le mécanisme de résistance est **la surexpression des pompes d'efflux**

En ce qui concerne les souches dont la résistance est due à des mutations des gènes des enzymes de synthèse de l'ergostérol, la situation est schématisée sur la figure 51. Celle-ci représente une cellule de champignon possédant une mutation d'un gène codant pour une enzyme menant à la synthèse de l'ergostérol. Nous pouvons remarquer que, dans la partie A du schéma, la cible a été mutée ce qui induit une incapacité des molécules de PA à agir sur celle-ci. La synthèse d'ergostérol n'est pas interrompue ce qui assure la survie de la cellule. De la même façon, lorsque l'on traite la levure avec un azolé encapsulé dans une NP, situation

représentée par la partie B du schéma, la même situation se produit. L'encapsulation de l'azolé n'affecte pas l'effet pharmacologique sur la cible mutée.

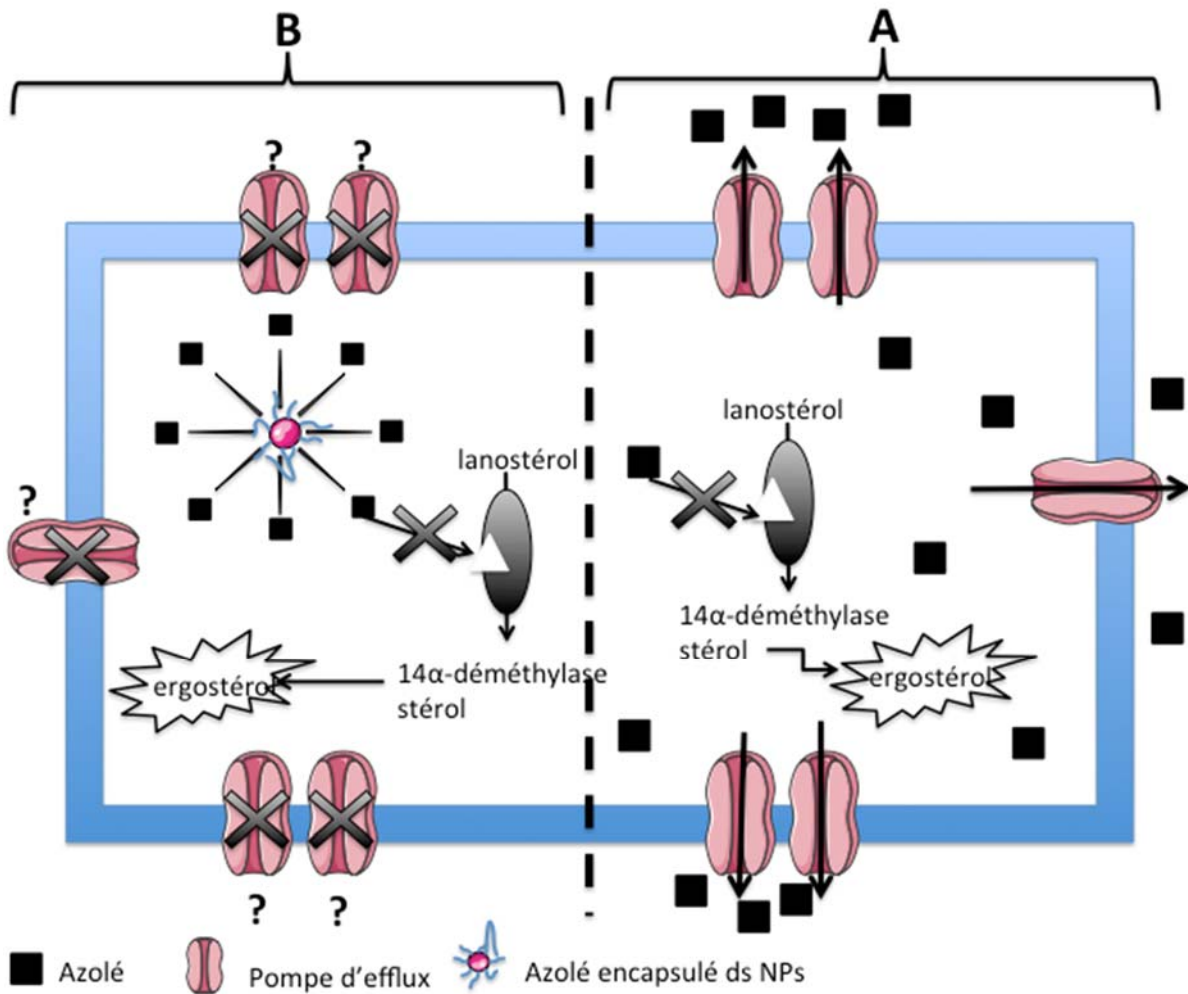


Figure 51 : Schéma représentant à droite (A) l'action du VRZ en solution dans une cellule résistante aux azolés et à gauche (B) l'action antifongique de la formulation de NP/VRZ. Le mécanisme de résistance est la mutation des gènes codant l'enzyme menant à la synthèse de l'ergostérol.

Finalement, en ce qui concerne les tests de sensibilité à l'AMB, nous avons testé l'AMB encapsulée dans une NP et l'AMB libre sur une période de 24 h et de 48 h (tel que recommandé par le NCCLS) sur les mêmes souches que pour les azolés. Toutefois, le

mécanisme d'action de l'AMB se situe au niveau de la membrane plasmique et se base sur la liaison du PA à l'ergostérol présent dans la membrane alors que les azolés agissent en amont sur la synthèse elle-même. Ainsi, même si les souches présentent des résistances dues à des mutations sur les gènes codant ERG11 et ERG3, ces mutations n'affecteront ni l'activité de l'AMB libre ni l'activité de la nouvelle formulation NP/AMB. En effet, nous avons observé une amélioration de l'efficacité antifongique sur toutes les souches analysées dans cette étude. Plus spécifiquement, nos résultats ont démontré qu'après 24 h de traitement, la différence d'efficacité entre la nouvelle formulation et l'agent libre n'est pas significative. Par exemple, sur la souche CAAL67, les valeurs de CMI50 sont de  $0,418 \pm 0,443 \text{ mg.L}^{-1}$  pour l'AMB libre comparativement à  $0,424 \pm 0,436 \text{ mg.L}^{-1}$  pour l'AMB encapsulée. Toutefois, après 48 h de traitement, la différence est plus importante. Pour la même souche, les valeurs de CMI50 sont de  $1,232 \pm 0,216 \text{ mg.L}^{-1}$  pour l'AMB libre comparativement à  $0,502 \pm 0,143 \text{ mg.L}^{-1}$  pour l'AMB encapsulée. Pour comprendre cette différence, plusieurs explications peuvent être proposées. Premièrement, nous avons démontré au chapitre 3, un profil de relargage sur plusieurs jours pour l'AMB encapsulée. Plus précisément, nous avons obtenu un relargage de 25% d'AMB de la NP après 24 h (partie A de la figure 52) comparativement à 35% après 48 h de traitement (partie B de la figure 52). Ainsi, nous observons que la quantité encapsulée n'est pas la dose disponible au site d'action étant donné qu'il y a une cinétique de relargage. Donc, les effets observés avec l'encapsulation reposent probablement sur des doses encore plus faibles que celles déterminées expérimentalement (seule la fraction relarguée est disponible pour agir sur la cible). Ainsi, nous postulons que la différence de quantité d'AMB relarguée entre 24 h et 48 h de traitement est à l'origine de la différence d'efficacité de traitement.

D'un autre côté, nous postulons que l'internalisation de la formulation NP/AMB amène le PA loin de la cible d'action (la membrane plasmique), ce qui retarderait le début de l'action pharmacologique. Ainsi, il est probable que sur 24 h de traitement, le PA encapsulé n'ait pas le temps d'atteindre la cible, à une concentration suffisante pour être actif, puisque la NP est internalisée, puis le PA est relargué et doit diffuser dans le cytosol avant de pouvoir retourner à la membrane pour se lier à l'ergostérol, son action est donc immédiate. Quant à l'AMB libre, il n'a pas besoin d'être internalisé, il n'a qu'à se lier directement à l'ergostérol.

Toutefois, après 48 h de traitement, nous postulons que le PA encapsulé a le temps de se rendre à la cible en quantité suffisante, justifiant les résultats obtenus.

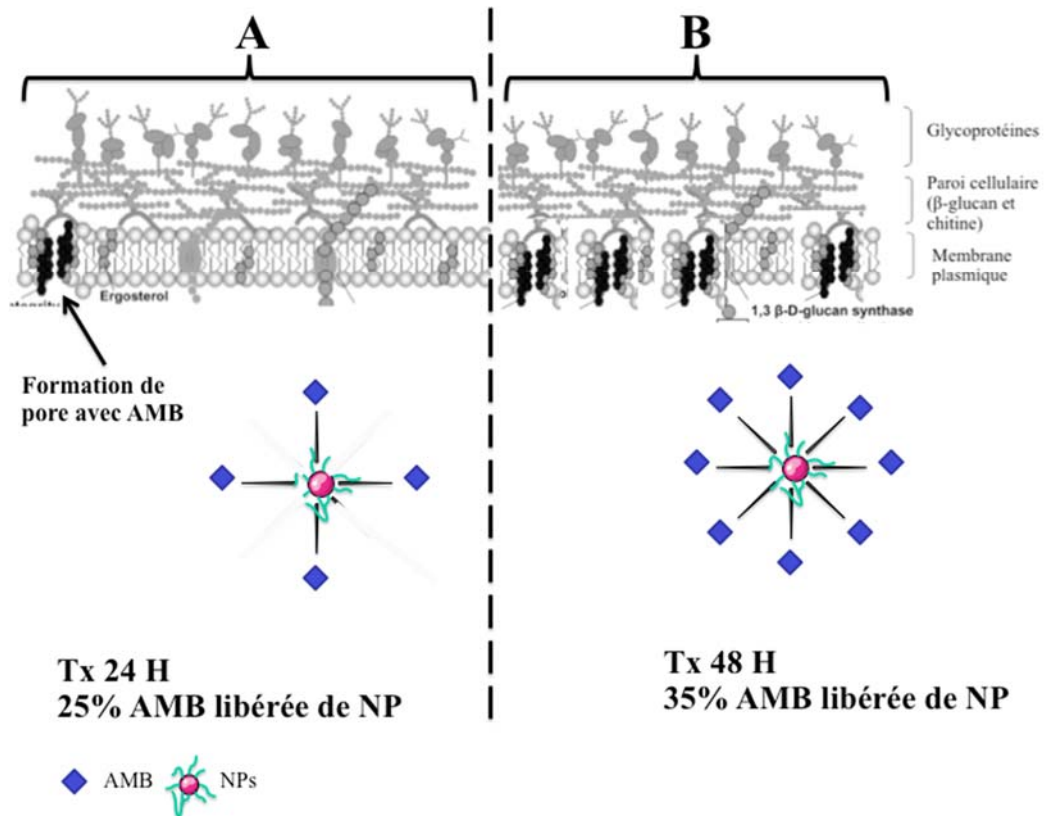


Figure 52 : Schéma représentant à gauche (A) l'action antifongique de la formulation de NP/AMB après **24 h de traitement** et à droite (B) l'action antifongique de la formulation de NP/AMB après **48 h de traitement**



### 3. Etude préliminaire du rôle du PEG

Un certain nombre d'expériences contrôles ont été réalisées pour mieux comprendre le rôle éventuel du PEG dans les résultats d'efficacité accrue des formulations nanoparticulaires d'antifongiques. En plus d'avoir testé des nouvelles formulations d'antifongiques sur différentes souches de *Candida spp.* et d'*Aspergillus fumigatus* (chapitre 4), nous avons testé différentes combinaisons découlant de la formulation initiale de NP/VRZ. Les différentes formulations de VRZ ont été préparées de façon similaire aux formulations décrites au chapitre 3. Les différentes combinaisons ont été testées sur la souche LSPQ 5674 présentant une surexpression des pompes d'efflux. Différentes CMI50 ont été obtenues (tableau 25 chapitre 4). Les résultats ont démontré que l'utilisation du PEG en surface de la NP ou l'utilisation du PEG libre (comme excipient) dans une formulation ne semble pas avoir un rôle dans l'action antifongique. Ainsi, avec les résultats obtenus des chapitre 4 et 5, il serait intéressant de comprendre pour quelles raisons le PEG ne semble pas avoir ce rôle contrairement aux cellules endothéliales et cancéreuses.

La figure 53 représente un schéma des interactions possibles des pompes d'efflux avec le PEG. La partie A de la figure 53 illustre l'inhibition de l'action des pompes d'efflux par le PEG dans une cellule Caco-2. Le point d'interrogation dans la partie A du schéma signifie que le mécanisme d'action du PEG reste encore aujourd'hui inconnu. La partie B de la figure 53 représente les interactions possibles du PEG présent dans la paroi cellulaire lorsqu'il est utilisé librement dans une formulation. Ainsi, nous postulons que le PEG libre ne peut inhiber ou interférer dans l'action des pompes d'efflux des champignons puisqu'il aurait une affinité (hydrophile) avec les composantes de la paroi cellulaire. En effet, la chitine et le  $\beta$ -glucan ont un caractère hydrophile tout comme le PEG [186].

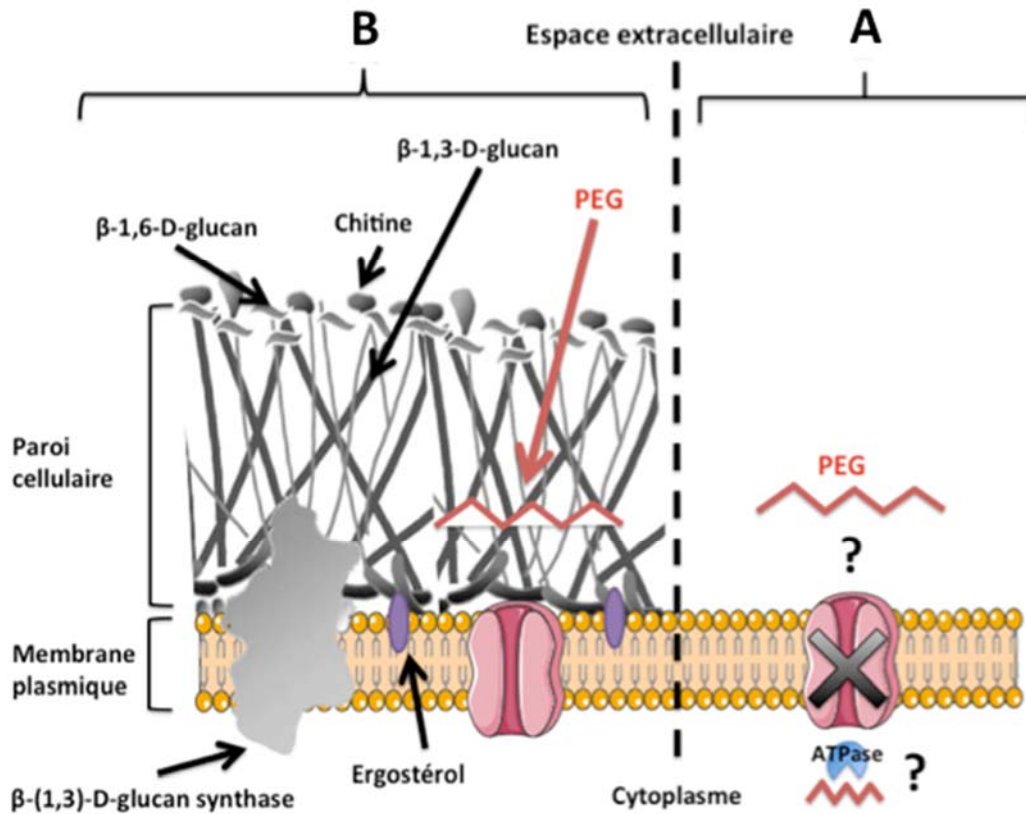


Figure 53 : Représentation schématique des interactions possibles des pompes d'efflux avec le PEG dans (A) une cellule Caco-2 (B) une cellule de champignon

Ainsi, en mettant en relation les résultats du tableau 25 du chapitre 4 avec les hypothèses énoncées ci-dessus, nous postulons que la nanovectorisation, indépendamment de la chimie de surface du vecteur (hydrophile ou hydrophobe), est essentielle à l'amélioration de l'activité antifongique du PA dans les levures ayant une surexpression des pompes d'efflux.

Autrement dit, c'est le fait d'avoir un nanovecteur de taille nanométrique qui permettrait une amélioration de l'activité antifongique. L'utilité de la présence du PEG reste à déterminer en ce qui concerne l'inhibition des pompes d'efflux. Toutefois, le PEG pourrait avoir un rôle dans l'amélioration de l'internalisation des NP dans la cellule de champignon.

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses quant au devenir des NP dans le champignon. Un schéma est présenté à la figure 54 pour exposer les différentes méthodes d'internalisation. Tel que discuté au chapitre 4, nous avons émis deux hypothèses, soit les NP libèrent l'antifongique tout près de la membrane plasmique et facilitent la diffusion de celui-ci, soit les NP sont internalisées et relarguent leur contenu dans le cytosol. Selon la première hypothèse, il est possible que la NP reste tout près de la cellule (ou qu'elle adhère à la membrane) et qu'elle relargue son contenu tout près de la membrane plasmique. Dans ce cas (possibilité A de la figure 54), le principe actif s'internaliserait plus facilement par diffusion passive puisque le PA serait amené tout près du lieu d'absorption (membrane plasmique).

Une autre possibilité est l'internalisation par endocytose (possibilité B de la figure 54). Nous n'avons pas fait d'études expérimentales permettant de déterminer la voie précise d'internalisation dans les champignons, mais plusieurs études dans des cellules endothéliales et cancéreuses ont montré que des particules de taille  $<$  à 200 nm de diamètre pénétraient par un phénomène d'endocytose [150, 153, 166-169, 187, 188]. Par exemple, on pourrait faire la même expérience, mais à une température plus basse, soit à 4 °C. Cela nous permettrait de déterminer si les NP utilisent la voie d'endocytose comme mécanisme d'internalisation. Ainsi, dans notre cas, l'hypothèse serait que la NP se logerait dans les endosomes (possibilité C de la figure 54). Ainsi, la NP se trouverait dans une organelle isolé des pompes d'efflux (et non pas dans le cytosol) et ne peut pas agir tant que l'endosome sera présent. Généralement, le pH de l'endosome diminue (milieu acide) et la NP se dégrade. Ainsi, au moment où l'endosome éclate celui-ci libère son contenu dans le cytosol et il est fort probable que la NP n'est plus physiquement une NP. Ensuite, le PA, libéré de l'endosome, pourra agir sur la cible.

Une autre hypothèse serait que la NP bloquerait physiquement le canal de la pompe d'efflux (possibilité D de la figure 54). Quelques auteurs ont démontré que le diamètre des P-gp dans les cellules endothéliales et cancéreuses est de l'ordre de quelques nm (environ 10 nm) [189]. Les NP faisant environ 200 nm, il est plausible qu'elles puissent bloquer le canal des pompes dans les champignons. En bloquant le canal de la pompe d'efflux, l'action du PA libéré de la NP serait assurée.

Nous postulons que c'est probablement l'ensemble des hypothèses B-C-D qui se produit. Toutefois, la première hypothèse énoncée (A) n'est pas à exclure, mais elle pourrait jouer un rôle de façon plus secondaire (effet relargage et diffusion).

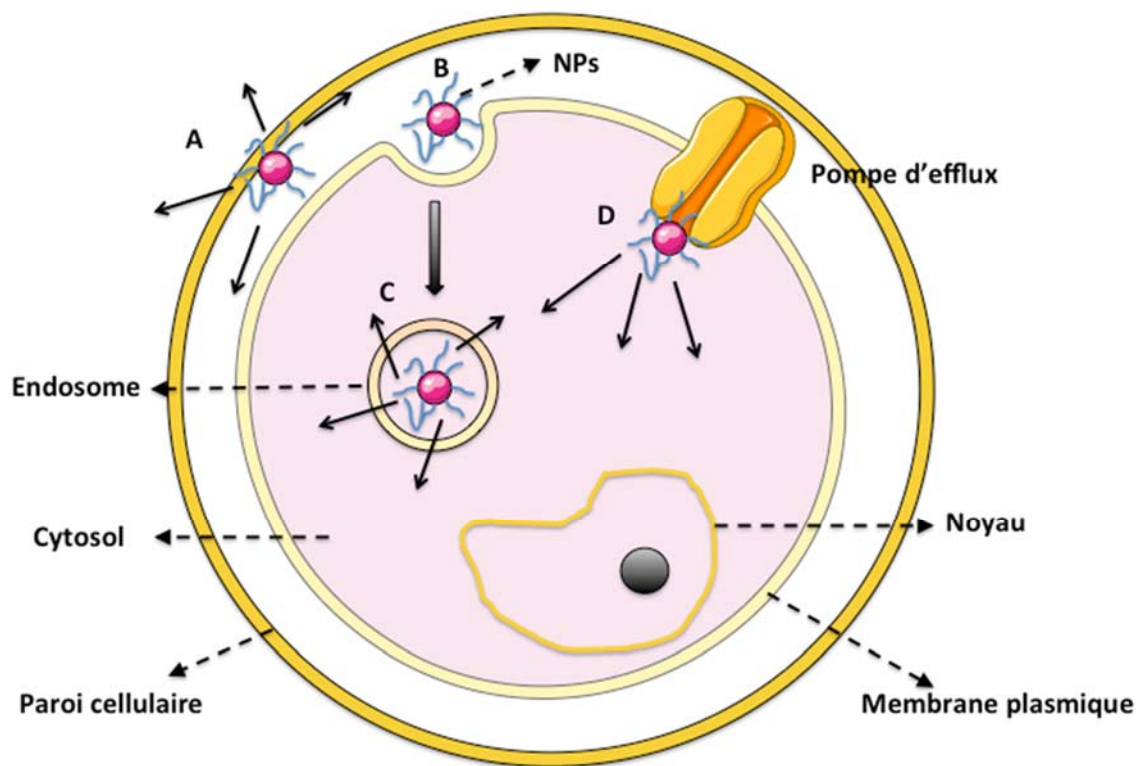


Figure 54: Schéma représentatif des mécanismes possibles de relargage du PA du nanovecteur dans le champignon. A: le PA est relargué de la NP tout près de la membrane plasmique. B: la NP est internalisée par endocytose. C: Depuis l'endosome, le PA est relargué dans le cytosol. D: la NP vient bloquer la pompe d'efflux et libère le PA dans le cytosol. Les flèches noires pleines représentent la libération du PA

Nous avons réussi à démontrer que l'encapsulation d'un PA dans un nanoparticule polymérique est essentielle à l'amélioration de l'action antifongique dans les cellules présentant une résistance du type surexpression des pompes d'efflux.

Ainsi, le nanovecteur semble être en mesure d'inhiber l'action des pompes d'efflux. Aucune autre étude à notre connaissance dans la littérature n'a jamais rapporté ce phénomène

chez les champignons. Il est donc possible d'encapsuler un antifongique dans un nanovecteur à base de polymère et ainsi d'améliorer clairement son efficacité *in vitro*.

## **Chapitre 7. Conclusion et perspectives**

Selon Santé Canada, les infections fongiques systémiques ont une prévalence de 5 % et restent parmi les maladies infectieuses les plus négligées. Le problème de l'efficacité des traitements antifongiques reste donc toujours d'actualité. Présentement, leur incidence a augmenté de façon importante en raison, entre autres, du nombre croissant de patients recevant des traitements immunosuppresseurs et des patients infectés par le VIH. Ceux-ci ont fortement mené à l'émergence de résistances aux traitements disponibles. Jusqu'à ce jour, il n'existe pas de traitement qui soit à la fois efficace contre les souches résistantes, bien toléré par le patient, dépourvu de toxicité majeure et facile d'administration. Le développement de nouvelles formulations d'antifongiques demeure une priorité de santé publique pour faciliter la prise en charge des infections fongiques. Pour contrer ces problèmes, de nombreux vecteurs de médicaments ont été proposés, mais seulement un nombre limité a atteint les phases cliniques et de développement pharmaceutique, principalement en raison de problème de toxicité et de stabilité.

Les travaux effectués dans le cadre de ce doctorat ont permis de mettre au point pour la première fois, de nouvelles formulations à base de NP polymériques encapsulant des antifongiques afin d'améliorer l'efficacité et la spécificité du traitement des mycoses sur des souches sensibles et résistantes de *Candida spp.*, d'*Aspergillus spp.* et des souches de *Candida albicans* formant du biofilm.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé et caractérisé un polymère à base de polyester-co-polyéther branché avec du polyéthylène glycol (PEG-g-PLA). Ce polymère nous a permis de créer de toutes nouvelles formulations de NP encapsulant des antifongiques, VRZ, ITZ et AMB. C'est la première fois qu'un polymère innovateur et non toxique est proposé pour améliorer les traitements antifongiques. Ces NP polymériques ont la caractéristique de pouvoir encapsuler des PA hydrophobes, puisque le cœur de la particule est composé de polymère hydrophobe (PLA) tandis que la couronne est composée de polymère hydrophile (PEG). C'est grâce à l'utilisation de ces nouvelles formulations que nous avons réussi à mettre en évidence les points suivants :

1. Il est possible d'encapsuler les antifongiques à dose thérapeutique dans une matrice polymérique composée de polyester-co-polyéther branché avec du polyéthylène glycol (PLA-g-PEG). L'encapsulation des PA sélectionnés sur la base de leur faible biodisponibilité a permis de contourner les problèmes de faible taux de dissolution et d'absorption.
2. Les formulations présentent une libération modifiée ce qui a prolongé la durée d'action des principes actifs de quelques jours.
3. Il est clairement démontré que les nouvelles formulations d'azolés diminuent de façon significative les valeurs de CMI50 par rapport aux traitements conventionnels dans les souches présentant une surexpression des pompes d'efflux.
4. Quant aux formulations d'AMB, elles ont été en mesure de diminuer considérablement la quantité de PA nécessaire pour atteindre la CMI50, sur toutes les souches de *Candida spp.* et d'*Aspergillus spp.*, indépendamment du type de résistance.
5. Les formulations d'antifongiques ont démontré un effet positif sans toutefois atteindre la MIC50 sur les souches formant du biofilm. Cependant l'effet pharmacologique, quoique prometteur, reste limité.
6. L'augmentation de l'efficacité des nouvelles formulations est causée par l'internalisation des NP. Initialement, nous avons émis l'hypothèse que le PEG présent en surface de la NP avait un rôle dans l'internalisation ou l'inactivation des pompes d'efflux. Or, nos résultats préliminaires ne semblent pas montrer que la chimie de surface de la NP joue un rôle. La taille du vecteur pourrait être un des facteurs clé assurant l'internalisation des NP dans les levures.

D'un point de vue fondamental, il serait intéressant de mieux comprendre certains phénomènes tels que le devenir des NP dans les champignons, phénomène qui reste encore



obscur et mal compris. Par exemple, une étude d'internalisation *in vitro* plus approfondie devra permettre de mieux comprendre la trajectoire intracellulaire des NP. L'utilisation d'un marqueur spécifique d'une composante du champignon (par exemple les lysosomes ou mitochondries) permettra de localiser précisément les NP dans les cellules de champignons. Ainsi, nous éluciderons le lieu de relargage du PA des NP (cytosol ou organelles) et serons en mesure de mieux optimiser la matrice. Par exemple, si les NP se retrouvent dans les lysosomes, des études de relargage et des études sur le devenir des NP seront nécessaires en milieu acide. Les études de microscopie de fluorescence et de confocale permettant le suivi de l'internalisation des vecteurs est un domaine d'étude encore récent. C'est pour cette raison qu'il est essentiel de continuer à étudier dans ce domaine pour permettre rapidement la mise au point de nanovecteurs polymériques efficaces et éventuellement commercialisables.

En ce qui concerne les biofilms, étant donné les résultats d'efficacité limitée des nanovecteurs, il serait important de bien caractériser les structures de biofilms fongiques, encore très peu connues aujourd'hui. Des études de diffusion des NP au travers des biofilms devraient se rajouter pour comprendre l'impact de la structure sur le devenir de la NP.

Sur le plan clinique, pour compléter les études que nous avons réalisées, les nouvelles formulations devront être testées *in vivo*. Par exemple, un modèle de candidose invasive chez la souris Swiss immunodéprimée pourra être utilisé pour tester les nouvelles formulations. Ces études permettront, entre autres, de valider la preuve de concept de formuler des antifongiques dans des NP de polymère en vue d'une administration humaine.

Les résultats impressionnants obtenus ouvrent la voie vers une nouvelle façon de contourner les problèmes de résistances fongiques, jusqu'à maintenant difficilement réalisable en clinique et laissent entrevoir des perspectives encourageantes.

Contourner les mécanismes de résistance pourra alors laisser entrevoir une utilisation généralisée de la vectorisation dans le traitement (très négligé) de maladies fongiques. Ce type de formulation facilitera la prise en charge en améliorant notamment l'accès des malades aux

médicaments ainsi que leur observance grâce à un traitement facilement administrable et tolérable.

## **Bibliographie**

- [1] R.A.L. Brewis, *Respiratory medicine*, Saunders, 1995.
- [2] H. Bisgaard, C. O'Callaghan, G.C. Smaldone, *Drug Delivery to the Lung*, Taylor & Francis, 2001.
- [3] Q. Hamid, M.D. Joanne Shannon, J.G. Martin, *Physiologic Basis of Respiratory Disease*, BC Decker, Incorporated, 2005.
- [4] P.R. Byron, *CRC Respiratory Drug Delivery*, CRC Press, 1990.
- [5] B. Forbes, B. Asgharian, L.A. Dailey, D. Ferguson, P. Gerde, M. Gumbleton, L. Gustavsson, C. Hardy, D. Hassall, R. Jones, R. Lock, J. Maas, T. McGovern, G.R. Pitcairn, G. Somers, R.K. Wolff, Challenges in inhaled product development and opportunities for open innovation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (2011) 69-87.
- [6] C. LiCalsi, T. Christensen, J.V. Bennett, E. Phillips, C. Witham, Dry powder inhalation as a potential delivery method for vaccines, *Vaccine*, 17 (1999) 1796-1803.
- [7] J.S. Skyler, W.T. Cefalu, I.A. Kourides, W.H. Landschulz, C.C. Balagtas, S.-L. Cheng, R.A. Gelfand, Efficacy of inhaled human insulin in type 1 diabetes mellitus: a randomised proof-of-concept study, *The Lancet*, 357 (2001) 331-335.
- [8] R.I. Henkin, Inhaled insulin, Intrapulmonary, intranasal, and other routes of administration: Mechanisms of action, *Nutrition*, 26 (2010) 33-39.
- [9] J.S. Patton, P.R. Byron, Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat Rev Drug Discov*, 6 (2007) 67-74.
- [10] Diagramme du système respiratoire de l'humain, in, Santé Canada, 2006-05-16.

- [11] G.E. Conner, M. Salathe, R. Forteza, Lactoperoxidase and Hydrogen Peroxide Metabolism in the Airway, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 166 (2002) S57-S61.
- [12] M.P. Rogan, C.C. Taggart, C.M. Greene, P.G. Murphy, S.J. O'Neill, N.G. McElvaney, Loss of Microbicidal Activity and Increased Formation of Biofilm Due to Decreased Lactoferrin Activity in Patients with Cystic Fibrosis, *Journal of Infectious Diseases*, 190 (2004) 1245-1253.
- [13] K.L. Moore, A.F. Dalley, *Anatomie médicale*, De Boeck, 2001.
- [14] P.G. Holt, D.H. Strickland, M.E. Wikstrom, F.L. Jahnsen, Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract, *Nat Rev Immunol*, 8 (2008) 142-152.
- [15] J.S. Patton, Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 19 (1996) 3-36.
- [16] L.B. Ware, M.A. Matthay, The Acute Respiratory Distress Syndrome, *New England Journal of Medicine*, 342 (2000) 1334-1349.
- [17] A. Hulin, A.M. Deguillaume, S. Bretagne, Y. Bezie, *Bon usage des antifongiques dans le traitement des candidoses et aspergilloses invasives*, John Libbey Eurotext, Montrouge, FRANCE, 2005.
- [18] A.J.P. Brown, S. Argimon, N.A.R. Gow, Signal Transduction and Morphogenesis in *Candida albicans*, in: R. Howard, N.R. Gow (Eds.) *Biology of the Fungal Cell*, Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 167-194.
- [19] L. Romani, Immunity to fungal infections, *Nature Reviews. Immunology*, 4 (2004) 11-24.
- [20] W.L. Chaffin, J.L. Lopez-Ribot, M. Casanova, D. Gozalbo, J.P. Martinez, Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (1998) 130-180.

- [21] K.C. Hazen, B.W. Hazen, Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*, *Infection and Immunity*, 60 (1992) 1499-1508.
- [22] A. EspinellIngroff, Clinical relevance of antifungal resistance, *Infect Dis Clin N Am*, 11 (1997) 929-&.
- [23] G. Ramage, E. Mowat, B. Jones, C. Williams, J. Lopez-Ribot, Our Current Understanding of Fungal Biofilms, *Critical Reviews in Microbiology*, 35 (2009) 340-355.
- [24] G.S. Baillie, L.J. Douglas, Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 (2000) 397-403.
- [25] S. Borecka-Melkusova, H. Bujdakova, Variation of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among genotypes of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* under antifungal treatment, *Canadian Journal of Microbiology*, 54 (2008) 718-724.
- [26] O.B. Brikci-Benhabib, Z. Atmani-Boucherit, L. Sari, K. Boucherit, C. Gendarme, *Candida* biofilms and their role in neonatal infection, *Mycoses*, 54 125-125.
- [27] M.A. Jabra-Rizk, W.A. Falkler, T.F. Meiller, Fungal biofilms and drug resistance, *Emerging Infectious Diseases*, 10 (2004) 14-19.
- [28] D.M. Kuhn, J. Chandra, P.K. Mukherjee, M.A. Ghannoum, Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces, *Infection and Immunity*, 70 (2002) 878-888.
- [29] P.K. Mukherjee, G.Y. Zhou, R. Munyon, M.A. Ghannoum, *Candida* biofilm: a well-designed protected environment, *Medical Mycology*, 43 (2005) 191-208.
- [30] J. Chandra, D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum, Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance, *Journal of Bacteriology*, 183 (2001) 5385-5394.

- [31] D. de Beer, P. Stoodley, Z. Lewandowski, Liquid flow in heterogeneous biofilms, *Biotechnology and Bioengineering*, 44 (1994) 636-641.
- [32] J.R. Lawrence, D.R. Korber, B.D. Hoyle, J.W. Costerton, D.E. Caldwell, Optical sectioning of microbial biofilms, *Journal of Bacteriology*, 173 (1991) 6558-6567.
- [33] J. Chandra, D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, M.A. Ghannoum, Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance, *Journal of Bacteriology*, 183 (2001) 5385-5394.
- [34] D. Andes, J. Nett, P. Oschel, R. Albrecht, K. Marchillo, A. Pitula, Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model, *Infection and Immunity*, 72 (2004) 6023-6031.
- [35] G. R.E., L. N.J., P. S.W., Indoor health: Background levels of fungi, *American Industrial Hygiene Association Journal*, 64 (2003) 427-438.
- [36] A.C. Pasqualotto, Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*, *Medical Mycology*, 47 (2009) S261-S270.
- [37] T.R.T. Dagenais, N.P. Keller, Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis, *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (2009) 447-465.
- [38] D.C. Vinh, Insights into human antifungal immunity from primary immunodeficiencies, *The Lancet Infectious Diseases*, 11 (2011) 780-792.
- [39] L. Popolo, T. Gualtieri, E. Ragni, The yeast cell-wall salvage pathway, *Medical Mycology*, 39 (2001) 111-121.
- [40] M. Bernard, J.-P. Latgé, *Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis, *Medical Mycology*, 39 (2001) 9-17.
- [41] Association pharmaceutique canadienne, *Compendium of nonprescription products* : summer 2001, 8th ed., Canadian Pharmacists Association, Ottawa, 2001.

- [42] C. Buchanan, N. Buchanan, K. Edgar, M. Ramsey, Solubilty and dissolution studies of antifungal drug:hydroxybutenyl- $\beta$ -cyclodextrin complexes, *Cellulose*, 14 (2007) 35-47.
- [43] N.A. Beinborn, J. Du, N.P. Wiederhold, H.D.C. Smyth, R.O. Williams Iii, Dry powder insufflation of crystalline and amorphous voriconazole formulations produced by thin film freezing to mice, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, (2012) <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.1004.1019>.
- [44] U. Theuretzbacher, F. Ihle, H. Derendorf, Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Profile of Voriconazole, *Clinical Pharmacokinetics*, 45 (2006) 649-663.
- [45] M.A. Thiel, A.S. Zinkernagel, J.r. Burhenne, C. Kaufmann, W.E. Haefeli, Voriconazole Concentration in Human Aqueous Humor and Plasma during Topical or Combined Topical and Systemic Administration for Fungal Keratitis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2007) 239-244.
- [46] MedicinesComplete. [online] <http://www.medicinescomplete.com>, in, Pharmaceutical Press, London.
- [47] R. Mellaerts, R. Mols, J.A.G. Jammaer, C.A. Aerts, P. Annaert, J. Van Humbeeck, G. Van den Mooter, P. Augustijns, J.A. Martens, Increasing the oral bioavailability of the poorly water soluble drug itraconazole with ordered mesoporous silica, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69 (2008) 223-230.
- [48] M.J. O'Neil, *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*, 2013.
- [49] C.o. Europe, C.o.t.E.o.a.E. Pharmacopoeia, E.P. Commission, *European Pharmacopoeia: Supplement*, Council of Europe, 2001.
- [50] A.A. Al-Badr, H.I. El-Subbagh, Chapter 5 Itraconazole: Comprehensive Profile, in: G.B. Harry (Ed.) *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, Academic Press, 2009, pp. 193-264.



- [51] F.C. Odds, A.J.P. Brown, N.A.R. Gow, Antifungal agents: mechanisms of action, *Trends in Microbiology*, 11 (2003) 272-279.
- [52] T.C. White, K.A. Marr, R.A. Bowden, Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (1998) 382-402.
- [53] Association pharmaceutique canadienne, CPS, Compendium of pharmaceuticals and specialties (Canada), in, Toronto.
- [54] A.F.d.E.d.C. Thérapeutique, *Traité de chimie thérapeutique: Principaux antifongiques et antiparasitaires. Antiparasitaires*, Tec & Doc Lavoisier, 1999.
- [55] A.C. Mesa-Arango, L. Scorzoni, O. Zaragoza, It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug, *Frontiers in Microbiology*, 3 (2012).
- [56] J.J. Torrado, R. Espada, M.P. Ballesteros, S. Torrado-Santiago, Amphotericin B formulations and drug targeting, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97 (2008) 2405-2425.
- [57] J. Milhaud, V. Ponsinet, M. Takashi, B. Michels, Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1558 (2002) 95-108.
- [58] M.A. Ghannoum, L.B. Rice, Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance, *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (1999) 501-517.
- [59] D. Sanglard, F.C. Odds, Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences, *The Lancet Infectious Diseases*, 2 (2002) 73-85.
- [60] J.E. Bennett, K. Izumikawa, K.A. Marr, Mechanism of Increased Fluconazole Resistance in *Candida glabrata* during Prophylaxis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (2004) 1773-1777.

- [61] T. Joseph-Horne, D.W. Hollomon, Molecular mechanisms of azole resistance in fungi, *FEMS Microbiology Letters*, 149 (1997) 141-149.
- [62] J.-P. Vermitsky, T.D. Edlind, Azole Resistance in *Candida glabrata*: Coordinate Upregulation of Multidrug Transporters and Evidence for a Pdr1-Like Transcription Factor, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (2004) 3773-3781.
- [63] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice, *Pharmacological Reviews*, 53 (2001) 283-318.
- [64] R. Gref, M. Luck, P. Quellec, M. Marchand, E. Dellacherie, S. Harnisch, T. Blunk, R.H. Muller, 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 18 (2000) 301-313.
- [65] Y. Malam, M. Loizidou, A.M. Seifalian, Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in Pharmacological Sciences*, 30 (2009) 592-599.
- [66] K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, E. Livaniou, G. Evangelatos, D.S. Ithakissios, Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 259 (2003) 115-127.
- [67] A. Beletsi, Z. Panagi, K. Avgoustakis, Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers, *International Journal of Pharmaceutics*, 298 (2005) 233-241.
- [68] T. Yamaoka, Y. Tabata, Y. Ikada, Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83 (1994) 601-606.

- [69] M.I. Vittaz, D. Bazile, G. Spenlehauer, T. Verrecchia, M. Veillard, F. Puisieux, D. Labarre, Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators, *Biomaterials*, 17 (1996) 1575-1581.
- [70] Z. Panagi, A. Beletsi, G. Evangelatos, E. Livaniou, D.S. Ithakissios, K. Avgoustakis, Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA,ÄimPEG nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 221 (2001) 143-152.
- [71] M.T. Peracchia, R. Gref, Y. Minamitake, A. Domb, N. Lotan, R. Langer, PEG-coated nanospheres from amphiphilic diblock and multiblock copolymers: Investigation of their drug encapsulation and release characteristics, *Journal of Controlled Release*, 46 (1997) 223-231.
- [72] H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka, PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (2003) 403-419.
- [73] V.C.F. Mosqueira, P. Legrand, A. Gulik, O. Bourdon, R. Gref, D. Labarre, G. Barratt, Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules, *Biomaterials*, 22 (2001) 2967-2979.
- [74] R. Quesnel, P. Hildgen, Synthesis of PLA-b-PEG multiblock copolymers for stealth drug carrier preparation, *Molecules*, 10 (2005) 98-104.
- [75] S.M. Moghimi, J. Szebeni, Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties, *Progress in Lipid Research*, 42 (2003) 463-478.
- [76] D. Garlotta, A Literature Review of Poly(Lactic Acid), *Journal of Polymers and the Environment*, 9 (2001) 63-84.
- [77] A. Sodergard, M. Stolt, Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition, *Progress in Polymer Science*, 27 (2002) 1123-1163.

- [78] G. Schliecker, C. Schmidt, S. Fuchs, T. Kissel, Characterization of a homologous series of d,l-lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro, *Biomaterials*, 24 (2003) 3835-3844.
- [79] T. Ouchi, Y. Ohya, Design of lactide copolymers as biomaterials, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42 (2004) 453-462.
- [80] A. Finne, A.-C. Albertsson, New functionalized polyesters to achieve controlled architectures, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42 (2004) 444-452.
- [81] D. Tian, P. Dubois, C. Grandfils, R. Jérôme, Ring-Opening Polymerization of 1,4,8-Trioxaspiro[4.6]-9-undecanone: A New Route to Aliphatic Polyesters Bearing Functional Pendant Groups, *Macromolecules*, 30 (1997) 406-409.
- [82] V. Nadeau, G. Leclair, S. Sant, J.-M. Rabanel, R. Quesnel, P. Hildgen, Synthesis of new versatile functionalized polyesters for biomedical applications, *Polymer*, 46 (2005) 11263-11272.
- [83] T. Hammady, V. Nadeau, P. Hildgen, Microemulsion and diafiltration approaches: an attempt to maximize the global yield of DNA-loaded nanospheres, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 62 (2006) 143-154.
- [84] L. Vlerken, T. Vyas, M. Amiji, Poly(ethylene glycol)-modified Nanocarriers for Tumor-targeted and Intracellular Delivery, *Pharmaceutical Research*, 24 (2007) 1405-1414.
- [85] M. Werle, Natural and Synthetic Polymers as Inhibitors of Drug Efflux Pumps, *Pharmaceutical Research*, 25 (2008) 500-511.
- [86] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, J. Mintzes, D. Deaver, N. Lotan, R. Langer, Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, *Science*, 276 (1997) 1868-1872.
- [87] Y.-Y. Huang, C.-H. Wang, Pulmonary delivery of insulin by liposomal carriers, *Journal of Controlled Release*, 113 (2006) 9-14.

- [88] J.S. Patton, Deep-lung delivery of therapeutic proteins, *Chemtech*, 27 (1997) 34-38.
- [89] J.S. Patton, J.G. Bukar, M.A. Eldon, Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Inhaled Insulin, *Clinical Pharmacokinetics*, 43 (2004) 781-801.
- [90] R. Uchenna Agu, M. Ikechukwu Ugwoke, M. Armand, R. Kinget, N. Verbeke, The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides, *Respiratory Research*, 2 (2001) 198 - 209.
- [91] F. Ungaro, R.d.E.d.V. Bianca, C. Giovino, A. Miro, R. Sorrentino, F. Quaglia, M.I. La Rotonda, Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs, *Journal of Controlled Release*, 135 (2009) 25-34.
- [92] W.G. Kreyling, S. Hirn, C. Schleh, Nanoparticles in the lung, *Nature Biotechnology*, 28 (2010) 1275-1276.
- [93] M.D. Richardson, Changing patterns and trends in systemic fungal infections, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 Suppl 1 (2005) i5-i11.
- [94] M.A. Hossain, M.A. Ghannoum, New investigational antifungal agents for treating invasive fungal infections, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9 (2000) 1797-1813.
- [95] M.D. Richardson, D.W. Warnock, *Fungal Infection: Diagnosis and Management*, Blackwell Pub., 2003.
- [96] K. Kawakami, Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 480-495.
- [97] O.R. Hung, S.C. Whynot, J.R. Varvel, S.L. Shafer, M. Mezei, Pharmacokinetics of inhaled liposome encapsulated fentanyl, *Anesthesiology*, 83 (1995) 277-284.

- [98] W.J. Gradishar, S. Tjulandin, N. Davidson, H. Shaw, N. Desai, P. Bhar, M. Hawkins, J. O'Shaughnessy, Phase III Trial of Nanoparticle Albumin-Bound Paclitaxel Compared With Polyethylated Castor Oil,ÄiBased Paclitaxel in Women With Breast Cancer, *Journal of Clinical Oncology*, 23 (2005) 7794-7803.
- [99] Y. Barenholz, Doxil - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, *Journal of Controlled Release*, 160 (2012) 117-134.
- [100] I.M. Hann, H.G. Prentice, Lipid-based amphotericin B: a review of the last 10 years of use, *Int J Antimicrob Ag*, 17 (2001) 161-169.
- [101] J. Panyam, V. Labhasetwar, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55 (2003) 329-347.
- [102] M. Arning, A.H. Heer-Sonderhoff, A. Wehmeier, W. Schneider, Pulmonary toxicity during infusion of liposomal amphotericin B in two patients with acute leukemia, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 14 (1995) 41-43.
- [103] J. Bishara, M. Weinberger, A.Y. Lin, S. Pitlik, Amphotericin B - Not so terrible, *Ann Pharmacother*, 35 (2001) 308-310.
- [104] M.A. Myers, D.A. Thomas, L. Straub, D.W. Soucy, R.W. Niven, M. Kaltenbach, C.I. Hood, H. Schreier, R.J. Gonzalezrothi, Pulmonary effects of chronic exposure to liposome aerosols in mice, *Experimental Lung Research*, 19 (1993) 1-19.
- [105] D.A. Thomas, M.A. Myers, B. Wichert, H. Schreier, R.J. Gonzalezrothi, Acute effects of liposome aerosol inhalation on pulmonary function in healthy human volunteers, *Chest*, 99 (1991) 1268-1270.
- [106] S. Sant, S. Poulin, P. Hildgen, Effect of polymer architecture on surface properties, plasma protein adsorption, and cellular interactions of pegylated nanoparticles, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87 (2008) 885-895.

- [107] S. Essa, J.M. Rabanel, P. Hildgen, Effect of polyethylene glycol (PEG) chain organization on the physicochemical properties of poly(D, L-lactide) (PLA) based nanoparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75 (2010) 96-106.
- [108] S. Sant, V. Nadeau, P. Hildgen, Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 107 (2005) 203-214.
- [109] Y. Chang, Y.-H. Wang, C.-Q. Hu, Simultaneous determination of purity and potency of amphotericin B by HPLC, *J Antibiot*, 64 (2011) 735-739.
- [110] D.A. Edwards, A. Ben-Jebria, R. Langer, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles, *Journal of Applied Physiology*, 85 (1998) 379-385.
- [111] J. Heyder, J. Gebhart, G. Rudolf, C.F. Schiller, W. Stahlhofen, DEPOSITION OF PARTICLES IN THE HUMAN RESPIRATORY-TRACT IN THE SIZE RANGE 0.005-15-MU-M, *Journal of Aerosol Science*, 17 (1986) 811-825.
- [112] M. Remedies, <http://www.asthmadevices.com/revolizer/pharmaceutics.html>, in, 2013.
- [113] S. Essa, J.M. Rabanel, P. Hildgen, Effect of aqueous solubility of grafted moiety on the physicochemical properties of poly(D,L-lactide) (PLA) based nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 388 (2010) 263-273.
- [114] S. Essa, J.M. Rabanel, P. Hildgen, Characterization of rhodamine loaded PEG-g-PLA nanoparticles (NPs): Effect of poly(ethylene glycol) grafting density, *International Journal of Pharmaceutics*, 411 (2011) 178-187.
- [115] S.K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, V. Labhasetwar, Residual polyvinyl alcohol associated with poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake, *Journal of Controlled Release*, 82 (2002) 105-114.
- [116] M.F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M.J. Alonso, P. Labrude, C. Vigneron, Influence of experimental parameters on the characteristics of

poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method, *Journal of Controlled Release*, 50 (1998) 31-40.

[117] F. von Burkersroda, R. Gref, A. Gopferich, Erosion of biodegradable block copolymers made of poly(D,L-lactic acid) and poly(ethylene glycol), *Biomaterials*, 18 (1997) 1599-1607.

[118] N. Faisant, J. Siepmann, J. Richard, J.P. Benoit, Mathematical modeling of drug release from bioerodible microparticles: effect of gamma-irradiation, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56 (2003) 271-279.

[119] T. Hammady, A. El-Gindy, E. Lejmi, R.S. Dhanikula, P. Moreau, P. Hildgen, Characteristics and properties of nanospheres co-loaded with lipophilic and hydrophilic drug models, *International Journal of Pharmaceutics*, (2008).

[120] K.C. Sung, R.-Y. Han, O.Y.P. Hu, L.-R. Hsu, Controlled release of nalbuphine prodrugs from biodegradable polymeric matrices: influence of prodrug hydrophilicity and polymer composition, *International Journal of Pharmaceutics*, 172 (1998) 17-25.

[121] M.M. Crowley, B. Schroeder, A. Fredersdorf, S. Obara, M. Talarico, S. Kucera, J.W. McGinity, Physicochemical properties and mechanism of drug release from ethyl cellulose matrix tablets prepared by direct compression and hot-melt extrusion, *International Journal of Pharmaceutics*, 269 (2004) 509-522.

[122] A. Panoyan, R. Quesnel, P. Hildgen, Injectable nanospheres from a novel multiblock copolymer: cytocompatibility, degradation and in vitro release studies, *Journal of Microencapsulation*, 20 (2003) 745-758.

[123] R. Agarwal, N. Singh, Amphotericin B Is Still the Drug of Choice for Invasive Aspergillosis, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174 (2006) 102-102.

[124] E.J. Ruijgrok, M.H.A.M. Fens, I.A.J.M. Bakker-Woudenberg, E.W.M. van Etten, A.G. Vulto, Nebulized Amphotericin B Combined with Intravenous Amphotericin B in Rats with



Severe Invasive Pulmonary Aspergillosis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2006) 1852-1854.

[125] L. Cahuayme-Zuniga, R.E. Lewis, V.E. Mulanovich, D.P. Kontoyiannis, Weekly liposomal amphotericin B as secondary prophylaxis for invasive fungal infections in patients with hematological malignancies, *Medical Mycology*, 50 (2012) 543-548.

[126] J.R. Perfect, E.D. Ashley, R. Drew, Design of Aerosolized Amphotericin B Formulations for Prophylaxis Trials among Lung Transplant Recipients, *Clin Infect Dis*, 39 (2004) S207-S210.

[127] L. Purkins, N. Wood, K. Greenhalgh, M.J. Allen, S.D. Oliver, Voriconazole, a novel wide-spectrum triazole: oral pharmacokinetics and safety, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 56 (2003) 10-16.

[128] R. Herbrecht, D.W. Denning, T.F. Patterson, J.E. Bennett, R.E. Greene, J.r.-W. Oestmann, W.V. Kern, K.A. Marr, P. Ribaud, O. Lortholary, R. Sylvester, R.H. Rubin, J.R. Wingard, P. Stark, C. Durand, D. Caillot, E. Thiel, P.H. Chandrasekar, M.R. Hodges, H.T. Schlamm, P.F. Troke, B. de Pauw, Voriconazole versus Amphotericin B for Primary Therapy of Invasive Aspergillosis, *New England Journal of Medicine*, 347 (2002) 408-415.

[129] S. Tobudic, C. Kratzer, E. Presterl, Azole-resistant *Candida* spp. – emerging pathogens?, *Mycoses*, 55 (2012) 24-32.

[130] G. Vedyappan, T. Rossignol, C. d'Enfert, Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucans, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2010) 2096-2111.

[131] D.M. Kuhn, T. George, J. Chandra, P.K. Mukherjee, M.A. Ghannoum, Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (2002) 1773-1780.

- [132] P.K. Mukherjee, J. Chandra, D.A. Kuhn, M.A. Ghannoum, Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols, *Infection and Immunity*, 71 (2003) 4333-4340.
- [133] M.A. Al-Fattani, L.J. Douglas, Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance, *Journal of Medical Microbiology*, 55 (2006) 999-1008.
- [134] C. d'Enfert, Biofilms and their role in the resistance of pathogenic *Candida* to antifungal agents, *Curr. Drug Targets*, 7 (2006) 465-470.
- [135] S. Sant, M. Thommes, P. Hildgen, Microporous structure and drug release kinetics of polymeric nanoparticles, *Langmuir*, 24 (2008) 280-287.
- [136] J.H. Rex, M.A. Pfaller, T.J. Walsh, V. Chaturvedi, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, L.L. Gosey, F.C. Odds, M.G. Rinaldi, D.J. Sheehan, D.W. Warnock, Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges, *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (2001) 643-658.
- [137] S. Saidane, S. Weber, X. De Deken, G. St-Germain, M. Raymond, PDR16-mediated azole resistance in *Candida albicans*, *Molecular Microbiology*, 60 (2006) 1546-1562.
- [138] S. Tsao, F. Rahkhoodaee, M. Raymond, Relative Contributions of the *Candida albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (2009) 1344-1352.
- [139] Euzéby, *Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire*, 2008.
- [140] A.L. Barry, M.A. Pfaller, S.D. Brown, A. Espinel-Ingroff, M.A. Ghannoum, C. Knapp, R.P. Rennie, J.H. Rex, M.G. Rinaldi, Quality Control Limits for Broth Microdilution Susceptibility Tests of Ten Antifungal Agents, *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (2000) 3457-3459.

- [141] M.A. Pfaller, L. Boyken, R.J. Hollis, S.A. Messer, S. Tendolkar, D.J. Diekema, In vitro susceptibilities of *Candida* spp. to caspofungin: Four years of global surveillance, *Journal of Clinical Microbiology*, 44 (2006) 760-763.
- [142] C.G. Pierce, P. Uppuluri, S. Tummala, J.L. Lopez-Ribot, A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms, *Journal of Visualized Experiments*, (2010).
- [143] F. Morio, F. Pagniez, C. Lacroix, M. Miegville, P. Le Pape, Amino acid substitutions in the *Candida albicans* sterol  $\Delta^5,6$ -desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (2012) 2131-2138.
- [144] B.A. Arthington-Skaggs, H. Jradi, T. Desai, C.J. Morrison, Quantitation of Ergosterol Content: Novel Method for Determination of Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*, *Journal of Clinical Microbiology*, 37 (1999) 3332-3337.
- [145] S.G. Revankar, W.R. Kirkpatrick, R.K. McAtee, A.W. Fothergill, S.W. Redding, M.G. Rinaldi, T.F. Patterson, Interpretation of Trailing Endpoints in Antifungal Susceptibility Testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method, *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (1998) 153-156.
- [146] J.H. Rex, P.W. Nelson, V.L. Paetznick, M. Lozano-Chiu, A. Espinel-Ingroff, E.J. Anaissie, Optimizing the Correlation between Results of Testing In Vitro and Therapeutic Outcome In Vivo for Fluconazole by Testing Critical Isolates in a Murine Model of Invasive Candidiasis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42 (1998) 129-134.
- [147] K.A. Marr, T.R. Rustad, J.H. Rex, T.C. White, The Trailing End Point Phenotype in Antifungal Susceptibility Testing Is pH Dependent, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (1999) 1383-1386.
- [148] H.-s. Peng, X.-j. Liu, G.-x. Lv, B. Sun, Q.-f. Kong, D.-x. Zhai, Q. Wang, W. Zhao, G.-y. Wang, D.-d. Wang, H.-l. Li, L.-h. Jin, N. Kostulas, Voriconazole into PLGA nanoparticles:

Improving agglomeration and antifungal efficacy, *International Journal of Pharmaceutics*, 352 (2008) 29-35.

[149] N.R. Patel, K. Damann, C. Leonardi, C.M. Sabliov, Itraconazole-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity, *Nanomedicine*, 5 (2010) 1037-1050.

[150] N.R. Patel, K. Damann, C. Leonardi, C.M. Sabliov, Size dependency of PLGA-nanoparticle uptake and antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *Nanomedicine*, 6 (2011) 1381-1395.

[151] M. Momany, R. Lindsey, T.W. Hill, E.A. Richardson, C. Momany, M. Pedreira, G.M. Guest, J.F. Fisher, R.B. Hessler, K.A. Roberts, The *Aspergillus fumigatus* cell wall is organized in domains that are remodelled during polarity establishment, *Microbiology*, 150 (2004) 3261-3268.

[152] K.A. Borkovich, D.J. Ebbole, Cellular and molecular biology of filamentous fungi, ASM Press, Washington, 2010.

[153] K. De Prijck, N. De Smet, K. Honraet, S. Christiaen, T. Coenye, E. Schacht, H. Nelis, Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Antimycotics Released from Modified Polydimethyl Siloxane, *Mycopathologia*, 169 167-174.

[154] G. Ramage, A. Jose, L. Sherry, D.F. Lappin, B. Jones, C. Williams, Liposomal Amphotericin B Displays Rapid Dose-Dependent Activity against *Candida albicans* Biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57 (2013) 2369-2371.

[155] M. Seidler, S. Salvenmoser, F.-M.C. Mueller, Liposomal amphotericin B eradicates *Candida albicans* biofilm in a continuous catheter flow model, *FEMS Yeast Research*, 10 (2010) 492-495.

[156] I.I. Raad, R.Y. Hachem, H.A. Hanna, X. Fang, Y. Jiang, T. Dvorak, R.J. Sherertz, D.P. Kontoyiannis, Role of ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) in catheter lock solutions:

EDTA enhances the antifungal activity of amphotericin B lipid complex against *Candida* embedded in biofilm, *Int J Antimicrob Ag*, 32 (2008) 515-518.

[157] G. Ramage, R. Rajendran, L. Sherry, C. Williams, Fungal Biofilm Resistance, *International Journal of Microbiology*, 2012 (2012) 14 pages.

[158] M.D. LaFleur, C.A. Kumamoto, K. Lewis, *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50 (2006) 3839-3846.

[159] R.R. Gordon Ramage, Leighann Sherry and Craig Williams, Fungal Biofilm Resistance, *International Journal of Microbiology*, 2012 (2012) 14.

[160] P.S. Stewart, Diffusion in Biofilms, *Journal of Bacteriology*, 185 (2003) 1485-1491.

[161] O. Habimana , K. Steenkeste, M.-P. Fontaine-Aupart, M.-N.I. Bellon-Fontaine, S. Kulakauskas, R. Briandet, Diffusion of Nanoparticles in Biofilms Is Altered by Bacterial Cell Wall Hydrophobicity, *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (2011) 367-368.

[162] G. Ramage, S.P. Saville, D.P. Thomas, J.L. López-Ribot, *Candida* Biofilms: an Update, *Eukaryotic Cell*, 4 (2005) 633-638.

[163] K. Forier, A.S. Messiaen, K. Raemdonck, H. Deschout, J. Rejman, F. De Baets, H. Nelis, S.C. De Smedt, J. Demeester, T. Coenye, K. Braeckmans, Transport of nanoparticles in cystic fibrosis sputum and bacterial biofilms by single-particle tracking microscopy, *Nanomedicine*, 8 (2013) 935-949.

[164] J. Nett, L. Lincoln, K. Marchillo, R. Massey, K. Holoyda, B. Hoff, M. VanHandel, D. Andes, Putative Role of  $\beta$ -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51 (2007) 510-520.

[165] J.E. Nett, H. Sanchez, M.T. Cain, D.R. Andes, Genetic Basis of *Candida* Biofilm Resistance Due to Drug-Sequestering Matrix Glucan, *Journal of Infectious Diseases*, 202 (2010) 171-175.

- [166] A.E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface, *Nat Mater*, 8 (2009) 543-557.
- [167] J. Rejman, V. Oberle, I.S. Zuhorn, D. Hoekstra, Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin-and caveolae-mediated endocytosis, *Biochemical Journal*, 377 (2004) 159-169.
- [168] J.-W. Yoo, N. Doshi, S. Mitragotri, Adaptive micro and nanoparticles: Temporal control over carrier properties to facilitate drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63 (2011) 1247-1256.
- [169] A. Kumar, A.K. Pandey, S.S. Singh, R. Shanker, A. Dhawan, A Flow Cytometric Method to Assess Nanoparticle Uptake in Bacteria, *Cytometry Part A*, 79A (2011) 707-712.
- [170] N. Rizkalla, C. Range, F.X. Lacasse, P. Hildgen, Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method, *Journal of Microencapsulation*, 23 (2006) 39-57.
- [171] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J.-Y. Tinevez, D.J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak, A. Cardona, Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nat Meth*, 9 (2012) 676-682.
- [172] P.C.G. Rida, A. Nishikawa, G.Y. Won, N. Dean, Yeast-to-Hyphal Transition Triggers Formin-dependent Golgi Localization to the Growing Tip in *Candida albicans*, *Molecular Biology of the Cell*, 17 (2006) 4364-4378.
- [173] J.M. Chen, M.G. Tan, A. Nemmar, W.M. Song, M. Dong, G.L. Zhang, Y. Li, Quantification of extrapulmonary translocation of intratracheal-instilled particles in vivo in rats: Effect of lipopolysaccharide, *Toxicology*, 222 (2006) 195-201.

- [174] T. Jung, W. Kamm, A. Breitenbach, E. Kaiserling, J.X. Xiao, T. Kissel, Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50 (2000) 147-160.
- [175] K.A. Foster, M. Yazdanian, K.L. Audus, Microparticulate uptake mechanisms of in-vitro cell culture models of the respiratory epithelium, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53 (2001) 57-66.
- [176] K. Yin Win, S.-S. Feng, Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials*, 26 (2005) 2713-2722.
- [177] X. Banquy, G. Leclair, J.M. Rabanel, A. Argaw, J.F. Bouchard, P. Hildgen, S. Giasson, Selectins ligand decorated drug carriers for activated endothelial cell targeting, *Bioconjugate Chemistry*, 19 (2008) 2030-2039.
- [178] X. Banquy, J.M. Rabanel, P. Hildgen, S. Giasson, Direct measurement of mechanical and adhesive properties of living cells using surface forces apparatus, *Australian Journal of Chemistry*, 60 (2007) 638-645.
- [179] X. Banquy, F. Suarez, A. Argaw, J.M. Rabanel, P. Grutter, J.F. Bouchard, P. Hildgen, S. Giasson, Effect of mechanical properties of hydrogel nanoparticles on macrophage cell uptake, *Soft Matter*, 5 (2009) 3984-3991.
- [180] X. Banquy, X.X. Zhu, S. Giasson, Mechanical and frictional properties of nanoparticle monolayers grafted on functionalized mica substrates, *Journal of Physical Chemistry B*, 112 (2008) 12208-12216.
- [181] N. Akhtar, A. Ahad, R.K. Khar, M. Jaggi, M. Aqil, Z. Iqbal, F.J. Ahmad, S. Talegaonkar, The emerging role of P-glycoprotein inhibitors in drug delivery: a patent review, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21 (2011) 561-576.

- [182] E.D. Hugger, B.L. Novak, P.S. Burton, K.L. Audus, R.T. Borchardt, A comparison of commonly used polyethoxylated pharmaceutical excipients on their ability to inhibit P-glycoprotein activity in vitro, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (2002) 1991-2002.
- [183] E.D. Hugger, K.L. Audus, R.T. Borchardt, Effects of poly(ethylene glycol) on efflux transporter activity in Caco-2 cell monolayers, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91 (2002) 1980-1990.
- [184] B. Johnson, W. Charman, C.H. Porter, An in vitro examination of the impact of polyethylene glycol 400, pluronic P85, and vitamin E d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate on P-glycoprotein efflux and enterocyte-based metabolism in excised rat intestine, *AAPS PharmSci*, 4 (2002) 193-205.
- [185] Q. Shen, Y. Lin, T. Handa, M. Doi, M. Sugie, K. Wakayama, N. Okada, T. Fujita, A. Yamamoto, Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies, *International Journal of Pharmaceutics*, 313 (2006) 49-56.
- [186] X.J. Cui, H.S. Shin, C. Song, W. Laosinchai, Y. Amano, R.M. Brown, A putative plant homolog of the yeast beta-1,3-glucan synthase subunit FKS1 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fibers, *Planta*, 213 (2001) 223-230.
- [187] M. Desai, V. Labhasetwar, E. Walter, R. Levy, G. Amidon, The Mechanism of Uptake of Biodegradable Microparticles in Caco-2 Cells Is Size Dependent, *Pharmaceutical Research*, 14 (1997) 1568-1573.
- [188] C.T. Okamoto, Endocytosis and transcytosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29 (1998) 215-228.
- [189] M. Hennessy, J.P. Spiers, A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter, *Pharmacological Research*, 55 (2007) 1-15.



