



**Université de Montréal**

**Nanoformulations de nystatine pour une efficacité antifongique améliorée**

**Par : Alexandre Melkoumov**

**Faculté de Pharmacie**

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

**option technologie pharmaceutique**

**Août, 2013**

**©, Alexandre Melkoumov, 2013**

**Jury d'examen :**

**Président-rapporteur : François-Xavier Lacasse** (*Faculté de pharmacie, UdeM*)

**Directeur : Grégoire Leclair** (*Faculté de pharmacie, UdeM*)

**Co-directeur: Louis De Repentigny** (*Dép. de microbiologie et immunologie, UdeM*)

**Membre : Abdel Omri** (*Université Laurentienne*)

## Résumé en français

**Hypothèse :** Le nanobroyage d'une suspension de nystatine augmentera son efficacité antifongique *in vitro* et *in vivo*.

**Méthode :** Une nanosuspension de nystatine a été obtenue en utilisant le broyage humide. Elle a été caractérisée pour sa distribution de taille des particules et pour sa teneur en principe actif. L'activité *in vitro* a été évaluée contre les souches de *C. albicans* SC5314 et LAM-1 aux concentrations 12.5 µg/mL jusqu'à 5000 µg/mL. L'efficacité *in vivo* a été évaluée en utilisant un modèle murin de candidose oropharyngée.

**Résultats :** La taille médiane des particules de la nanosuspension de nystatine a été réduite de 6577 nm à 137 nm. L'analyse CLHP a démontré une teneur de  $98.7 \pm 0.8\%$ . L'activité *in vitro* de la nanosuspension était supérieure à la suspension aux concentrations 100 µg/mL à 5000 µg/mL. La charge fongique orale était inférieure dans le groupe traité par la nanosuspension comparativement aux autres groupes. La survie des souris était aussi supérieure.

**Mots-clés :** Nanosuspension, nystatine, candidose oropharyngée, pellicule orale, *C. albicans*, nanobroyage, efficacité antifongique, nanocristaux, modèle murin DBA/2, test *in vitro* sur disque

## Résumé en anglais

**Hypothesis :** Nanomilling of a nystatin suspension will increase its antifungal efficacy *in vitro* and *in vivo*.

**Methods:** A nystatin nanosuspension was obtained using wet bead milling. It was characterized for its particle size distribution and for its drug content. *In vitro* activity was evaluated against *C. albicans* strains SC5314 and LAM-1 at concentrations of 12.5 µg/mL up to 5000 µg/mL. The *in vivo* efficacy was evaluated using a murine model of oropharyngeal candidiasis.

**Results:** Median particle size of the nystatin nanosuspension was reduced from 6577 nm to 137 nm. HPLC analysis demonstrated a content assay of  $98.7 \pm 0.8\%$ . *In vitro* activity of the nanosuspension was superior to the suspension's at concentrations ranging from 100 µg/mL to 5000 µg/mL. Oral fungal burdens were inferior in the nanosuspension group compared to the suspension and saline groups. Mice survival was also superior in the nanosuspension group.

**Keywords :** Nanosuspension, nystatin, oropharyngeal candidiasis, film strip, *C. albicans*, nanomilling, antifungal efficacy, nanocrystals, murine model DBA/2, *in vitro* diffusion assays

## Table des matières

Résumé en français .....	3
Résumé en anglais .....	4
Table des matières .....	5
Liste des tableaux .....	8
Liste des figures .....	9
Liste des sigles et abréviations.....	10
Préface .....	11
<b>Chapitre 1 : Introduction .....</b>	<b>12</b>
<i>1.1 La candidose oropharyngée.....</i>	<i>12</i>
<i>1.2 Les antifongiques.....</i>	<i>13</i>
1.2.1 Les polyènes .....	13
1.2.3 Les azoles.....	18
1.2.4 Efficacité comparée des antifongiques .....	18
1.2.5 Innocuité comparée des polyènes .....	19
1.2.6 Traitement par la suspension de nystatine .....	20
<i>1.3 Fabrication des préparations nanoformulées .....</i>	<i>22</i>
1.3.1 Homogénéisation à haute pression.....	22
1.3.2 Nanobroyage .....	25
1.3.3 Mesure de la taille .....	26

1.3.4 Mesure de la teneur .....	27
1.3.5 Évaluation de l'état cristallin .....	29
<b>1.4 Films oraux .....</b>	<b>31</b>
1.4.1 Ingrédients.....	31
1.4.2 Procédés .....	32
1.4.3 Caractérisation .....	34
1.4.4 Film oraux nanoformulés .....	35
<b>1.5 Évaluation de l'efficacité des antifongiques.....</b>	<b>36</b>
1.5.1 Évaluation de l'efficacité <i>in vitro</i> .....	36
1.5.2 Évaluation de l'efficacité <i>in vivo</i> .....	37
1.5.3 Évaluation de la biodisponibilité orale de la nystatine .....	39
<b>1.6 Vers un film oral de nystatine nanonisée .....</b>	<b>40</b>
1.6.1 Hypothèse de recherche 1 : la nystatine nanoformulée aura une efficacité améliorée. .....	40
1.6.2 Hypothèse de recherche 2 : une pellicule orale sera une alternative de traitement avantageuse.....	43
1.6.3 Objectifs.....	44
<b>Chapitre 2 : Article Journal of Antimicrobial Chemotherapy .....</b>	<b>45</b>
2.1 Résumé en français.....	45
2.2 Title page.....	47
2.3 Introduction .....	48
2.4 Materials and methods .....	50

2.4 Results .....	53
2.5 Discussion .....	61
2.6 References .....	64
<b>Chapitre 3: Pellicule pour administration orale .....</b>	<b>69</b>
3.1 Objectif .....	69
3.2 Création de pellicules orales à base d'hydroxypropylcellulose .....	69
3.3 Création de pellicules orales avec nystatine sans nanobroyage .....	70
3.4 Création de pellicules orales avec la nanosuspension de nystatine .....	71
<b>Chapitre 4 : Conclusion.....</b>	<b>75</b>
<b>Chapitre 5 : Travaux futurs et perspectives .....</b>	<b>77</b>
<b>Références.....</b>	<b>79</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1. 1 Effets secondaires des polyènes et azoles .....	20
Table 2. 1 Particle size distribution of nystatin formulations analysed by laser diffraction.....	53
Tableau 3. 1 Compte-rendu des expériences sur des pellicules à base d’HPC.....	70
Tableau 3. 2 Compte-rendu des expériences sur des pellicules avec nystatine sans nanobroyage .....	71
Tableau 3. 3 Compte-rendu des expériences sur des pellicules avec une nanosuspension de nystatine .....	73



## Liste des figures

Figure 1. 1 Structure de l'amphotéricine B .....	14
Figure 1. 2 Structure de la nystatine .....	14
Figure 1. 3 Liaison de l'amphotéricine B à l'ergostérol et au cholestérol.....	15
Figure 1. 4 Mécanisme d'action de l'amphotéricine B.....	17
Figure 1. 5 Homogénéisation à piston .....	24
Figure 1. 6 Représentation de la cavitation .....	25
Figure 1. 7 Représentation d'un système de chromatographie liquide à haute performance ..	28
Figure 1. 8 Représentation schématique d'une unité de fabrication de pellicules .....	33
Figure 1. 9 Représentation de nanoformulations [20].....	41
Figure 1. 10 Représentation de l'augmentation de la vitesse de solubilité à saturation [20] ...	42
Figure 1. 11 Représentation de l'augmentation de la vitesse de dissolution [20] .....	42
Figure 1. 12 Représentation de l'augmentation de l'adhésivité [20].....	43
Figure 2. 1 Growth inhibition diameters of <i>C. albicans</i> strain SC5314 incubated at 30°C for 18h in the presence of nystatin nanosuspension or commercial suspension.....	55
Figure 2. 2 Representative examples of growth inhibition of <i>C. albicans</i> strain SC5314 at the indicated concentrations of nystatin nanosuspension or commercial suspension.....	55
Figure 2. 3 Oral burdens of <i>C. albicans</i> strain LAM-1 in DBA/2 mice. ....	57
Figure 2. 4 Survival of DBA/2 mice after oral inoculation of <i>C. albicans</i> strain LAM-1.....	58
Figure 2. 5 Histopathology of oral candidiasis in DBA/2 mice treated with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control.....	60
Figure 3. 1 Distribution de taille de la nanosuspension 3A (bleu) et sa pellicule (rouge).....	74

## Liste des sigles et abréviations

<b>AmB</b>	Amphotéricine B
<b>ARV</b>	Antirétrovirale
<b>CFU</b>	<i>Colony forming units</i> (unités formant des colonies)
<b>CLHP</b>	Chromatographie liquide haute performance
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>COP</b>	Candidose oropharyngée
<b>DSC</b>	<i>Differential scanning calorimetry</i> (calorimétrie différentielle à balayage)
<b>DLS</b>	<i>Dynamic light scattering</i> (diffusion dynamique de la lumière)
<b>LD</b>	<i>Laser diffraction</i> (diffraction laser)
<b>HPC</b>	Hydroxypropyl cellulose
<b>RPM</b>	Révolutions par minute
<b>SDS</b>	Dodécylsulfate de sodium
<b>XRD</b>	X-ray diffraction (diffraction par rayon-x)

## Préface

Ce mémoire présente le projet de recherche effectué dans le cadre du programme de maîtrise en sciences pharmaceutiques option technologie pharmaceutique à la Faculté de pharmacie de l'Université de Montréal. Les travaux ont été accomplis dans le laboratoire de recherche sur la biodisponibilité de Grégoire Leclair à la Faculté de pharmacie, en collaboration avec le laboratoire de Louis de Repentigny au département de microbiologie et immunologie de la Faculté de médecine et le laboratoire de Martine Raymond à l'Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC). Le projet a été financé par Merck Canada Ltd. et l'association des facultés de Pharmacie du Canada (AFPC). L'objectif du projet consiste à développer une nouvelle nanoformulation de nystatine pour le traitement candidose oropharyngée. Cette nanoformulation devait posséder une activité antifongique *in vitro* et *in vivo* améliorée par rapport à la formulation commerciale. Elle a été développée en utilisant un procédé de nanobroyage humide, une expertise du laboratoire Leclair.

Les travaux de recherches ont été effectués en trois étapes. I) Caractérisation et développement de la nanoformulation de nystatine, II) évaluation de l'efficacité *in vitro* comparativement à la formulation commerciale de nystatine, III) évaluation comparative de l'efficacité *in vivo* dans un modèle murin de candidose oropharyngée.

Le chapitre 1 présente l'introduction. Le chapitre 2 discute des résultats contenus dans l'article publié dans le Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Le chapitre 3 résume les travaux sur une pellicule de nystatine nanoformulée.

# Chapitre 1 : Introduction

## 1.1 La candidose oropharyngée

La candidose oropharyngée (COP) est une infection fongique courante se caractérisant par une surcroissance de *Candida* au niveau de l'épithélium superficiel des muqueuses buccales<sup>1,2</sup>. Les espèces de *Candida* en cause sont *C. albicans*, et moins fréquemment, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guillierimondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*<sup>1</sup>. Comme la plupart des infections opportunistes, la COP affecte majoritairement les nouveau-nés et les patients immunodéprimés. En effet, 5 à 7% des nouveau-nés de moins d'un mois vont développer la candidose oropharyngée<sup>3</sup>. Aussi, l'infection peut se retrouver chez 9 à 31% des patient sidéens et chez près de 20% des patients cancéreux<sup>2-5</sup>. De plus, les diabétiques, portant une prothèse dentaire et ayant une mauvaise hygiène buccale sont à risque<sup>1</sup>. Par ailleurs, la COP peut être déclenchée chez des sujets sains par certains facteurs transitoires tels un traitement par des corticostéroïdes ou des antibiotiques<sup>6</sup>. L'infection peut mener à une diminution de la qualité de vie, une dénutrition et dans de rares cas à une septicémie fongique. La candidose disséminée présente un taux de mortalité de 47%<sup>5,7</sup>.

Il existe plusieurs types de candidose oropharyngée dont la pseudomembraneuse aigue, l'atrophique aigue, l'hyperplasique chronique, l'atrophique chronique, la glossite losangique médiane et la chéilite angulaire. On peut les distinguer par leur symptômes cliniques (plaques blanchâtres, langue rouge, etc.), le lieu d'infection et la cause (dentier, déficience en vitamine B12, etc.). La plus commune, la candidose pseudomembraneuse aigue, est caractérisée par des pseudomembranes ou plaques blanches consistant de cellules épithéliales desquamées, de fibrine et d'hyphes fongiques<sup>1</sup>. Ces plaques se retrouvent sur la muqueuse labiale et buccale, le palais dur et mou, la langue, le parodonte et l'oropharynx. Le diagnostic se fait facilement car il peut être visuel<sup>1</sup>. L'examen microscopique à l'état frais et la culture fongique d'un prélèvement

des lésions permettent de confirmer le diagnostic. Les symptômes de la candidose oropharyngée sont une sensation de brûlure dans la bouche ou sur la langue, une altération du goût. Ces symptômes peuvent conduire à une dénutrition et une prolongation de l'hospitalisation <sup>1</sup>.

## **1.2 Les antifongiques**

Plusieurs antifongiques sont disponibles pour le traitement de la COP. Selon les lignes directrices de la *Infectious Diseases Society of America*, la COP peut être traitée par la suspension de nystatine, le fluconazole, l'itraconazole, le posaconazole, le voriconazole ou l'amphotéricine B (cités ici sont les produits disponibles au Canada) <sup>8</sup>. Habituellement, pour une COP légère il est préférable d'administrer la suspension de nystatine. Pour une infection modérée à sévère, le fluconazole s'avère le premier choix<sup>8</sup>. Pour une COP réfractaire à ces deux traitements, on utilisera les autres antifongiques selon les résultats d'un antifongogramme.

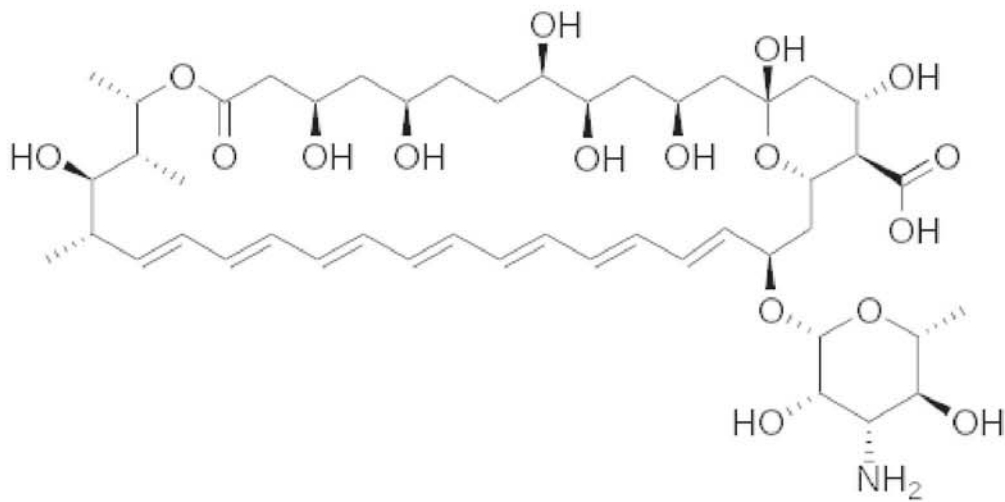
Il est possible de regrouper ces antifongiques en deux classes distinctes : les polyènes et les azoles.

### **1.2.1 Les polyènes**

L'amphotéricine B (AmB) et la nystatine sont des polyènes. Tous les deux possèdent des esters cycliques contenant plusieurs liaisons doubles conjuguées d'un côté et plusieurs groupements hydroxyles sur l'autre côté du cycle. La structure possède aussi un groupement aminoglycosidique D-mycosamine. Il existe une différence structurale entre l'AmB et la nystatine. L'AmB possède 7 liaisons doubles conjuguées (Figure 1.1) , tandis que la nystatine possède une discontinuité dans cette chaîne de conjugaisons (Figure 1.2) <sup>9</sup>. La structure rigide de l'AmB lui permet une liaison plus solide sur l'ergostérol. L'ergostérol est une composante de la membrane cytoplasmique et la cible thérapeutique de l'AmB. Par contre, cette structure lui

confère aussi une grande toxicité. En effet, la liaison est peu spécifique et donc la molécule se lie aussi au cholestérol humain. La nystatine, quant à elle, possède une chaîne plus flexible. Elle possède donc moins d'affinité que l'AmB pour lier l'ergostérol. Par contre, cette propriété lui confère une spécificité pour l'ergostérol fongique (Figure 1.3). En effet, elle ne lie pas facilement le cholestérol humain ce qui peut offrir un avantage clinique au niveau des effets secondaires<sup>9</sup>.

**Figure 1. 1 Structure de l'amphotéricine B**



**Figure 1. 2 Structure de la nystatine**

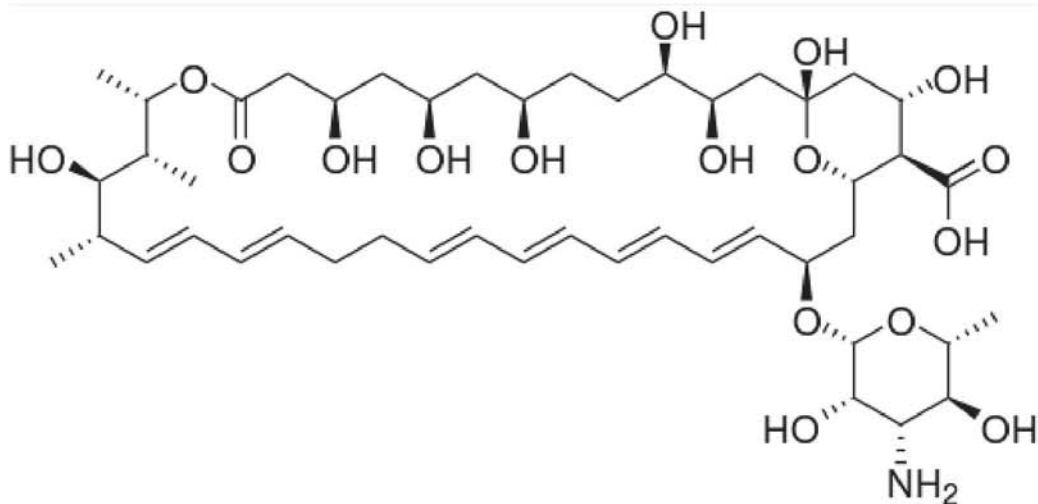
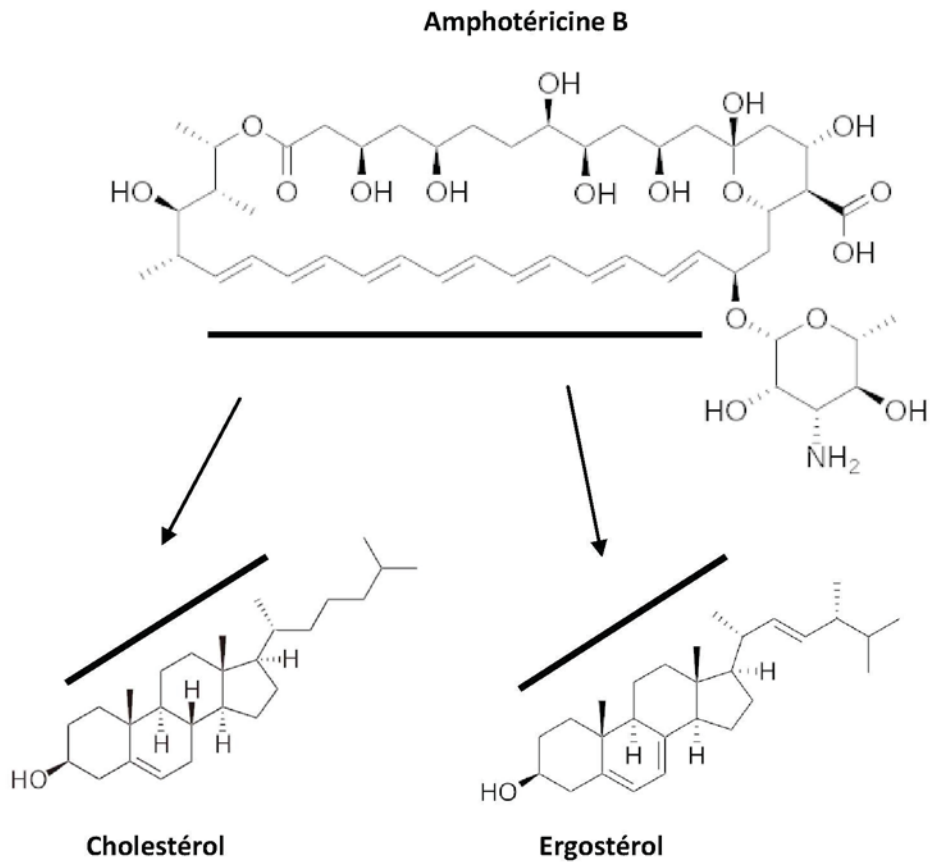


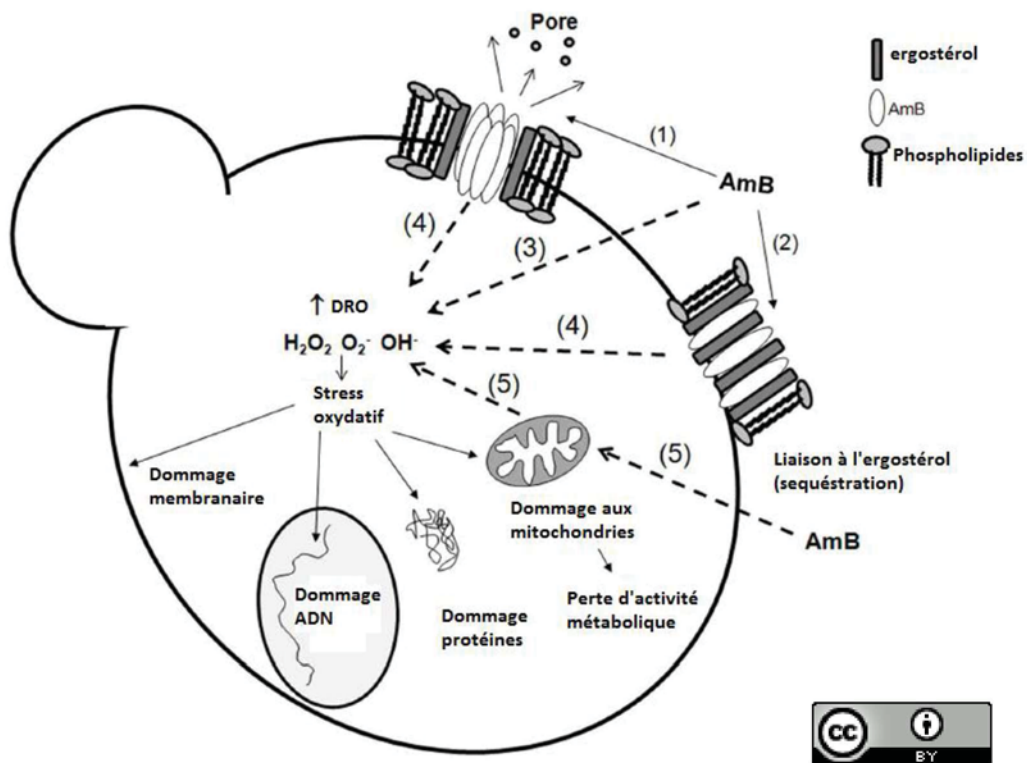
Figure 1. 3 Liaison de l'amphotéricine B à l'ergostérol et au cholestérol



Le mécanisme d'action des polyènes n'est pas tout à fait élucidé. Il est généralement accepté qu'ils agissent à deux niveaux. Premièrement, ils se lient à l'ergostérol, une composante des membranes du *C. albicans*. Ceci génère la formation de pores transmembranaires, une fuite d'ions et la séquestration de l'ergostérol. Par la suite, il se produit un dommage causé par le stress oxydatif <sup>10,11</sup>. Le résumé de ce mécanisme d'action a été démontré par Mesa-Arango (Figure 1.4) <sup>11</sup>. Les polyènes exercent une activité fongicide.



Figure 1. 4 Mécanisme d'action de l'amphotéricine B



Mécanisme d'action de l'amphotéricine B sur les cellules fongiques traduit de Mesa-Arango.<sup>11</sup>

L'amphotéricine B exerce son action à différents niveaux de la cellule : au niveau de la membrane et au niveau intracellulaire. Au niveau de la membrane, elle peut se lier à l'ergostérol (1) afin de former des pores, ou tout simplement induire la séquestration d'ergostérol (2) résultant dans la déstabilisation de la membrane. Dans la cellule, l'AmB peut aussi induire un stress oxydatif. Le mécanisme d'induction n'est pas encore élucidé, mais il existe plusieurs possibilités : l'AmB peut agir directement comme un prooxidant (3) et induire l'accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). Par contre, il est aussi possible que cet effet intracellulaire requiert la liaison à l'ergostérol (4). Puisque les DRO sont des dérivés naturels de la chaîne

respiratoire, on ne peut exclure que l'AmB influence l'activité mitochondriale (5), et contribue ainsi au stress oxydatif. L'accumulation de radicaux libres engendre de nombreux effets délétères sur les composantes essentielles de la cellule (membrane, protéines, ADN et mitochondries).

### **1.2.3 Les azoles**

Les azoles quant à eux possèdent une structure cyclique pentazolée : clotrimazole et miconazole (des imidazoles), terconazole, fluconazole, itraconazole, posaconazole et voriconazole (des triazoles). Le mécanisme antifongique est différent de celui des polyènes. Ces molécules inhibent la 14a-déméthylase<sup>12</sup>. Les composés azolés sont plus spécifiques au cytochrome P450 fongique que le cytochrome P450 humain. Cette inhibition prévient la conversion du lanostérol en ergostérol. Le fluconazole est surtout fongistatique à cause de ce mécanisme d'action (il empêche la croissance de nouvelles levures)<sup>12</sup>.

### **1.2.4 Efficacité comparée des antifongiques**

L'efficacité de chacune des molécules est dépendante de son mécanisme d'action et de la dose administrée. Pour évaluer l'activité d'une molécule antifongique, on utilise le terme concentration minimale inhibitrice (CMI). La CMI est la concentration minimale nécessaire pour inhiber la croissance visible d'une levure ou bactérie après un temps d'incubation. Dans le cas de molécules fongistatiques, on peut aussi déterminer la CMI<sub>50</sub>, concentration antifongique à laquelle on observe une diminution de 50% de la croissance visible. Ces CMI varient selon les espèces de *Candida* et la technique utilisées. Le protocole NCCLS (*Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, third edition, M27-A3*) est normalisé pour déterminer la CMI. La CMI représente uniquement l'activité antifongique *in vitro* de la molécule.

### **1.2.5 Innocuité comparée des polyènes**

Dans un contexte clinique, il faut aussi tenir compte de l'innocuité des antifongiques (Tableau 1.1). Les polyènes sont des molécules très puissantes, mais aussi très toxiques lorsque administrés par voie systémique. En effet, les polyènes créent des pores dans les membranes biologiques, créant des effets indésirables au niveau rénal, cardiaque et hépatique. Pour cette raison, la nystatine est surtout formulée pour usage topique sous forme de crèmes ou suspensions et son absorption est nulle. L'amphotéricine B quant à elle, est réservée pour les infections fongiques systémiques qui sont beaucoup plus sévères.

**Tableau 1. 1 Effets secondaires des polyènes et azoles**

	<b>Polyène topique (nystatine)</b>	<b>Polyène systémique (amphotéricine B)</b>	<b>Azole (fluconazole)</b>
Effets secondaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nausées</li> <li>- Vomissements</li> <li>- Diarrhée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fréquents : Hypotension, thrombophlébite, douleur au site d'injection, diarrhée, indigestion, perte d'appétit, nausées, vomissements, anémie normochrome, normocytaire, arthralgies, myalgies, céphalées, tachypnée, frissons,</li> <li>- Sérieux: asystolie, arrêt cardiaque, dysrythmie cardiaque, fibrillation ventriculaire, Stevens Johnson,, hypokaliémie, agranulocytose, anaphylaxie, encéphalopathie, néphrotoxicité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nausées (2,3 à 7%)</li> <li>- Vomissements (1,7%)</li> <li>- Diarrhée</li> <li>- Céphalées (1,9 à 13%)</li> <li>- Rash cutanée et Stevens-Johnson</li> <li>- Prolongation de l'intervalle QT (torsades de pointes)</li> <li>- Élévation des enzymes hépatiques</li> </ul>

Adapté de Micromedex : Version 1.48ob1705, Dernière date consulté le 05 août 2013

### **1.2.6 Traitement par la suspension de nystatine**

Puisque la nystatine est utilisée seulement comme traitement topique et n'est pas absorbée au niveau systémique, elle présente un très bon profil d'innocuité. La suspension de nystatine ne

présente que très peu d'effets secondaires tels que la nausée, la diarrhée et de l'inconfort intestinal.

Par contre, son efficacité antifongique en est plutôt limitée. En effet, l'efficacité de la nystatine dépend grandement de son temps de contact avec la levure. Le patient doit aussi s'assurer de badigeonner tous les sites infectés par le *Candida* dans sa cavité buccale<sup>8</sup>. Habituellement, on recommande que le patient se rince la bouche et se gargarise à l'aide du médicament. Comme mentionné plus haut, la nystatine est utilisée pour traiter une candidose oropharyngée légère. Elle permet de réduire considérablement la charge fongique dans la cavité buccale. Le système immunitaire du patient immunocompétent élimine le reste de l'infection<sup>13</sup>.

Par contre, quand un patient est immunodéprimé, par exemple dans le contexte d'infection au VIH, sa capacité à éliminer le *Candida* est grandement réduite. Pour cette raison, l'efficacité de la nystatine est inférieure à celle du fluconazole (azole systémique) chez les patients séropositifs<sup>13</sup>. Le fluconazole quant à lui présente plusieurs inconvénients. Tout d'abord, il possède plus d'effets secondaires dont les nausées, la diarrhée et surtout l'élévation des enzymes hépatiques. De plus, le fluconazole interagit avec plusieurs médicaments puisque c'est un inhibiteur des cytochromes p450 (CYP2C9 et CYP3A4), système très important dans le métabolisme des médicaments<sup>14, 15</sup>. Il faut prendre en considération que les patients infectés au VIH reçoivent une trithérapie antirétrovirale (ARV) et plusieurs des ARV sont métabolisés par le CYP3A4. De plus, le fluconazole interagit avec certains agents utilisés en chimiothérapie. Enfin, plusieurs cas de résistance ont été documentés avec le fluconazole et autres azoles<sup>14</sup>. Par contre, très peu de cas de résistance à l'usage des polyènes ont été recensés puisque ce sont des médicaments fongicides<sup>15</sup>. De plus les polyènes ne sont pas sujet à des interactions médicamenteuses puisqu'ils n'agissent pas au niveau du cytochrome P450.

## **1.3 Fabrication des préparations nanoformulées**

Afin de préparer des nanocristaux, il existe deux procédés connus: l'approche ascendante et l'approche descendante<sup>16</sup>.

L'approche ascendante est basée sur des principes chimiques. Effectivement, le principe actif est mis en solution, puis un ajout graduel d'un non-solvant (molécule non soluble dans ce solvant) se fait jusqu'à ce que les molécules s'agglomèrent puis précipitent en nanoparticules. Cette technologie est moins fréquemment utilisée car elle plus coûteuse et complexe (de nombreux essais et erreurs sont nécessaires).

Dans l'approche descendante, la taille de gros cristaux ( $\mu\text{m}$ ) de principe actif est diminuée, généralement à l'aide d'un procédé mécanique. Brièvement, les microcristaux sont dispersés dans une solution de surfactants agissant comme stabilisants, puis cette suspension est traitée par homogénéisation à haute pression ou broyage. Les surfactants sont ajoutés pour minimiser la réaggrégation des particules broyées. Effectivement, l'énergie de surface des nanoparticules est tellement grande qu'elles ont tendance à s'agglomérer spontanément.

### **1.3.1 Homogénéisation à haute pression**

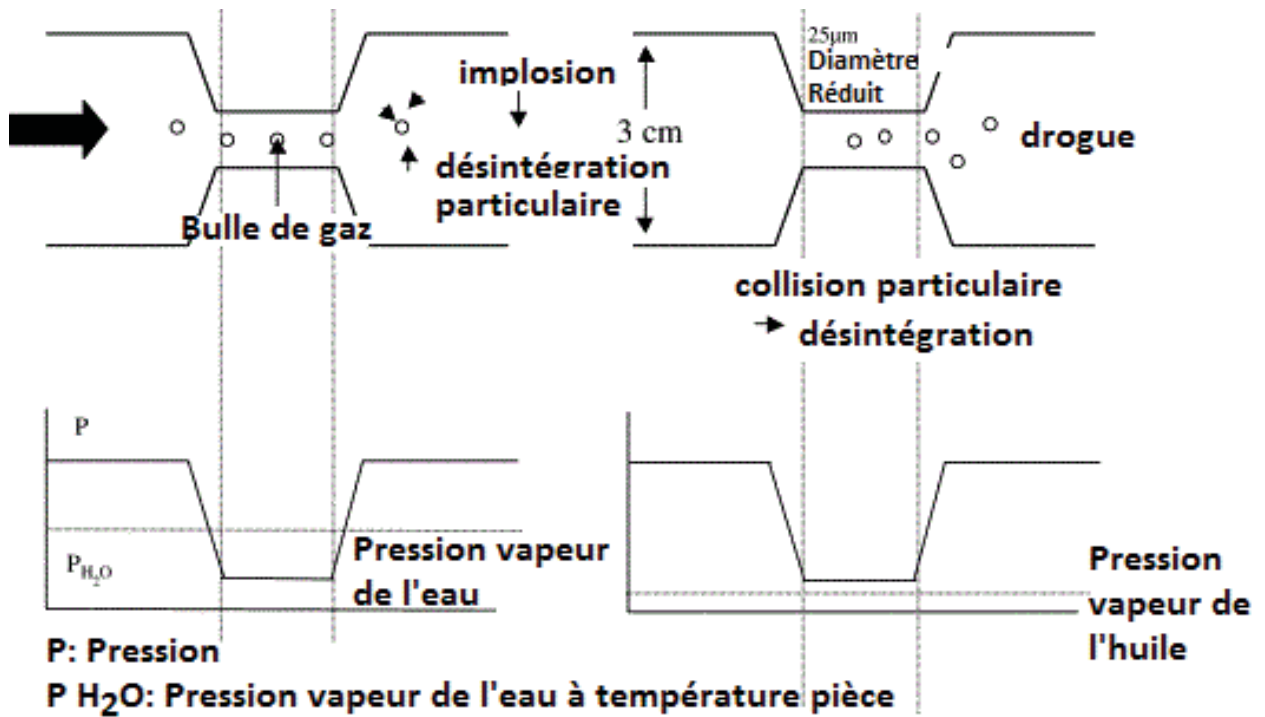
En ce qui concerne l'homogénéisation, il existe deux principes/types d'homogénéiseurs : la microfluidisation et l'homogénéisation à piston<sup>17</sup>.

Dans la microfluidisation (Microfluidizer®), la suspension est accélérée dans une chambre d'homogénéisation en 'Z' ou en 'Y'. Dans la chambre en 'Z', la suspension change de direction quelques fois et ce changement du flot mène à des collisions particulières et des forces de cisaillement. Dans la chambre en 'Y', la suspension est tout d'abord divisée en 2 jets qui vont se percuter par la suite<sup>17</sup>. Le désavantage de la microfluidisation est qu'il est nécessaire d'effectuer plusieurs passages (jusqu'à 75) afin d'obtenir une suspension de taille raisonnable

( $d_{90}$  moins de 400 nm ou tel que requis). Certains auteurs mentionnent que même après de nombreux passages, il reste quand même une grande fraction de microparticules.

Dans l'homogénéisation à piston (Avestin®), c'est le phénomène de cavitation qui est grandement responsable du bris des particules. Ce phénomène se base sur le théorème de Bernoulli qui peut être simplifiée comme suit: pression statique + pression dynamique = pression totale. La pression totale est toujours constante dans un système fermée pour un fluide non compressible. Une réduction du diamètre dans l'homogénéiseur mène à une augmentation énorme de la pression dynamique et une grande diminution de la pression statique. Un liquide se met à bouillir quand la pression statique est inférieure à sa pression de vapeur. Conséquemment, le liquide se mets à bouillir et former des bulles de gaz qui implosent après avoir quitté le diamètre réduit en retrouvant les conditions de pression initiales (Figure 1.5 et 1.6).<sup>17</sup>

Figure 1. 5 Homogénéisation à piston

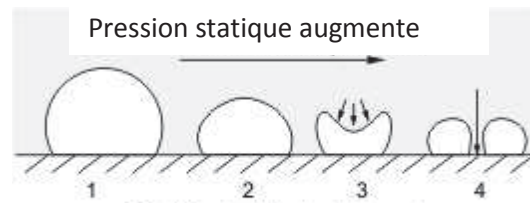


Représentation du changement du diamètre dans un homogénéiseur à piston. La dispersion passe à travers la partie étroite de l'homogénéiseur. La réduction du diamètre dans l'homogénéiseur mène à une augmentation de la pression dynamique et une diminution de la pression statique. Un liquide se met à bouillir quand la pression statique est inférieure à sa pression de vapeur. Conséquemment, des bulles de gaz se forment et implosent après avoir quitté le diamètre réduit en retrouvant les conditions de pression normale.<sup>17</sup>

Reproduit, adapté et traduit avec permission <sup>17</sup>



**Figure 1. 6 Représentation de la cavitation**



(4) La bulle de cavitation implose proche d'une surface fixe; générant un jet de liquide aux alentours

### 1.3.2 Nanobroyage

Le broyage mécanique peut être divisé en deux catégories : broyage sec et broyage humide. Le broyage à sec n'est pas suffisamment efficace pour obtenir des particules de taille nanométrique, mais peut être utile pour la micronisation de particules (tel que le broyeur à jets d'air). Le broyage humide offre plusieurs avantages par rapport à l'homogénéisation. Tout d'abord, il est possible de broyer de grandes quantités de principe actif. Par la suite, il n'est pas nécessaire de microniser préalablement les cristaux de principes actifs. De plus, il y a peu de changements physicochimiques du principe actif et enfin on obtient une distribution de taille plus uniforme<sup>18, 19</sup>. Le broyage humide est privilégiée du au fait qu'il est possible de créer des particules de taille nanométrique, d'observer peu de changements physicochimiques, et d'utiliser une nanosuspension de nystatine commercialement disponible.

Le broyage humide peut être effectué soit à basse énergie ou à haute énergie. Le broyage à basse énergie consiste à utiliser un appareil utilisant des billes ou perles (en verre, en oxyde de zirconium, en métal ou en polymère très dur). La suspension et les billes sont ajoutées dans un contenant cylindrique (soit en verre ou autre). Puis, les billes sont agitées à une vitesse déterminée et les particules sont broyées entre les billes par la cascade de bille formée (Roll-Mill®). Il existe aussi le broyage à haute énergie où on utilise le même processus, mais dans ce as

l'agitateur est beaucoup plus puissant et la vitesse plus grande (plus de 2000 révolutions par minute, Dyno-Mill®).

Une fois la nanosuspension obtenue, il est important de procéder à sa caractérisation. En effet, il faut analyser la taille des particules soit par diffraction laser (DL) ou par diffusion dynamique de la lumière (DLS). De plus, il est possible d'évaluer la teneur de la nanosuspension par chromatographie liquide à haute performance. Cette caractérisation est nécessaire afin de vérifier si le processus de broyage a bien fonctionné et s'il y a eu dégradation du principe actif.

### **1.3.3 Mesure de la taille**

L'analyse de taille de particules est effectuée par diffraction laser en utilisant l'appareil Coulter LS 13 320.

Brièvement, un faisceau de lumière laser passe à travers un nuage de particules. Cette lumière est diffractée et absorbée selon la taille de la particule. Une particule plus petite diffracte la lumière par un grand angle, mais absorbe peu de lumière. Une grande particule change peu l'angle de la lumière mais en absorbe beaucoup. La lumière passe ensuite dans une lentille de Fourier pour être redirigée dans un détecteur. Par la suite, ces données sont analysées mathématiquement. On peut alors obtenir la distribution de taille des particules. L'avantage de la diffraction laser est qu'on peut mesurer une grande distribution de taille (40 nm à 2 mm) avec un degré de précision relativement élevé.

La DLS est une technique qui se base sur la théorie du mouvement Brownien. Dans cette théorie, toutes les particules en suspension se déplacent d'une manière aléatoire. Les particules se déplacent à une certaine vitesse et amplitude. Ainsi, une particule plus petite se déplace plus rapidement mais parcourt une amplitude moins grande. La lumière qui passe à travers ce nuage de particules diffuse dans toutes les directions selon le phénomène de Rayleigh. On peut donc

calculer la variation de l'intensité de la lumière diffracté à un angle donnée en fonction du temps. Avec ces informations et l'analyse mathématiques des données, il est possible de déterminer la taille moyenne des particules et ainsi que l'indice de polydispersité. Plus la mesure de diffraction change rapidement en fonction du temps, plus l'effet du mouvement Brownien est important et plus la taille est petite. La distribution de taille obtenue n'est pas une 'vraie distribution' avec cette technique; par contre, la procédure est non destructrice et seulement une petite quantité d'échantillon est requise pour l'analyse comparativement à la diffraction laser. De plus, l'analyse de tailles des particules permet une évaluation nanométrique jusqu'à un maximum théorique de 10  $\mu\text{m}$ .

L'avantage de la diffraction laser est qu'elle peut analyser une vraie distribution de taille incluant celle observée avec la suspension commerciale de nystatine. De plus, il faut tenir compte du fait que la DLS tient compte du mouvement brownien et que celui-ci est grandement affecté par la viscosité du véhicule. Puisque la suspension de nystatine est dans un milieu plutôt visqueux, il devient donc plus difficile d'interpréter les données par la mesure du DLS.

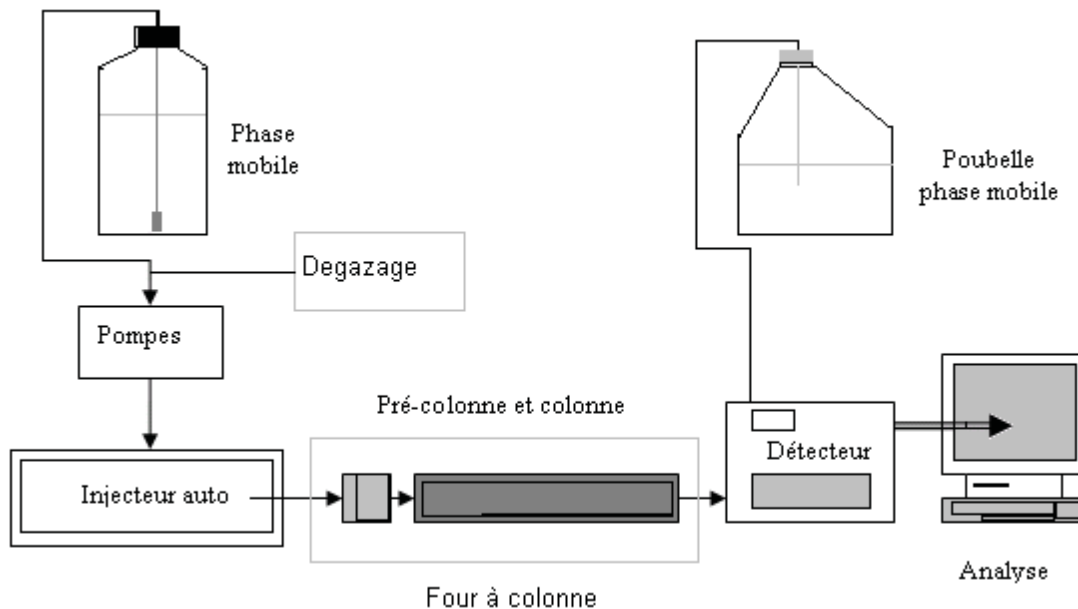
#### **1.3.4 Mesure de la teneur**

Il existe plusieurs techniques pour évaluer la teneur en principe actif d'une suspension de nystatine. Il est entre autres possible d'utiliser la spectroscopie UV, la spectroscopie de masse et la chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La CLHP est une technique analytique rapide et peu coûteuse qui permet l'analyse d'un mélange de composé. Effectivement, elle permet la séparation et la quantification d'un principe actif contenu dans un mélange d'excipients (Figure 1.7).

La séparation des composés dépend de leurs interactions avec la phase mobile et la phase stationnaire. Le système CLHP le plus fréquemment utilisé est en phase inverse, c'est-à-dire une

phase stationnaire apolaire qui laisse passer les composés polaires. La phase mobile peut varier en pH (état d'ionisation) et en polarité (différentes proportions de solvants). La colonne en phase inverse est composé habituellement de particules de silice sur lesquelles des chaînes d'acide gras 4 à 18 carbones sont greffées dépendamment de l'hydrophobicité recherchée. Il est nécessaire de faire varier les conditions de la phase mobile, la phase stationnaire et de choisir la longueur d'onde approprié afin d'identifier adéquatement le composé recherché.

**Figure 1. 7 Représentation d'un système de chromatographie liquide à haute performance**



Une ou plusieurs pompes font circuler la phase mobile à travers le système de chromatographie. L'injecteur automatique prélève une quantité de l'échantillon à analyser et l'intègre dans le système. Le mélange passe à travers la colonne et l'analyte est ralenti par la colonne. Le détecteur UV transmet un signal d'intensité à la longueur d'onde désirée. Le système informatique permet d'analyser et quantifier l'analyte à l'aide aussi d'une courbe de calibration.

### 1.3.5 Évaluation de l'état cristallin

La plupart des principes actifs sont des solides qui peuvent exister sous plusieurs états cristallins. Notamment, on peut retrouver la forme cristalline avec des arrangements moléculaires, la forme amorphe où il n'y a pas de structure régulière (sans arrangements réguliers de réticules moléculaires), ou encore la forme de pseudo-polymorphes avec des arrangements qui incluent des solvants (solvates) ou de l'eau (hydrates). Aussi, il faut noter que plusieurs formes peuvent coexister. Il est important de connaître l'existence de ces polymorphes, car elle a des conséquences sur les propriétés physiques tels le point de fusion, la stabilité physique et chimique, la vitesse de dissolution et la solubilité apparente. Par exemple, il est connu que la forme amorphe peut se dissoudre plus facilement dans l'eau (possède une solubilité de saturation plus élevée), mais cette forme peut présenter des problèmes de stabilité à long terme<sup>20, 21</sup>.

Lorsque l'approche descendante à haute énergie est utilisée (nanobroyage), une nanosuspension partiellement amorphe est produite<sup>21</sup>. Les nanoparticules amorphes possèdent une grande énergie et sont très instables. Elles veulent donc se convertir à l'état cristallin<sup>22-24</sup>. Cette conversion se fait au fil du temps, tout dépendamment de la température, le médium de dispersion, la présence de stabilisants et la présence de particules cristallines. Effectivement, il a été démontré que des nanoparticules amorphes sont très instables en présence de petites quantités de particules cristallines et se reconvertissent à l'état cristallin<sup>22-24</sup>. Certaines nanosuspensions amorphes ont démontrés une stabilité à long terme en utilisant l'approche ascendante<sup>25, 26</sup>. Le procédé de manufacture peut aussi induire d'autres types de transformations cristallines (d'une forme cristalline à une autre forme cristalline)<sup>27</sup>.

La technique de diffraction par rayon X (XRD) est la technique la plus fréquemment utilisée pour évaluer la structure cristalline des nanoparticules. L'analyse calorimétrique différentielle à balayage (DSC) est une technique supplémentaire qui peut évaluer la cristallinité<sup>21</sup>.

La XRD est une technique qui détermine la structure atomique et moléculaire d'un cristal. Le concept se base sur la diffraction des rayons-X, lorsque ceux-ci rencontrent des atomes cristallins d'un échantillon. L'appareil émet des rayons-X sur l'échantillon à analyser avec un certain angle d'incidence qui varie en continuité. Quand cet angle correspond à l'angle d'un plan atomique, la diffraction a lieu. Les rayons sont diffractés vers un détecteur qui transforme l'énergie en une intensité de signal. Il est donc possible d'évaluer les différents plans atomiques du matériel en fonction de l'angle et de l'intensité du signal. On peut ainsi déterminer la structure cristalline en comparant les données obtenues avec des standards de référence<sup>28</sup>.

La DSC est une méthode thermoanalytique qui permet d'obtenir de l'information sur l'état physique d'un solide<sup>28</sup>. La DSC permet de mesurer le flux de chaleur nécessaire pour équilibrer la température de deux creusets chauffés à la même température, l'un d'eux étant le creuset de référence (vide), l'autre contenant l'échantillon. On mesure ici une différence d'énergie. Donc, si le thermomètre détecte une baisse de température de l'échantillon par rapport à la température de la chambre, la résistance électrique fournira de l'énergie et vice-versa. Tous les changements de phase s'accompagnent d'une absorption ou d'un dégagement de chaleur : il faut fournir de la chaleur à un solide pour le porter à fondre (fusion) ou inversement il y aura dégagement de chaleur lors de la solidification d'un liquide (cristallisation) ou lors de sa combustion<sup>28</sup>. Les particules cristallines ont habituellement un pic de fusion très étroit et net, ce qui est absent dans les matériaux amorphes. La température de point de fusion varie avec la forme cristalline, c'est une méthode d'identification de la structure.

## **1.4 Films oraux**

### **1.4.1 Ingrédients**

#### **Polymères pelliculants**

Afin de produire une pellicule orale, il est tout d'abord nécessaire d'avoir un polymère pelliculant. Ce polymère doit être en proportion d'au moins 45% du poids total de la pellicule <sup>29</sup>.

Les polymères disponibles sont principalement l'hydroxypropylmethyl cellulose, l'hydroxypropyl cellulose, des amidons modifiés, le pullulan, la pectine, la gélatine et la carboxymethyl cellulose.

#### **Plastifiants**

Il est par la suite nécessaire de rajouter un plastifiant afin d'améliorer la flexibilité et diminuer la fragilité de la pellicule. Le choix du plastifiant dépend de la nature du polymère pelliculant.

Habituellement on utilise du glycerol, propylène glycol, polyéthylène glycol de faible poids moléculaire, dérivés de phtalates, dérivés de citrate, triacétin, sorbitol, mannitol et l'huile de ricin. Ceux-ci sont utilisés jusqu'à 20 % du poids total de pellicule <sup>29</sup>.

#### **Principe actif**

Le principe actif quant à lui peut composer de 5 à 30% du poids total de la pellicule. Il est bien important que celui-ci résiste au processus de formation de pellicule tout dépendamment du processus utilisé. De plus, il est important que celui-ci soit en solution ou sinon dispersé uniformément dans la pellicule <sup>29</sup>.

#### **Autres agents**

Il est possible d'ajouter des agents pour améliorer le goût ou l'apparence de la pellicule pour une administration pédiatrique tels des agents sucrants, stimulants la salive, modifiants le goût ou colorants.

Il est aussi possible d'ajouter un agent viscosifiant ou stabilisant afin d'améliorer la consistance de la dispersion ou solution de la pellicule. La gomme de xanthan, carragan et cellulosique peuvent être utilisés jusqu'à 5% du poids total de la molécule. On peut aussi utiliser des agents émulsifiants<sup>29</sup>.

#### **1.4.2 Procédés**

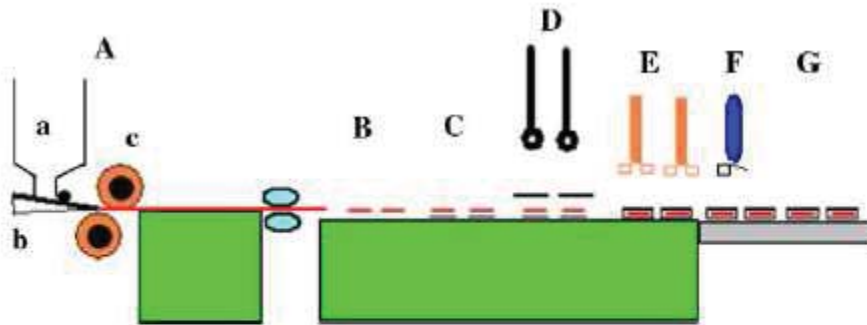
Habituellement il existe deux techniques pour la production de pellicules : l'extrusion à chaud et le moulage.

Dans la technique d'extrusion, le principe actif et les autres excipients sont mélangés dans un mélangeur à sec, puis chauffés jusqu'à l'obtention d'un état plastique, puis extrudés. Dans ce processus, les solvants sont complètement éliminés. Les pellicules sont ensuite refroidies et coupées selon la longueur désirée. La haute température utilisée dans le processus peut dégrader un principe actif thermosensible. Donc, habituellement les pellicules sont fabriquées par la technique du moulage.

Typiquement, la solution-mère est préparée en mélangeant les excipients et le principe actif dans un solvant ou un système de solvant. Il est important que la viscosité du liquide permette un bon moulage et que l'uniformité de mélange soit adéquate. De plus, il faut que cette solution soit dégazée afin d'éviter la formation de bulles d'air dans la pellicule lors du séchage. Elle doit aussi être maintenue à une température afin d'avoir la viscosité idéale pour le moulage. Par la suite, la solution est coulée sur un substrat inerte en mouvement. Des rouleaux sont utilisés afin d'obtenir la bonne épaisseur de pellicule. La pellicule obtenue est séchée par la suite afin de retirer les traces de solvant (Figure 1.8)<sup>29</sup>.



Figure 1. 8 Représentation schématique d'une unité de fabrication de pellicules



A - La formation du film prend forme. Les rouleaux peuvent être ajustés afin d'avoir l'épaisseur du film désirée. Après la formation du film, celui-ci est séché. a – Réservoir fournissant le matériel pellicule-formant, b- deaérateur et applicateur de film, c – rouleaux.

B- Le film est coupé en morceaux de la taille désiré

C- Les pellicules sont déposées sur leur emballage inférieur

D- Un emballage supérieur est placé sur les pellicules

E- Scellage de l'emballage

F- Introduction d'une encoche de déchirure pour l'ouverture de l'emballage

G- Contrôle de qualité du produit

Reproduit, adapté et traduit avec permission <sup>29</sup>

Pour une production à plus petite échelle, il est possible d'utiliser un applicateur où on dépose la solution sur un substrat tel une plaque de verre ou teflon.

### 1.4.3 Caractérisation

#### Épaisseur

L'épaisseur de la pellicule peut être mesurée à l'aide d'un micromètre à différents endroits stratégiques. L'essentiel est de maintenir une uniformité d'épaisseur car celle-ci est directement reliée à l'uniformité de dose par la suite <sup>29</sup>.

#### Sécheresse au contact

C'est le pouvoir de la pellicule à adhérer ou coller sur un accessoire <sup>29</sup>.

#### Force tensile

La force tensile est le stress maximal qui peut être appliqué jusqu'à ce que la pellicule casse. Elle est calculée par la charge appliquée jusqu'à la rupture divisé par l'aire de pellicule <sup>29</sup> :

$$Force\ tensile = \frac{Charge\ appliquée\ jusqu'à\ rupture\ X\ 100}{Épaisseur\ de\ la\ pellicule\ X\ Largeur\ de\ la\ pellicule}$$

#### Pourcentage d'élongation

Quand un stress est appliqué, la pellicule s'étire. Habituellement, la pellicule s'étire plus facilement sans se rompre s'il y a plus de plastifiant <sup>29</sup>.

$$\% \text{ élongation} = \frac{Nouvelle\ longueur\ de\ la\ pellicule\ X\ 100}{Longueur\ initiale\ de\ la\ pellicule}$$

#### Résistance au déchirement

Un très lent débit de force est appliquée sur la pellicule jusqu'à ce qu'elle déchire. Cette force est enregistrée en Newton <sup>29</sup>.

#### Module de Young

C'est la mesure de la rigidité de la pellicule.

$$\text{Module de Young} = \frac{\text{Pente} \times 100}{\text{Épaisseur de la pellicule} \times \text{transverse} - \text{vitesse de la tête}}$$

Une pellicule cassante possède une force tensile et un module de Young élevé. Par contre le pourcentage d'élongation est faible <sup>29</sup>.

### **La résistance au pliage**

Le nombre de fois qu'on peut plier la pellicule au même endroit avant que celle-ci ne brise <sup>29</sup>.

### **Autres propriétés**

Les autres propriétés incluent le temps de désintégration, le temps de dissolution, la teneur et l'uniformité de contenu, les propriétés organoleptiques et la mucoadhésion <sup>29</sup>.

### **1.4.4 Film oraux nanoformulés**

Il est possible de produire des films oraux nanoformulés. Effectivement, il existe des films oraux contenant une dispersion de cristaux de nystatine <sup>30</sup>. Ces cristaux de nystatine sont de la taille du micromètre. La nystatine nanonisée pourrait donc être incorporée dans une base pellicule formante. Afin de confirmer que le film est bel et bien nanoformulé, il sera nécessaire d'évaluer la taille des particules après redispersion dans l'eau.

## 1.5 Évaluation de l'efficacité des antifongiques

### 1.5.1 Évaluation de l'efficacité *in vitro*

Afin d'évaluer l'activité antifongique de la nanosuspension de nystatine, il est nécessaire d'effectuer des essais *in vitro* et *in vivo*. Les essais *in vitro* évalueront l'activité de la nanosuspension et suspension de nystatine sur deux souches distinctes de *C. albicans*. Les essais peuvent être effectués en milieu solide (gélose) ou liquide (bouillon nutritif)<sup>31 32</sup>. Dans les deux cas, l'efficacité intrinsèque d'une molécule antifongique en solution est évaluée et non l'efficacité d'une nouvelle formulation. Par ailleurs, des essais préliminaires effectués en milieu liquide ont démontré qu'il est impossible de comparer les deux formulations de nystatine. En effet, aux concentrations utilisées (moins de 2 µg) la nystatine se solubilise complètement dans le milieu. Après solubilisation, il n'est plus possible d'évaluer la différence entre la suspension et la nanosuspension. Afin de travailler avec des concentrations plus élevées, il est nécessaire d'utiliser un milieu solide (gélose).

L'essai *in vitro* sur milieu solide s'inspire de la méthode Kirby Bauer pour évaluer la sensibilité des antibiotiques. Brièvement, on prépare de l'agar YPD (yeast extract peptone and dextrose) dans un Pétri en plastique. On inocule cet agar avec une souche de *Candida*. Par la suite, on place un disque de papier Whatman sur l'agar puis on dépose la formulation de nystatine sur le disque. On incube le Pétri à 30 °C pendant 24 heures. Enfin, on mesure le diamètre d'inhibition créé par la diffusion de l'antifongique. Plus le diamètre est grand, plus la formulation est active.

Les essais *in vitro* ont été effectués sur deux souches distinctes de *C. albicans* : SC5314 et LAM-1. La souche SC5314 a été isolée d'un patient atteint de candidose disséminée et a servi de souche de référence pour le séquençage génomique de *C. albicans*<sup>33 34</sup>. La souche LAM-1 a été isolée d'un patient atteint de candidose systémique<sup>35</sup>. Il est connu du laboratoire du professeur de

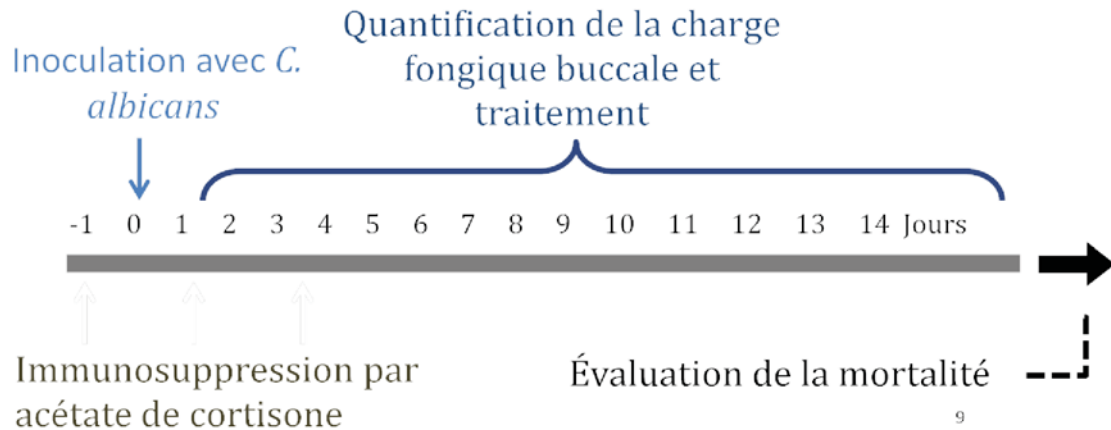
Repentigny que la souche SC5314, bien que très bien caractérisé, est peu virulente suite à l'inoculation intra-buccale chez la souris. Par contre, la souche LAM-1 provoque une candidose oropharyngée dans ce même modèle animal. Pour cette raison, nous avons effectué la majorité des essais *in vitro* avec la souche SC5314, mais nous avons aussi comparé l'activité *in vitro* à l'égard de la souche LAM-1.

### **1.5.2 Évaluation de l'efficacité *in vivo***

Par la suite, il fut nécessaire de développer un protocole pour évaluer l'efficacité *in vivo* de la nystatine. Il existe plusieurs modèles animaux de candidose oropharyngée disponibles chez la souris, le rat, le hamster et le singe <sup>36</sup>. Le modèle murin présente plusieurs avantages dont son coût relativement faible, la littérature existante sur le modèle et le fait qu'une étroite collaboration était disponible avec le laboratoire du Dr de Repentigny ayant une longue expérience avec ce modèle.

Il est important de noter qu'une souris immunocompétente ne développe pas de candidose oropharyngée soutenue suite à l'inoculation intra-buccale de *C. albicans*. Il est donc nécessaire d'immunosupprimer la souris et ainsi rendre la muqueuse buccale susceptible à l'infection. À cette fin, il est possible d'irradier ou gratter cette muqueuse, administrer des médicaments immunosuppresseurs ou utiliser des souris transgéniques VIH <sup>37</sup>. Dans notre cas, nous avons utilisé des souris DBA/2 immunosupprimées à l'acétate de cortisone. Ce modèle est décrit dans *Nature Protocols* <sup>38</sup>. La souris DBA/2 est particulièrement propice à la candidose oropharyngée car elle est déficiente en facteur du complément C5 <sup>39,40</sup>.

Le protocole animal se déroule tel que suit :



Afin de comparer l'efficacité des différentes formulations, il est nécessaire d'évaluer la charge fongique buccale chez chaque souris. La technique consiste à écouvillonner l'intérieur de la cavité buccale de la souris avec une tige montée afin de prélever le *C. albicans*. Cette technique permet une évaluation longitudinale de la charge fongique car on prélève de la même souris quotidiennement. Une autre technique consiste à euthanasier la souris, prélever sa langue puis la broyer, pour enfin compter les CFU (colony forming units). Cette technique est plus coûteuse car il faut un grand nombre de souris pour obtenir des données, mais aussi plus précise <sup>41</sup>. Néanmoins, la première technique est la plus avantageuse car elle permet une quantification longitudinale et est moins dispendieuse.

Une autre mesure de l'efficacité, consiste à évaluer la morbidité et la mortalité. Il existe des critères stricts de morbidité qui nécessitent l'euthanasie d'un animal. La perte de poids, la perte de poils et l'apathie sont certains de ces critères. Il est possible d'établir une corrélation entre la charge fongique buccale et la mortalité. Les données de mortalité peuvent être interprétées sur une courbe de survie de Kaplan-Meier <sup>42</sup>.

Par ailleurs, une évaluation histopathologique de la langue de la souris permet de confirmer le diagnostic de candidose oropharyngée. De plus, cette évaluation permet de comparer qualitativement la sévérité de l'infection fongique entre les différents groupes. La coloration par Gomori-Grocott est souvent utilisée pour mettre en évidence le *C. albicans*. Elle colore le *Candida* (en noir) sur un fond plus pâle (verdâtre). De plus, on utilise la coloration hématoxyline phloxine saffron (HPS) pour déterminer l'étendue de l'inflammation.

### **1.5.3 Évaluation de la biodisponibilité orale de la nystatine**

Plusieurs études démontrent que la nanonisation augmente la biodisponibilité<sup>18, 19</sup>. Les effets d'une absorption systémique de la nystatine seraient très dangereux car ce produit est très toxique au niveau cellulaire<sup>43</sup>. Cette toxicité, s'explique par le fait que la nystatine ne se lie pas qu'à l'ergostérol fongique, mais aussi au niveau du cholestérol humain. Un fait intéressant est que l' B, une molécule s'apparentant à la nystatine, possède une activité antifongique plus forte car sa liaison avec l'ergostérol est plus forte. Par contre, elle est aussi une molécule beaucoup plus toxique car elle est beaucoup moins spécifique que la nystatine pour l'ergostérol comparativement au cholestérol. La structure de la nystatine lui confère une certaine spécificité. On connaît déjà très bien les effets secondaires d'une molécule qui s'apparente beaucoup à la nystatine, l' B. Cette molécule, une fois absorbée au niveau systémique, possède une grande néphrotoxicité qui peut devenir mortelle<sup>44, 45</sup>. Il est donc important de s'assurer qu'il n'y aura aucune absorption systémique de la nanosuspension afin de conserver l'innocuité. Donc, une étude pharmacocinétique unidose a été réalisée afin de déterminer s'il y avait absorption de la nanosuspension. Brièvement, le sang total du cœur de la souris est prélevé afin d'avoir le plus gros volume disponible. Par la suite, la nystatine est extraite avec du méthanol, puis elle est quantifiée par CLHP<sup>46</sup>.

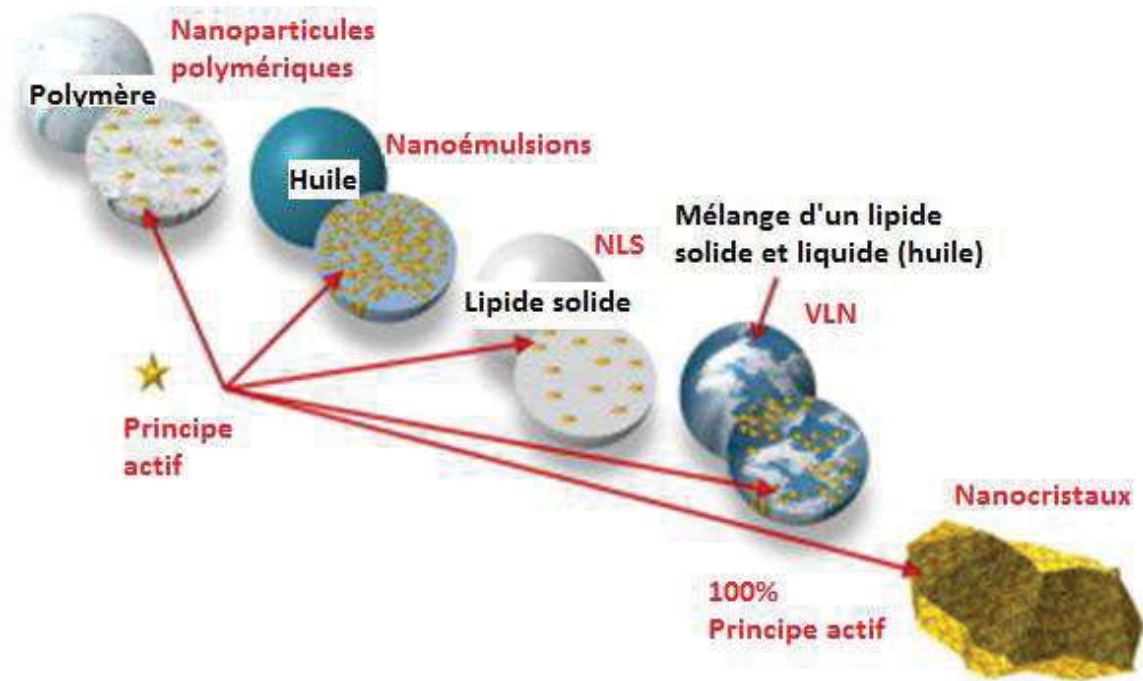
## **1.6 Vers un film oral de nystatine nanonisée**

### **1.6.1 Hypothèse de recherche 1 : la nystatine nanoformulée aura une efficacité améliorée.**

La nystatine est formulée en suspension en partie à cause de ses propriétés physicochimiques. En effet, la molécule de nystatine possède une très faible solubilité dans l'eau de 0.360 mg/mL. Ceci empêche la dissolution des particules dans le milieu aqueux. De plus, la solubilité d'un médicament en affecte directement sa biodisponibilité orale. En effet, une molécule doit être premièrement dissoute dans le milieu gastro-intestinal avant de pouvoir être absorbée à travers la paroi intestinale. Bien évidemment, ce processus doit être fait dans une fenêtre de temps raisonnable, car le temps de passage d'un médicament est limité dans le tractus digestif. Plus de 40% des molécules identifiées en criblage à haut débit lors de la phase de découverte du médicament sont faiblement solubles dans l'eau<sup>18, 19</sup>. Ceci engendre de grandes difficultés de formulation. Afin de palier au problème de solubilité, plusieurs technologies sont utilisées comme la formation de sels, l'utilisation de co-solvants, le développement de pro-médicaments, les systèmes colloïdaux, etc. La technologie exploitée dans le Laboratoire de recherche sur la biodisponibilité porte principalement sur la réduction de taille de particules par nanobroyage. En réduisant la taille des particules du principe actif à l'échelle du nanomètre, on en augmente grandement la surface de contact avec son milieu et ainsi sa vitesse de dissolution. La majorité du temps ces particules insolubles sont dispersées dans un milieu aqueux ce qui forme une suspension. Il est important de comprendre que les nanocristaux sont bien différents des autres formulations à base de nanoparticules comme les nanoémulsions, les liposomes, les particules solides lipidiques, les nanoparticules polymériques (Figure 1.9).<sup>20</sup>



Figure 1. 9 Représentation de nanoformulations <sup>20</sup>



Reproduit, adapté et traduit avec permission <sup>38</sup>

Structure de nanoparticules polymériques, nanoémulsions, nanoparticules lipidiques solides (NLS), et vaisseaux lipidiques nanostructurés (VLN), tous comparés aux nanocristaux. Les particules lipidiques solides sont faites exclusivement d'un lipide solide. Les vaisseaux lipidiques nanostructurés sont faits d'un lipide solide et liquide (huile), mais les deux sont solides à température pièce. Les particules matriciels ont du principe actif distribués à travers la matrice ou adsorbé sur la surface et la charge de médicament est très limitée; les nanocristaux sont composés à près de 100% principe actif.

L'avantage d'utiliser des nanocristaux comparativement aux autres nanoparticules est que la capacité de chargement du principe actif est de près de 100%, les excipients utilisés sont peu coûteux et le processus de développement est relativement simple.

De plus, des nanocristaux de nystatine auraient des propriétés avantageuses :

- 1) Une augmentation de la concentration dans la couche stationnaire due à une augmentation de la pression de dissolution par des nanoparticules ayant un plus fort rayon de courbure (Figure 1.10).

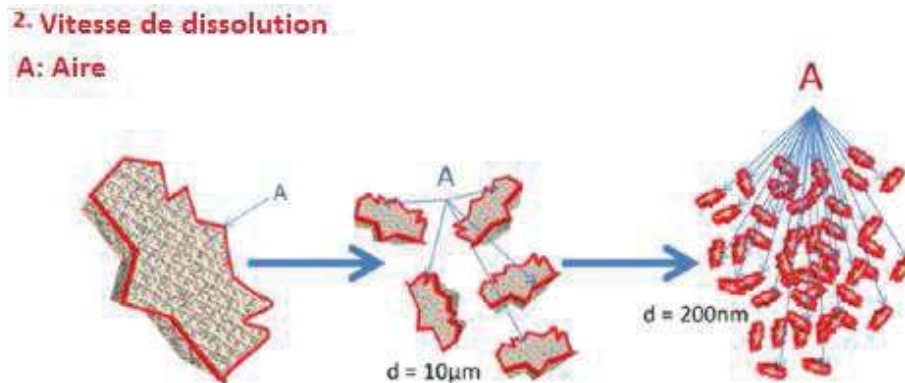
Figure 1. 10 Représentation de l'augmentation de la vitesse de solubilité à saturation <sup>20</sup>



Reproduit, adapté et traduit avec permission <sup>38</sup>

- 2) Une augmentation de la vitesse de dissolution due à la surface de contact augmentée (Figure 1.11).

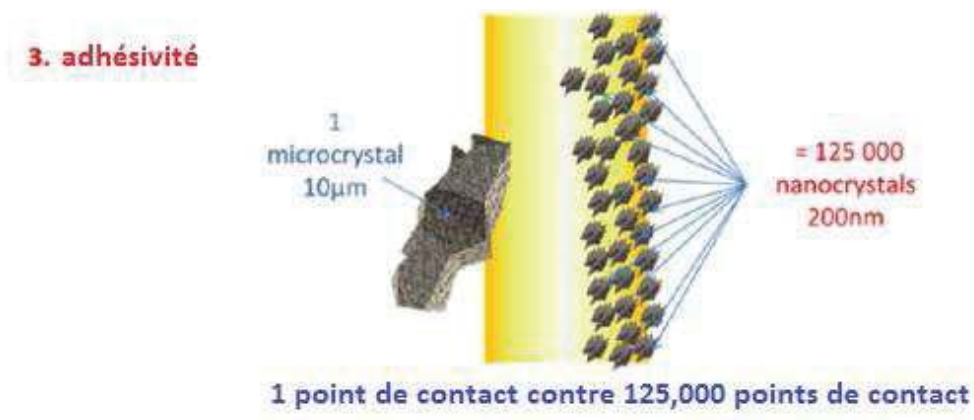
Figure 1. 11 Représentation de l'augmentation de la vitesse de dissolution <sup>20</sup>



Reproduit, adapté et traduit avec permission <sup>38</sup>

3) Une augmentation de l'adhésivité due à ce même principe (Figure 1.12).

**Figure 1. 12 Représentation de l'augmentation de l'adhésivité** <sup>20</sup>



Reproduit, adapté et traduit avec permission <sup>38</sup>

Nous proposons ainsi que l'efficacité topique de la nystatine pourrait être augmentée grâce à ces points.

### **1.6.2 Hypothèse de recherche 2 : une pellicule orale sera une alternative de traitement avantageuse**

Il est possible d'améliorer l'efficacité de la formulation de nystatine en développant une pellicule orale. Créer une pellicule orale de nystatine permettrait une application plus facile de la drogue <sup>30</sup>. Cette pellicule orale sera déposée sur le palais, ce qui éviterait le badigeonnage de la suspension dans la cavité orale. Une étude a démontré que l'efficacité de la suspension de la nystatine est réduite due à la faible observance au traitement <sup>47</sup>. Cette faible observance est expliquée par la difficulté d'administration du produit dans l'étude <sup>47</sup>. Une pellicule mucoadhésive augmenterait l'efficacité de notre formulation. La mucoadhésion est la propriété de pouvoir coller sur une muqueuse. Une pellicule qui colle sur la muqueuse permet une libération prolongée du médicament. Il est important de noter que l'efficacité de la nystatine

est dépendante de son temps de résidence dans la cavité orale<sup>48</sup>. En ayant une formulation qui augmente ce temps de résidence, on augmente potentiellement l'efficacité antifongique.

### **1.6.3 Objectifs**

- a) Développer une méthode pour obtenir une nanosuspension de nystatine.
- b) Développer une méthode analytique pour évaluer la qualité de la nanosuspension obtenue.
- c) Développer des méthodes d'évaluation *in vitro* pour comparer l'activité de la nanosuspension à celle de la suspension.
- d) Comparer l'efficacité *in vivo* de la nanosuspension, à la suspension et à un contrôle salin.
- e) Évaluer la biodisponibilité de la nanosuspension dans un modèle murin.
- f) Développer un film oral qui réponde aux mêmes critères de qualité que la nanosuspension de nystatine.

## Chapitre 2 : Article Journal of Antimicrobial Chemotherapy

### 2.1 Résumé en français

**Objectifs:** Dans cette étude, nous avons développé une nanosuspension de nystatine et avons procédé à une évaluation comparative à la suspension de nystatine pour l'activité antifongique *in vitro* et *in vivo*.

**Méthodes:** Une nanosuspension de nystatine a été préparée à partir d'une suspension commercialement disponible en utilisant un procédé de nanobroyage humide. La nanosuspension a été caractérisée pour sa taille de particules par diffraction laser et sa teneur par HPLC. L'activité *in vitro* a été évaluée contre les souches de *C. albicans* SC5314 et LAM-1 (12.5 – 5000 µg/mL) en utilisant un essai sur Pétri d'agar et l'efficacité *in vivo* à l'aide d'un modèle murin de candidose oropharyngée. Brièvement, des souris DBA/2 étaient immunosupprimées avec de l'acétate de cortisone, puis infectées avec la souche de *C. albicans* LAM-1 et enfin traitées pendant 14 jours avec la suspension de nystatine, nanosuspension de nystatine ou un contrôle salin. L'efficacité a été évaluée en mesurant la charge fongique orale, la survie et l'histopathologie des organes. Une étude pharmacocinétique unidose a aussi été complétée.

**Résultats:** La médiane de la taille des particules de la suspension de nystatine a été diminuée de 6577 nm à 137 nm. L'essai HPLC de la nanosuspension a démontré une teneur de 98.7%+0.8%. L'activité *in vitro* de la nanosuspension était supérieure à la suspension aux concentrations 100–5000 µg/mL. Dès le jour 3 du traitement, une charge fongique orale inférieure était observée dans le groupe de la nanosuspension par rapport aux groupes de la suspension et du contrôle. La survie des souris était aussi supérieure dans le groupe nanosuspension. Aucune absorption systémique n'était observée.

**Conclusion:** Pris dans leur ensemble, ces données démontrent que la nanonisation de la nystatine représente une nouvelle approche pour augmenter l'efficacité du traitement de la candidose oropharyngée.

## 2.2 Title page

Nystatin nanosizing enhances *in vitro* and *in vivo* antifungal activity against *Candida albicans*

Alexandre Melkoumov<sup>1</sup>, Mathieu Goupil<sup>2</sup>, Fatiha Louhichi<sup>3</sup>, Martine Raymond<sup>3</sup>, Louis de Repentigny<sup>2</sup> and Grégoire Leclair<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, H3C 3J7 Montreal, Canada; <sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, H3C 3J7 Montreal, Canada; <sup>3</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, H3C 3J7 Montreal, Canada

\*Corresponding author. Tel: [REDACTED]; Fax: [REDACTED]; E-mail:

[REDACTED]

Received 23 January 2013; returned 14 February 2013; revised 18 March 2013; accepted 22 March 2013, J Antimicrob Chemother: doi:10.1093/jac/dkt137

## 2.3 Introduction

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is a common human fungal infection characterized by an overgrowth of *Candida* species in the superficial epithelium of the oral mucosa.<sup>1,2</sup> The vast majority of these infections are caused by *Candida albicans*. Immunocompromised patients, including those with HIV infection or cancer, are at enhanced risk of OPC.<sup>2-4</sup> In addition, OPC can be triggered in healthy patients by transient risk factors such as antibiotic or corticosteroid treatment.<sup>5</sup> The infection can be complicated by oesophageal candidiasis and, in the worst cases, fungal septicaemia.<sup>1</sup> Although it is infrequent, disseminated candidiasis has a mortality rate of 47%.<sup>4,6</sup>

Nystatin and fluconazole are the most widely employed antifungal agents in the treatment of OPC. Nystatin is a polyene antifungal that possesses excellent in vitro fungicidal activity against *C. albicans spp.*<sup>7</sup> Kovacic and Cooksy<sup>8</sup> suggested that the mechanism of action of polyene antifungals is 2-fold. Firstly, polyenes bind to ergosterol, a component of *C. albicans* membranes, resulting in the formation of transmembrane pores, leakage of ions and sequestration of ergosterol. Secondly, induction of oxidative stress and damage also contribute to polyene antifungal activity.<sup>8,9</sup>

Poorly soluble nystatin is formulated as a suspension that patients swoosh and swirl in their buccal cavity, and either spit out or swallow.<sup>10,11</sup> The drug is not bioavailable after oral administration and is eliminated in the faeces.<sup>10</sup> Nystatin suspension has few side effects and no drug interactions have been reported;<sup>10</sup> hence it remains a treatment of choice.<sup>11</sup> Topical administration of nystatin provides sufficient efficacy in treating OPC in immunocompetent patients. However, the clinical cure rate of oral candidiasis in immunocompromised HIV patients is only 52%, compared with 87% for fluconazole.<sup>12</sup> Fluconazole, a systemically acting triazole antifungal, can cause adverse effects – including hepatic enzyme elevation and drug interactions



– by inhibiting human cytochrome P450.<sup>13,14</sup> In addition, cases of resistance to polyene drugs such as nystatin are very rare, while continuous fluconazole therapy may lead to azole resistance in *C. albicans*.<sup>15,16</sup>

Nanosizing is an attractive and novel approach to improving the efficacy of nystatin. Several marketed products incorporate this technology to improve the oral bioavailability of poorly soluble drugs.<sup>17,18</sup> A limited number of studies have been conducted to assess the *in vivo* antimicrobial activity of nanoformulations of amphotericin B, a polyene antifungal structurally similar to nystatin.<sup>17–20</sup> Interestingly, these studies demonstrated enhanced efficacy of amphotericin B nanoformulations in murine models of visceral leishmaniasis, amoebic encephalitis, cryptococcal meningitis, and pulmonary and disseminated aspergillosis. Other studies, using an agar plate assay, have demonstrated increased *in vitro* bactericidal activity of silver nanoparticles.<sup>21–23</sup> No study has been conducted to evaluate the efficacy of polyene nanosuspensions on infections with *Candida spp.*

Nystatin exerts its effect when it comes into direct contact with *Candida* after topical application. When administered as an oral suspension, it is rapidly cleared by saliva.<sup>24</sup>

Mucoadhesive formulations have therefore been developed in an attempt to prolong contact with the oral mucosa.<sup>25,26</sup> However, the tolerability of such formulations, especially among the paediatric population, has yet to be demonstrated. Furthermore, nystatin produces a biologically significant post-antifungal effect (PAFE).<sup>27</sup> Indeed, 30 min exposure of *C. albicans* to nystatin at 25%– 100% of the MIC will cause a PAFE of 5–6 h.<sup>28</sup> Based on previous reports on amphotericin B and silver nanoparticles, we hypothesized that nanosizing would improve the efficacy of nystatin suspension. Here, we show that nanosized nystatin produces superior *in vitro* growth inhibition of *C. albicans* compared with conventional nystatin suspension, and is more efficacious in the treatment of experimental OPC in immunocompromised mice.

## 2.4 Materials and methods

### Materials and Candida strains

Nystatin oral suspension USP was obtained from Pharmascience Inc. (Montreal, Canada; PMS-Nystatin, 100000 IU/mL, Lot 420122). Nystatin USP powder was purchased from Medisca Inc. (Montreal, Canada, Lot 29303/M). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All solvents were purchased from Laboratoire Mat (Montreal, Canada). Chemicals and solvents were used without further purification. Sterile calcium alginate-tipped applicators (Calgiswabs) were purchased from Puritan (Guilford, ME, USA). Unless otherwise specified, water was first distilled and purified using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). *C. albicans* strain SC5314 was originally isolated from a patient with disseminated candidiasis, and served as reference for the *C. albicans* genome sequencing project.<sup>29,30</sup> *C. albicans* strain LAM-1 (serotype A) was originally isolated from the blood of a patient with systemic candidiasis.<sup>31</sup>

### Preparation of nystatin nanosuspensions

Commercial nystatin oral suspension USP (60, 30 or 24 mL; 100000 IU/mL) was diluted as necessary with water (0, 30 or 36 mL) to final concentrations of 100000, 50000 or 40000 IU/mL in a final volume of 60 mL. The resulting suspension was wet milled with yttria-stabilized zirconia beads (0.8 mm, 144 mL) in a DynoMill ML (GlenMills, Clifton, NJ, USA) equipped with a 300 mL milling chamber (4 h, 2389 rpm, 5°C). Control suspensions were prepared by diluting the commercial nystatin oral suspension (30 mL) with water (30 mL) to a final concentration of 50000 IU/mL.

### Characterization of nanosuspensions

Suspensions were assayed for nystatin by HPLC (Prominence HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) as previously described.<sup>32</sup> Particle size distribution was analysed in water at 22°C by laser diffraction (LS 13 320, Beckman Coulter, Mississauga, Canada).

### ***In vitro* antifungal activity**

*C. albicans* cells were routinely grown at 30°C in yeast peptone dextrose (YPD; 1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% dextrose plus 2% agar for solid medium). *C. albicans* SC5314 cells were resuspended in liquid YPD medium to an OD<sub>600</sub> of 0.1, and 150 mL of the cell suspension was spread on YPD Petri dishes. Whatman 3 mm CHR paper discs were then placed on each dish, and 12.5 mL of nystatin suspension or nanosuspension was added on top of the discs. The plates were incubated at 30°C, and growth inhibition diameters were measured at 18, 24 and 48 h. Eight concentrations of nystatin (12.5–5000 µg/mL) were each replicated nine times. The same tests were also performed in triplicate using *C. albicans* strain LAM-1.

### **Efficacy in murine oral candidiasis**

Animal experiments were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal, and conducted as described.<sup>33</sup> Sixty male DBA/2 mice, 10 weeks old, were housed in sterilized individual cages equipped with air filter hoods, supplied with sterile water and fed with sterile mouse chow. Animals were immunosuppressed with cortisone acetate (225 mg/kg subcutaneously) on days 21, +1 and +3 of *C. albicans* inoculation.<sup>33</sup> Oral inoculation with *C. albicans* LAM-1, assessments for signs of morbidity, and longitudinal quantification of *C. albicans* in the oral cavities of individual mice were conducted as described previously.<sup>34</sup> Animals reaching predetermined morbidity endpoints were designated premortem and euthanized with ketamine. The animals were divided into three groups (n=20 per group): the first was treated with commercial nystatin suspension, the second with nystatin nanosuspension and the third with PBS as a negative control. Nystatin (80000 IU/kg in 0.1 mL PBS) or PBS (0.1 mL) was administered intra-orally twice daily for 14 days, beginning 1 day after oral inoculation of *C. albicans*. The suspension was topically administered into the oral cavity using a 1.0 mL syringe equipped with a gavage needle. The mice were immobilized during dosing in a supine position

without anaesthesia for 1 min, allowing the animals to 'gargle' the suspension and then swallow it. After completion of the 14 day treatment, the mice were monitored once daily to evaluate survival. In addition, to evaluate the extent of mucosal candidiasis and to assess the possible systemic spread of *C. albicans* in treated and untreated mice, histopathological examination of the tongue, kidneys and heart was performed on tissues harvested from mice (n=3 per group) reaching morbidity endpoints on day 10 after infection. Tissue sections were stained with haematoxylin, phloxine and safranin, or by the Gomori–Grocott methenamine silver procedure.

### **Drug absorption**

The extent of systemic absorption of nystatin after oral administration was evaluated using a fixed oral dose of 300000 IU/kg of nystatin nanosuspension (three mice) or of commercial nystatin suspension (two mice). Whole blood was collected 4 h post-dose, and nystatin was assayed by HPLC.<sup>32</sup>

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out using SPSS version 20.0 software (IBM, Chicago, IL, USA). For *in vitro* activity results, an unpaired two-tailed Student's t-test was used to determine statistical differences. Oral burdens of *C. albicans* were compared using a Welch one-way analysis of variance followed by a Games–Howell test for multiple comparisons of unequal variances. Kaplan–Meier modelling and a log-rank test were used to compare survival functions. P values for multiple comparisons were adjusted using the Bonferroni correction. A P value of  $\leq 0.05$  was considered significant.

## 2.4 Results

### Nanosuspension characterization

A nanosuspension is characterized by its particle size distribution. Ninety percent of the particles must be smaller than 400 nm ( $x_{90} < 400$  nm) and 50% of the particles must be smaller than 200 nm ( $x_{50} < 200$  nm).<sup>35</sup> As shown in Table 2.1, adequate nanosuspensions were obtained when the commercial product was milled at concentrations of 50000 and 40000 IU/mL. The relative nystatin content of the nanosuspensions, compared with before milling, was 98.7%±0.8%. The 50000 IU/mL nanosuspension was used to evaluate in vivo efficacy because it had the highest concentration of drug while still maintaining adequate particle size.

**Table 2. 1 Particle size distribution of nystatin formulations analysed by laser diffraction.**

Formulation/concentration (IU/mL)	Particle size (nm) <sup>a</sup>		
	$x_{10}$ <sup>b</sup>	$x_{50}$ <sup>c</sup>	$x_{90}$ <sup>d</sup>
Commercial suspension			
100000	1392 ± 303	6577 ± 2226	24897 ± 9318
Nanosuspension			
100000	88 ± 1	241 ± 3	794 ± 4
50000	75 ± 1	137 ± 1	365 ± 2
40000	96 ± 1	142 ± 3	237 ± 8

<sup>a</sup>Data are means ± standard deviations.

<sup>b</sup>Particle size corresponding to 10% of the cumulative undersize distribution.

<sup>c</sup>Median particle size (i.e. 50% of the particles are smaller and 50% of the particles are larger).

<sup>d</sup>Particle size corresponding to 90% of the cumulative undersize distribution.

### ***In vitro* antifungal activity**

Evaluating the *in vitro* activity of a novel formulation of an existing antifungal is a challenging task because current antifungal susceptibility testing methods focus on molecular activity.<sup>36</sup>

Antifungal susceptibility testing can be performed in liquid or on solid media.<sup>36,37</sup> A solid medium

method has previously been reported for the evaluation of the bactericidal activity of silver

nanoparticles.<sup>21–23</sup> Nystatin's solubility (about 50 µg/mL) is higher than its MIC (about 2 µg/L).

Therefore, a liquid medium cannot be used because the required dilution would actually

dissolve the particles. No discrimination between the suspensions can be achieved once their

particles are dissolved into solutions. Consequently, *in vitro* activity was determined using an

agar plate assay. When tested against *C. albicans* SC5314, the nystatin nanosuspension

produced significantly greater growth inhibition diameters at concentrations ranging from 100

to 5000 µg/mL (Figure 2.2). At lower concentrations (12.5–50 µg/mL) no growth inhibition of *C.*

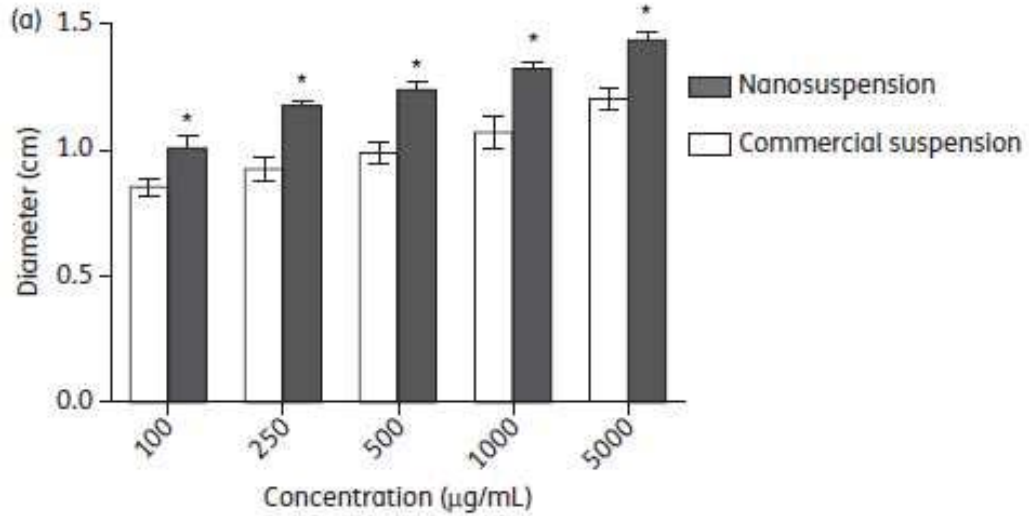
*albicans* was observed and therefore a comparison of the activity of the preparations could not

be made (Figure 2.3). Increases in growth inhibition diameters were not proportional to

increasing nystatin concentrations, consistent with the agar plate assays. Similar results were

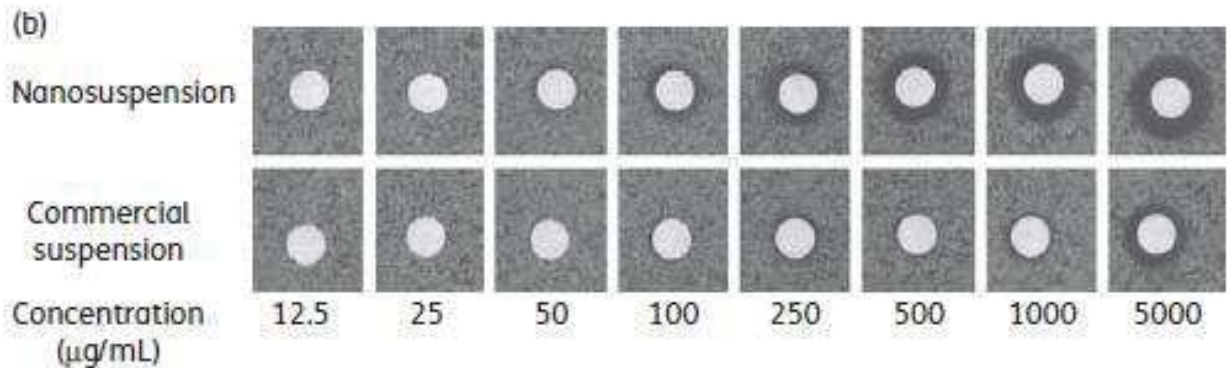
obtained using *C. albicans* strain LAM-1 (data not shown).

**Figure 2. 1** Growth inhibition diameters of *C. albicans* strain SC5314 incubated at 30°C for 18h in the presence of nystatin nanosuspension or commercial suspension.



Data represent means ± standard deviations of nine independent observations. No growth inhibition was detected at concentrations < 100 mg/L (not shown). \**P* < 0.05 compared with commercial nystatin suspension

**Figure 2. 2** Representative examples of growth inhibition of *C. albicans* strain SC5314 at the indicated concentrations of nystatin nanosuspension or commercial suspension.



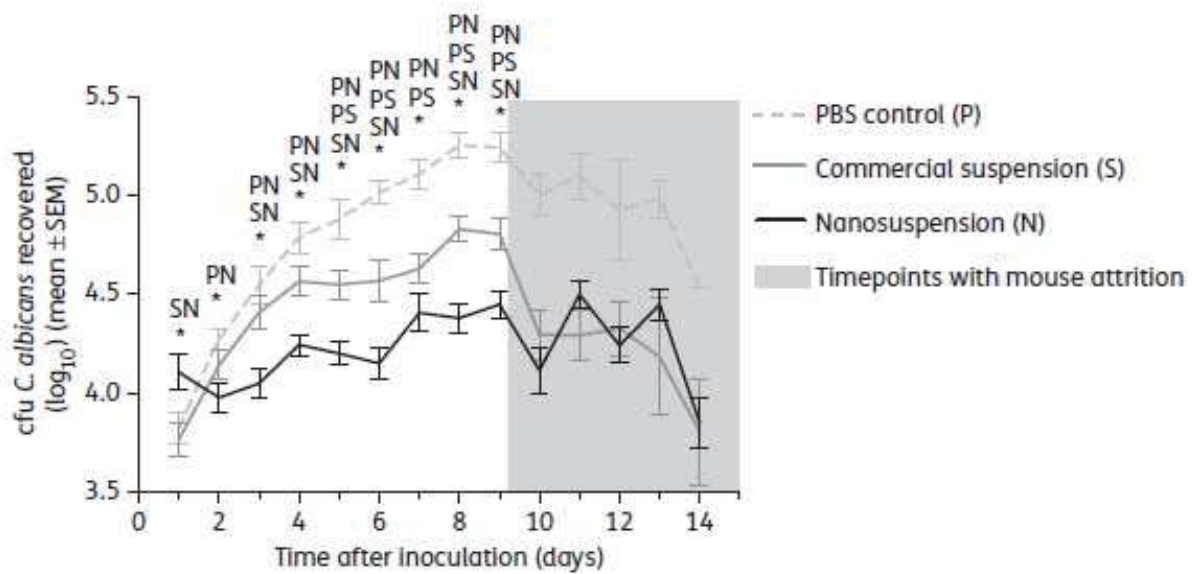
### ***In vivo* efficacy**

At day 2 after oral inoculation of *C. albicans*, one day after beginning treatment, the nystatin nanosuspension significantly reduced the oral burden of *C. albicans* compared with the PBS control (Figure 2.3). This early response to treatment was not observed with the commercial nystatin suspension. Indeed, a significant reduction in oral *C. albicans* burden in response to commercial nystatin suspension was delayed to the fifth day of treatment (Figure 2.3).

Afterwards, both treatments were statistically superior to PBS through to day 9 of treatment, after which statistical analysis of *C. albicans* oral burdens was not performed due to mouse attrition. Of particular interest, the nystatin nanosuspension was significantly more efficacious than the commercial suspension in reducing the oral burden of *C. albicans* on treatment days 3, 4, 5, 6, 8 and 9 (Figure 2.3). Mice were assessed for survival, and survivors were euthanized 32 days after oral inoculation of *C. albicans* (Figure 2.4). Mice treated with the nystatin nanosuspension had improved survival compared with animals receiving commercial nystatin suspension ( $P = 0.003$ ) or PBS ( $P < 0.001$ ). Although mice treated with the commercial nystatin suspension showed lower survival than those treated with the nanosuspension, their survival was nevertheless significantly enhanced compared with untreated PBS controls ( $P = 0.03$ ) (Figure 2.4).

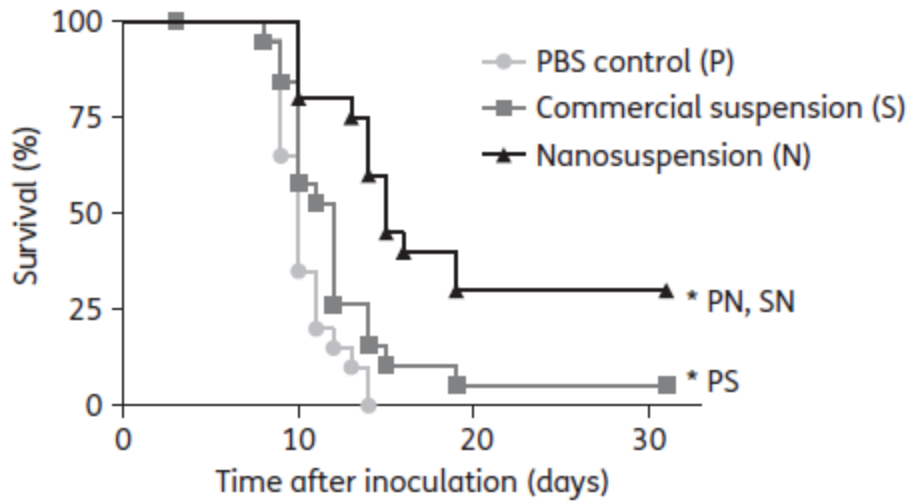


Figure 2. 3 Oral burdens of *C. albicans* strain LAM-1 in DBA/2 mice.



Animals were immunosuppressed with cortisone acetate on days -1, +1 and +3 of oral *C. albicans* inoculation, and treated intra-orally twice daily with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control, beginning one day after inoculation. Mouse attrition began after the day +9 assessment, and statistical analysis was not performed after this timepoint. \* $P < 0.05$  for the following comparisons. PN, PBS control versus nystatin nanosuspension; PS, PBS control versus commercial suspension; SN commercial suspension versus nystatin nanosuspension.

Figure 2. 4 Survival of DBA/2 mice after oral inoculation of *C. albicans* strain LAM-1.



Twenty mice per group were treated intra-orally twice daily with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control, beginning one day after inoculation. \* $P < 0.05$  for the following comparisons: PN, PBS control versus nystatin nanosuspension; PS, PBS control versus commercial suspension; SN commercial suspension versus nystatin nanosuspension.

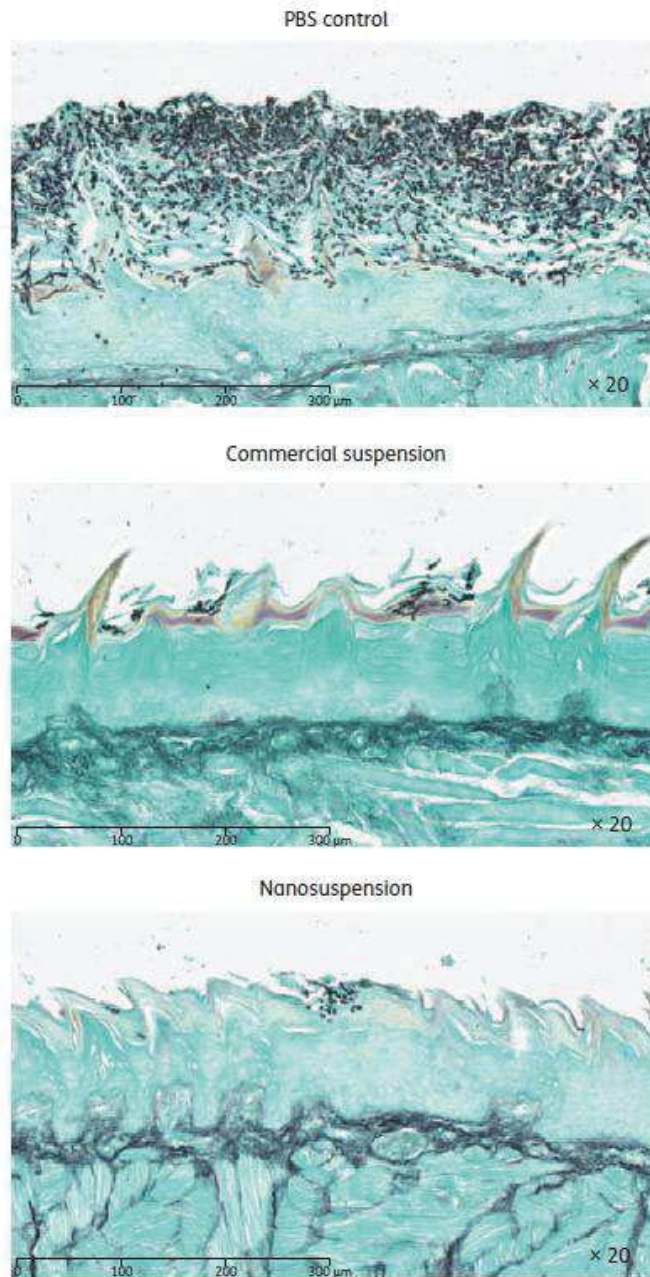
### **Histopathology**

Untreated control mice consistently displayed extensive candidal infection of the stratified squamous epithelium of the entire dorsum of the tongue, accompanied by an abundant inflammatory cell infiltrate (Figure 2.5). In contrast, in mice treated with either commercial nystatin or nystatin nanosuspension, the density of *Candida* hyphae in the epithelium was sharply diminished, and, in limited areas, hyphae were entirely absent (Figure 2.5). At necropsy, typical *Candida* microabscesses indicative of systemic dissemination were uniformly observed on the surface of the kidneys and heart of all mice, treated or not with either of the nystatin formulations. However, fewer microabscesses (0–5) were observed on tissue sections of these organs harvested from mice treated with either the commercial nystatin suspension or the nanosuspension, compared with untreated controls (>10). It was not possible to discern commercial nystatin from the nanosuspension due to the qualitative nature of histopathology.

### **Drug absorption**

Nystatin was not detected in whole blood (limit of detection: 1 IU/mL) of mice 4 h after administration of a massive single oral dose of 300000 IU/kg of commercial nystatin or nystatin nanosuspension.

**Figure 2. 5 Histopathology of oral candidiasis in DBA/2 mice treated with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control.**



Tissues were stained with Gomori–Grocott methenamine silver. Assessments were performed at day 10 after inoculation with *C. albicans*, and images are representative of three mice per group with consistent results.

## 2.5 Discussion

Nystatin nanosuspensions were obtained by high-energy wetmedia milling. The process was simple owing to the few steps required. In addition, no additional ingredients were needed when milling the commercial product. However, it was necessary to dilute the commercial suspension with water to reduce viscosity and facilitate milling. At higher concentrations of nystatin (100000 IU/mL), particle size was not sufficiently reduced even at a higher milling speed. Nystatin assays demonstrated no degradation of the active pharmaceutical ingredient during the milling process, which can potentially occur during this procedure.

*In vitro* tests demonstrated greater diameters of growth inhibition of *C. albicans* in the presence of the nystatin nanosuspension compared with the commercial suspension. This increased activity could be explained by one or both of the following mechanisms: (i) particle size reduction facilitated the diffusion on or within the solid medium, resulting in the increased inhibition diameter; (ii) particle size reduction increased the specific surface area of the particles, increasing the intrinsic particle activity of the drug.

Evaluating antifungal efficacy *in vivo* is also potentially challenging because of the limited number of clinically relevant animal models of oral candidiasis suitable for this purpose.<sup>3,33,34,38,39</sup>

No animal model has been used to compare two oral formulations of nystatin. DBA/2 mice immunosuppressed with cortisone acetate were used in this study. These mice are deficient in complement component 5 (C5) and are susceptible to infection with *C. albicans*. Indeed, it has been shown that DBA/2 mice develop greater oral colonization with *C. albicans* than BALB/c mice (not C5 deficient).<sup>40,41</sup> Although DBA/2 mice are susceptible to *C. albicans* oral colonization they are nevertheless able to clear the infection after 1 week.<sup>41</sup> The mice were therefore immunosuppressed with cortisone acetate to prolong oral carriage of *C. albicans*, thus providing a clinically relevant time course for assessment of antifungal efficacy.<sup>33</sup>

In vivo assessment showed superior efficacy of the nystatin nanosuspension in reducing the oral burden of *C. albicans*. The nanosuspension significantly reduced the oral burden of *C. albicans* as early as 24 h after starting treatment, in contrast to the fifth day of treatment for the commercial suspension, demonstrating a more rapid onset of the in vivo response to treatment. In addition, the nystatin nanosuspension was consistently more efficacious than the commercial suspension in the reduction of fungal burden from day 3 to day 9 of treatment, with the exception of day 7. Increasing the statistical power of the study would most likely also produce a significant difference at this timepoint. Starting on day 10 after inoculation, mouse attrition precluded a meaningful statistical analysis of the oral burden of *C. albicans*. Therefore, mouse survival was used as an endpoint of in vivo efficacy from day 10 until the conclusion of the experiment.

Systemic candidiasis was not expected because it was not reported in a previously described model of OPC in mice immunosuppressed with cortisone acetate.<sup>33</sup> It is possible that the *C. albicans* LAM-1 strain is more virulent than the SC5314 and SANK51486 strains used in this previous study, and that the greater susceptibility of DBA/2 mice to *C. albicans* infection compared with ddY mice facilitated systemic dissemination. Mucosal invasion leading to systemic dissemination most likely occurred in the oral cavity, oesophagus or cardiac-atrium fold of the stomach.<sup>42,43</sup> Mice treated with the nanosuspension had improved survival compared with those treated with the commercial suspension or PBS. This improved survival probably resulted from a greater reduction of *Candida* burden at the mucosal portal of entry in the oral cavity and gastrointestinal tract, because we found that the nystatin nanosuspension is not absorbed after oral administration. This observed reduction in mortality provides a foundation for investigating the potentially added value of antifungal prophylaxis with nystatin nanosuspension in susceptible hosts such as allogeneic haematopoietic stem cell transplant

recipients or those undergoing intensive remission- induction or salvage-induction chemotherapy for acute leukaemia, who routinely receive systemic antifungal prophylaxis against *Candida* infection.

Assessment of absorption following oral administration of the nystatin formulations was performed. Commercial nystatin suspension is not bioavailable due to poor solubility and permeability, and no a priori evidence suggested that nanosizing nystatin would result in systemic absorption. Indeed, nanosizing is only used to improve the bioavailability of poorly soluble but permeable drugs. Nevertheless, a pharmacokinetic study was performed because systemic absorption of nystatin in its nanosized formulation, if present, could lead to renal toxicity. No detectable absorption was found after oral administration of a single massive dose of 300000 IU/kg. By comparison, a dose of 80000 IU/kg was used during the in vivo efficacy study. In conclusion, nanosizing provides a promising approach to increasing the efficacy of topically administered nystatin in the treatment of OPC. This novel application of nanomilling could lead to the development of improved formulations of other antimicrobial agents.

## 2.6 References

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002; 78: 455–9.
2. Gonzalez Gravina H, Gonzalez de Moran E, Zambrano O et al. Oral candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12: E419–23.
3. de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 729–59.
4. Spellberg B. Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS Pathog* 2008; 4: e38.
5. Lopez-Martinez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol* 2010; 28: 178–84.
6. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; 20: 485–506.
7. Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Tur C et al. In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 397–401.
8. Kovacic P, Cooksy A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. *Med Chem Commun* 2012; 3: 274–80.
9. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol* 2012; doi:10.3389/fmicb.2012.00286.
10. Ratiopharm. Product Monograph (ratio-Nystatin). 2001; G50–G5.



11. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 48: 503–35.
12. Pons V, Greenspan D, Lozada-Nur F et al. Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 1204–7.
13. Depont F, Vargas F, Dutronc H et al. Drug-drug interactions with systemic antifungals in clinical practice. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007; 16: 1227–33.
14. Lee JW, Seibel NL, Amantea M et al. Safety and pharmacokinetics of fluconazole in children with neoplastic diseases. *J Pediatr* 1992; 120: 987–93.
15. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010; 98: 15–25.
16. Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR et al. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 515–24.
17. Kayser O, Olbrich C, Yardley V et al. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm* 2003; 254: 73–5.
18. Lemke A, Kiderlen AF, Petri B et al. Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against *Balamuthia mandrillaris* amebas. *Nanomedicine* 2010; 6: 597–603.
19. Italia JL, Sharp A, Carter KC et al. Peroral amphotericin B polymer nanoparticles lead to comparable or superior in vivo antifungal activity to that of intravenous Ambisome(R) or Fungizone. *PLoS One* 2011; 6: e25744.

20. Xu N, Gu J, Zhu Y et al. Efficacy of intravenous amphotericin B-polybutylcyanoacrylate nanoparticles against cryptococcal meningitis in mice. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 905–13.
21. Bin Ahmad M, Lim JJ, Shameli K et al. Antibacterial activity of silver bionanocomposites synthesized by chemical reduction route. *Chem Cent J* 2012; 6: 101.
22. Dal Lago V, Franca de Oliveira L, de Almeida Goncalves K et al. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. *J Mater Chem* 2011; 21: 12267–73.
23. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; 16: 2346–53.
24. Flynn PM, Cunningham CK, Kerkering Tet al. Oropharyngeal candidiasis in immunocompromised children: a randomized, multicenter study of orally administered fluconazole suspension versus nystatin. The Multicenter Fluconazole Study Group. *J Pediatr* 1995; 127: 322–8.
25. Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: ‘in vivo’ evaluation of the biopharmaceutical performance. *J Pharm Sci* 2009; 98: 1871–6.
26. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH et al. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm* 2007; 336: 263–8.
27. Campos FF, Calpena Campmany AC, Delgado GR et al. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: Ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci* 2012; 101: 3739–52.
28. Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ et al. In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2887–90.

29. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 1984; 198: 179–82.
30. Jones T, Federspiel NA, Chibana H et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7329–34.
31. Lacasse M, Fortier C, Trudel L et al. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med* 1990; 19: 136–41.
32. Groll AH, Mickiene D, Werner K et al. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 735: 51–62.
33. Solis NV, Filler SG. Mouse model of oropharyngeal candidiasis. *Nat Protoc* 2012; 7: 637–42.
34. de Repentigny L, Lewandowski D, Aumont F et al. Oral mucosal cell response to *Candida albicans* in transgenic mice expressing HIV-1. *Methods Mol Biol* 2009; 470: 359–68.
35. Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol* 2008; 36: 43–8.
36. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Third Edition: Approved Standard M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M44-A2. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2004.
38. Kamai Y, Kubota M, Kamai Y et al. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 3195–7.

39. Matsubara VH, Silva EG, Paula CR et al. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis* 2012; 18: 260–4.
40. Ashman RB, Papadimitriou JM, Fulurija A et al. Role of complement C5 and T lymphocytes in pathogenesis of disseminated and mucosal candidiasis in susceptible DBA/2 mice. *Microb Pathog* 2003; 34: 103–13.
41. Chakir J, Cote L, Coulombe C et al. Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9: 88–94.
42. Radovanovic I, Mullick A, Gros P. Genetic control of susceptibility to infection with *Candida albicans* in mice. *PLoS One* 2011; 6: e18957.
43. de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS et al. Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002; 185: 1103–14.

## **Chapitre 3: Pellicule pour administration orale**

### **3.1 Objectif**

Développer un film oral qui réponde aux mêmes critères de qualité que la nanosuspension de nystatine.

### **3.2 Création de pellicules orales à base d'hydroxypropylcellulose**

#### **Sommaire**

La création de pellicules médicamenteées présente de nombreux défis. Dans notre cas, il est nécessaire que la pellicule possède une texture adéquate, que le principe actif ne présente aucune dégradation, et que la pellicule redispersée dans l'eau conserve une distribution de taille nanométrique. Le mélange de polymères et la technique utilisée pour former la pellicule doivent donc tenir compte de tous ces aspects.

Pour une première expérience, nous avons procédé à des tests préliminaires avec le polymère principal de notre pellicule : l'hydroxypropylcellulose (HPC). Ce polymère a été choisi car il a la capacité de produire une pellicule et il est utilisé comme stabilisant stérique dans la nanosuspension. La concentration de ce polymère a été variée afin d'obtenir la meilleure texture de pellicule. Par ailleurs, le surfactant dodécylsulfate de sodium (SDS) a été ajouté, car ce dernier est utilisé comme stabilisant ionique de la nanosuspension.

#### **Méthode**

Les pellicules orales sont faites à partir de la technique de moulage. L'HPC et le SDS sont solubilisés dans l'eau, puis ce mélange est coulé sur une plaque de teflon. Le tout est séché au four pendant 4 h à 60°C jusqu'à obtention d'un poids constant de la pellicule. Plusieurs concentrations d'HPS et SDS ont été évaluées (tableau 3.1).

## Résultats et discussion

Il faut noter que pour obtenir une pellicule avec une texture adéquate, il fallait utiliser une concentration d'au moins 2.5% d'HPC dans l'eau. De plus, lorsque le surfactant SDS était rajouté, il était nécessaire d'avoir au moins 5% d'HPC (tableau 3.1). En effet, le SDS étant un surfactant, créait des bulles dans la pellicule ce qui causait des pores et des trous. Il fallait donc rajouter plus de polymère pelliculant (HPC).

**Tableau 3. 1 Compte-rendu des expériences sur des pellicules à base d'HPC**

#	% HPC dans eau	% de SDS dans eau	Qualité pellicule (film)
1	5%	0	Bonne
2	2.5%	0	Bonne
3	1%	0	Pauvre – film ne se forme pas
4	1%	0.04%	Très pauvre – film ne se forme pas
5	1%	0	Pauvre – film ne se forme pas
6	2.5%	0	Bonne
7	5%	0	Bonne
8	10%	0	Moyenne - friable
9	2.5%	0.04%	Moyenne - friable
10	5%	0.04%	Bonne
11	10%	0.04%	Bonne

### 3.3 Création de pellicules orales avec nystatine sans nanobroyage

#### Sommaire

Après l'expérience sur les pellicules contenant que de l'HPC, la prochaine étape était de rajouter la nystatine dans la pellicule. Cette étape est importante puisqu'il est nécessaire d'observer

l'effet que le médicament aura sur la texture de la pellicule. Plusieurs études démontrent que le principe actif affecte la texture de la pellicule<sup>20</sup>. De plus, il était intéressant de voir si la nystatine non broyée se redistribuera uniformément dans la pellicule.

### Résultats et discussion

En ajoutant la nystatine, la pellicule devenait plus rigide et plus friable (tableau 3.2). Donc, il était nécessaire de rajouter un plastifiant afin que la pellicule possède une texture adéquate. De plus, la nystatine non broyée se redistribuait d'une façon non homogène dans la pellicule. Ceci pourrait représenter un avantage potentiel de la nanosuspension.

**Tableau 3. 2 Compte-rendu des expériences sur des pellicules avec nystatine sans nanobroyage**

#	% Nystatine dans eau	% HPC dans eau	% SDS dans eau	Qualité pellicule
12	2 %	2.5 %	0.04 %	Bonne*
13	2 %	5 %	0.04 %	bonne + friable que sans drogue*

\* la nystatine ne se distribue pas uniformément dans la pellicule

## 3.4 Création de pellicules orales avec la nanosuspension de nystatine

### Sommaire

Nous avons produit des pellicules de nystatine en utilisant une nanosuspension de nystatine. Afin d'obtenir une pellicule adéquate, il fallait ajouter du HPC et un plastifiant tel le sorbitol, mannitol ou PEG400.

### Méthode

100000 UI de la nanosuspension en volume était prélevées. Puis, l'HPC et le plastifiant était rajouté au besoin. Ce mélange était coulé sur une plaque de teflon et on séché au four pendant

4 h à 60 ou 30°C. Une fois la pellicule obtenue, elle était redispersé dans de l'eau Milli-Q température pièce. Ce mélange était passé au vortex pendant 10 minutes, jusqu'à dispersion complète des agrégats. Puis, l'analyse de taille des particules était complétée au LD.

### **Résultats et discussion**

D'après les expériences du tableau 3.3, il est possible d'avancer certaines hypothèses quant aux polymères et aux proportions nécessaires pour créer une pellicule orale de nystatine. Tout d'abord, la concentration idéale d'HPC était de 5% dans le mélange total. De plus une concentration de 10% de SDS provoquait des trous dans la pellicule. Par la suite, l'ajout du plastifiant sorbitol était nécessaire pour donner une meilleure texture à la pellicule. La proportion devait être au moins de 1 pour 10 de plastifiant par rapport au polymère (HPC).

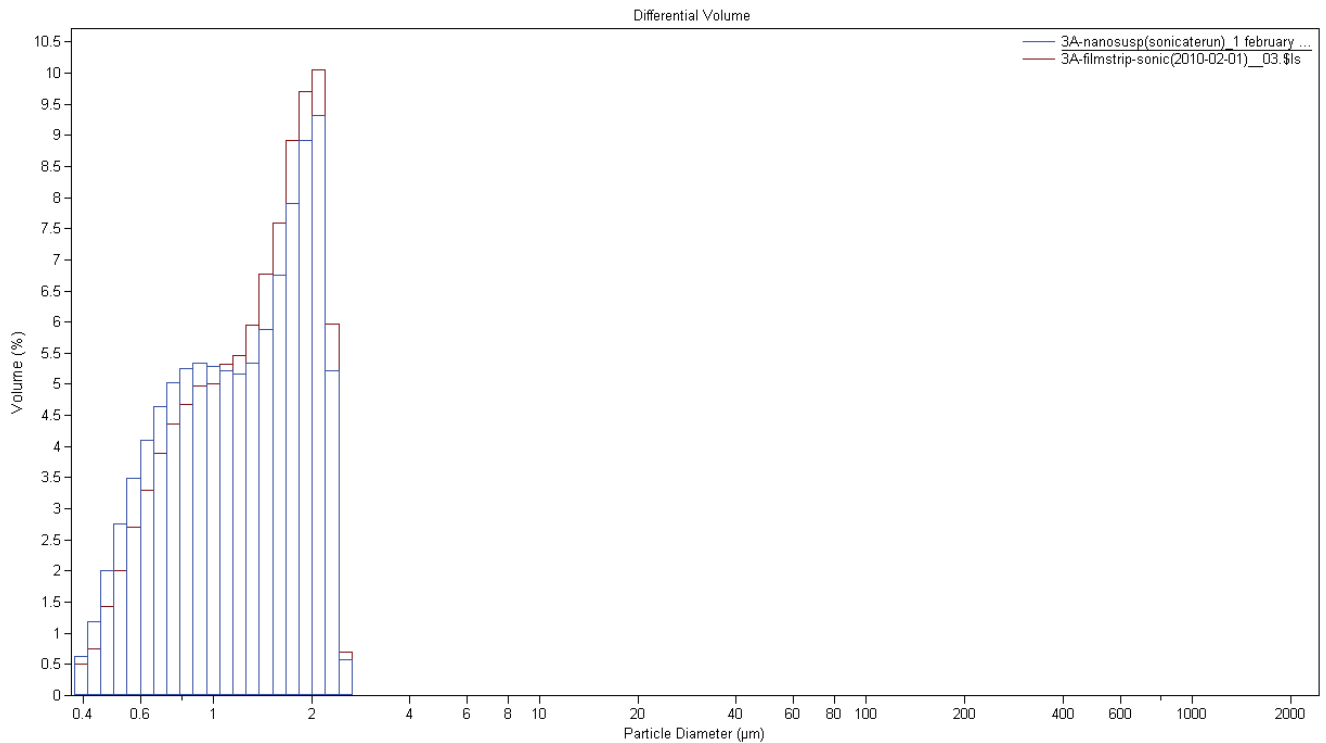
Par ailleurs, pour la technique de production de pellicule, il a été remarqué qu'il fallait effectuer un broyage de 24hrs après avoir ajouter l'HPC (5% du mélange total) et le plastifiant. En effet, le  $d_{90}$  augmentait à plus de 20  $\mu\text{m}$  après l'ajout de ces derniers (solubilisation incomplète probablement). De plus, un séchage à 60°C produisait une bonne texture de pellicule mais causait une agglomération substantielle des particules. Par contre, un séchage à 30 °C produisait une texture adéquate de la pellicule et permettait aussi de préserver la distribution de taille de la nanosuspension tel qu'analysé par diffraction laser.



**Tableau 3. 3 Compte-rendu des expériences sur des pellicules avec une nanosuspension de nystatine**

#	HPC (% total)	SDS (% du PA)	Plastifiant	d90 (µm) après reconstitution	Qualité de la pellicule
0A	2.5%	2%	-	-	moyenne / film cassant
0B	5%	2%	0.0600 g peg400	-	film ne se forme pas
0B	5%	2%	0.0700 g sorbitol	-	moyenne / film mou
1A	5%	10%	0.03218 g sorbitol	-	trous dans film
1C	5%	2%	0.01572 g sorbitol	>20	bon film / bonne plasticité
2B	5%	2%	0.0240 g sorbitol	d90 de 1.820 µm mais après séchage à 60°C créer film d90 = >20 µm	bon film / bonne plasticité
3A	5%	1%	0.02394 g mannitol	d90 de 2.199 µm. Après séchage à 30°C similaire d90 (Figure 3.1).	bon film / bonne plasticité

**Figure 3. 1 Distribution de taille de la nanosuspension 3A (bleu) et sa pellicule (rouge)**



\* À noter que dans la nanosuspension 3A, on a utilisé seulement 1% de surfactant par rapport au PA, d'où une distribution de taille supérieure à la moyenne. Par contre, n'l y a presque aucune agglomération de particules quand la nanosuspension est comparé à la pellicule.

### Conclusion

Il a été possible de produire une pellicule de 100000 UI de nystatine avec une texture adéquate, et qui conservait sa taille de particules après redispersion dans l'eau. Par contre, il sera nécessaire de conduire des tests de stabilité à long terme, analyser les propriétés tensiles à l'aide d'un texture analyzer et, conduire des tests de dissolution afin d'adéquatement caractériser la pellicule. Par la suite, il sera intéressant d'évaluer l'efficacité de la nanosuspension comparativement à la pellicule orale sur un modèle *in vitro*, puis *in vivo*.

## Chapitre 4 : Conclusion

Il a été démontré que le nanobroyage peut être utilisé pour améliorer l'efficacité antifongique d'une formulation topique. Ceci est une nouveauté en soit, car le nanobroyage est habituellement réservé pour augmenter l'absorption intestinale de médicaments peu solubles. De plus, il a été démontré que la réduction de taille de particules a un impact sur l'efficacité d'une formulation topique. Les objectifs de recherche ont donc été atteints :

### 1) Développer une méthode afin d'obtenir une nanosuspension de nystatine.

Une nanosuspension a été obtenue en utilisant le procédé de broyage humide à haute vitesse. La taille des particules a été réduite de 6577 à 137 nm. La distribution de taille était uniforme.

### 2) Développer une méthode analytique pour évaluer la qualité de la nanosuspension obtenue.

Une méthode CLHP à gradient a été développée pour quantifier la nystatine. Une courbe de calibration de 5 points a été obtenue en utilisant des concentrations de 40 à 400 UI/mL en utilisant de la nystatine solubilisée dans du méthanol. On a observé une teneur de  $98.7\% \pm 0.8\%$  et donc aucune dégradation n'était observée.

### 3) Développer des méthodes d'évaluation *in vitro* pour comparer l'activité de la nanosuspension à celle de la suspension.

L'évaluation de l'activité *in vitro* a été faite par des essais de diffusion sur agar YPD.

L'activité de la nanosuspension était comparée à la suspension sur 2 souches de *C. albicans* différentes (SC5314 et LAM-1) sur 8 concentrations différentes de 12.5 à 5000 µg/mL. L'activité *in vitro* de la nanosuspension était supérieure aux concentrations 100 à 5000 µg/mL.

**4) Comparer l'efficacité *in vivo* de la nanosuspension, à la suspension et à un contrôle salin.**

Dès le 3ème jour de traitement, la charge fongique des souris traitées avec la nanosuspension était inférieure à celle des souris traitées avec la suspension ou le contrôle. De plus, la survie des souris traitées avec la nanosuspension était supérieure à ces 2 groupes à la fin de l'étude.

**5) Évaluer la biodisponibilité de la nanosuspension dans un modèle murin.**

Aucune absorption systémique n'a été observée suite à l'analyse CLHP d'échantillons plasmatiques avec une limite de détection de 1 UI/mL et une limite de quantification de 3 UI/mL.

**6) Développer une pellicule de nystatine nanonisée avec une texture adéquate, qui une fois redispersée dans l'eau conserve sa distribution de taille des particules.**

Une pellicule de nystatine possédant une texture adéquate et préservant sa distribution de taille a été développée. Le mélange optimal de polymère était de 5% HPC, 1% SDS, 2% mannitol. La pellicule a été obtenue en utilisant une technique de moulage sur substrat inerte avec un séchage à 30°C.

Pour conclure, les résultats de ce projet pourraient contribuer à l'amélioration du traitement de la candidose oropharyngée. En effet, la nanoformulation de nystatine représente un nouveau traitement plus efficace pour le traitement de la candidose oropharyngée. De plus, le nanobroyage représente une façon simple, robuste et peu coûteuse de revaloriser la suspension de nystatine. Ce nouveau traitement pourrait réduire les coûts de la prise en charge de la candidose oropharyngée. Finalement, le procédé de nanobroyage pourrait être utilisé pour augmenter l'efficacité topique des composés antimicrobiens.

## Chapitre 5 : Travaux futurs et perspectives

### Travaux futurs et perspectives pour la nanosuspension de nystatine:

Il serait pertinent de faire des tests de stabilité (teneur, distribution de taille des particules) sur la nanosuspension de nystatine à différentes conditions (température, humidité, milieux biologiques) sur une durée prédéterminée (1 mois, 3 mois, 1 an). Des données préliminaires suggèrent une stabilité de deux semaines à 4°C pour la teneur et la distribution de taille des particules.

La nanosuspension de nystatine a démontré une efficacité supérieure dans un modèle murin de candidose oropharyngée. Il serait intéressant d'évaluer cette nanosuspension dans un modèle animal différent tel que chez le rat ou le singe. Par ailleurs, il serait possible de démontrer le mécanisme d'action des nanoparticules de nystatine dans un tissu infecté par le *Candida* en utilisant la fluorescence de la nystatine. On pourrait aussi utiliser cette approche pour comparer le mécanisme d'action aux microparticules. Enfin, si ces expériences démontrent des données prometteuses, une étude clinique pourrait être réalisée, car la nystatine possède une excellente innocuité. Cette formulation pourrait donc améliorer le traitement de la candidose oropharyngée.

### Travaux futurs et perspectives pour la pellicule de nystatine nanonisée :

Afin d'adéquatement caractériser la pellicule de nystatine, il serait nécessaire de conduire des tests de stabilité à long terme, analyser les propriétés tensiles à l'aide d'un analyseur de texture et, conduire des tests de dissolution. Par la suite, il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de la nanosuspension comparativement à la pellicule orale sur un modèle *in vitro*, puis *in vivo*. Cette formulation pourrait s'avérer une alternative pratique pour le traitement de la candidose oropharyngée.



## Références

1. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgraduate medical journal* 2002; 78: 455-9.
2. Gonzalez Gravina H, Gonzalez de Moran E, Zambrano O et al. Oral Candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* 2007; 12: E419-23.
3. CDC. Oral Candidiasis Statistics.
4. de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology reviews* 2004; 17: 729-59, table of contents.
5. Spellberg B. Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS pathogens* 2008; 4: e38.
6. Lopez-Martinez R. Candidosis, a new challenge. *Clinics in dermatology* 2010; 28: 178-84.
7. Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infectious disease clinics of North America* 2006; 20: 485-506.
8. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 48: 503-35.
9. Brajtburg J, Powderly WG, Kobayashi GS et al. Amphotericin-B - Current Understanding of Mechanisms of Action. *Antimicrob Agents Ch* 1990; 34: 183-8.
10. Kovacic P, Cooksy A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. *Medchemcomm* 2012; 3: 274-80.
11. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Microbiology* 2012; 3.

12. Ahmad A, Khan A, Manzoor N et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial pathogenesis* 2010; 48: 35-41.
13. Pons V, Greenspan D, Lozada-Nur F et al. Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1997; 24: 1204-7.
14. Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR et al. Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2002; 49: 515-24.
15. Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology / the Society of the Nippon Dental University* 2010; 98: 15-25.
16. Salazar J, Ghanem A, Muller RH et al. Nanocrystals: comparison of the size reduction effectiveness of a novel combinative method with conventional top-down approaches. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2012; 81: 82-90.
17. Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006; 62: 3-16.
18. Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicologic pathology* 2008; 36: 43-8.
19. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: a perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Advanced drug delivery reviews* 2011; 63: 427-40.



20. Muller RH, Gohla S, Keck CM. State of the art of nanocrystals--special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2011; 78: 1-9.
21. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews* 2011; 63: 456-69.
22. Lindfors L, Forssen S, Skantze P et al. Amorphous drug nanosuspensions. 2. Experimental determination of bulk monomer concentrations. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2006; 22: 911-6.
23. Lindfors L, Skantze P, Skantze U et al. Amorphous drug nanosuspensions. 1. Inhibition of Ostwald ripening. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2006; 22: 906-10.
24. Lindfors L, Skantze P, Skantze U et al. Amorphous drug nanosuspensions. 3. Particle dissolution and crystal growth. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2007; 23: 9866-74.
25. Ali HS, York P, Blagden N. Preparation of hydrocortisone nanosuspension through a bottom-up nanoprecipitation technique using microfluidic reactors. *International journal of pharmaceutics* 2009; 375: 107-13.
26. Zhang X, Xia Q, Gu N. Preparation of All-Trans Retinoic Acid nanosuspensions using a modified precipitation method. *Drug development and industrial pharmacy* 2006; 32: 857-63.
27. Lai F, Sinico C, Ennas G et al. Diclofenac nanosuspensions: influence of preparation procedure and crystal form on drug dissolution behaviour. *International journal of pharmaceutics* 2009; 373: 124-32.

28. Ding W. Micro/nanonisation du naproxène et du dipropionate de béclo méthasone en milieu aqueux par fragmentation laser femtoseconde. *Institut du génie biomédical*. Montréal: École Polytechnique de Montréal, 2011; 106.
29. Dixit RP, Puthli SP. Oral strip technology: overview and future potential. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2009; 139: 94-107.
30. Llabot JM, Palma SD, Manzo RH et al. Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *International journal of pharmaceutics* 2007; 336: 263-8.
31. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2008.
32. NCCLS. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A. Wayne, Pa.: National Committee for Clinical Laboratory Standards.. 2004.
33. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Molecular & general genetics : MGG* 1984; 198: 179-82.
34. Jones T, Federspiel NA, Chibana H et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 7329-34.
35. Lacasse M, Fortier C, Trudel L et al. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1990; 19: 136-41.
36. Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clinical microbiology reviews* 2001; 14: 398-429.
37. de Repentigny L. Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions. *Current opinion in microbiology* 2004; 7: 324-9.

38. Solis NV, Filler SG. Mouse model of oropharyngeal candidiasis. *Nature protocols* 2012; 7: 637-42.
39. Ashman RB, Papadimitriou JM, Fulurija A et al. Role of complement C5 and T lymphocytes in pathogenesis of disseminated and mucosal candidiasis in susceptible DBA/2 mice. *Microbial pathogenesis* 2003; 34: 103-13.
40. Chakir J, Cote L, Coulombe C et al. Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice. *Oral microbiology and immunology* 1994; 9: 88-94.
41. Matsubara VH, Silva EG, Paula CR et al. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral diseases* 2012; 18: 260-4.
42. Goel MK, Khanna P, Kishore J. Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *Int J Ayurveda Res* 2010; 1: 274-8.
43. Zager RA. Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 2000; 36: 238-49.
44. Sabra R, Branch RA. Amphotericin B nephrotoxicity. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience* 1990; 5: 94-108.
45. Laniado-Laborin R, Cabrales-Vargas MN. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26: 223-7.
46. Groll AH, Mickiene D, Werner K et al. High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 735: 51-62.

47. Groll AH, Just-Nuebling G, Kurz M et al. Fluconazole versus nystatin in the prevention of candida infections in children and adolescents undergoing remission induction or consolidation chemotherapy for cancer. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1997; 40: 855-62.
48. de Aguiar MM, de Albuquerque RP, Marinho DS et al. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. *Drug development and industrial pharmacy* 2010; 36: 594-600.