



HAL
open science

Aérosols nanométriques médicaux : Développement, caractérisation et cartographie de dépôt.

Iolanda Albuquerque

► **To cite this version:**

Iolanda Albuquerque. Aérosols nanométriques médicaux : Développement, caractérisation et cartographie de dépôt.. Médecine humaine et pathologie. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013EMSE0684 . tel-00834730

HAL Id: tel-00834730

<https://theses.hal.science/tel-00834730>

Submitted on 17 Jun 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



NNT : 2013 EMSE 0684

THÈSE

présentée par

Iolanda MOREIRA DUTRA ALBUQUERQUE E SILVA

pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Génie des Procédés

AEROSOLS NANOMÉTRIQUES MEDICAUX: DÉVELOPPEMENT, CARACTERISATION ET CARTOGRAPHIE DE DÉPÔT

soutenue à Saint Etienne le 13 mars 2013

Membres du jury

Président :	Jean-Michel VERGNON	PUPH, Université Jean Monnet, St-Etienne
Rapporteurs :	Patrice DIOT	PUPH, Université de Tours
	Bruno LOUIS	CR, Université Paris XII, Créteil
Examineurs :	Gilles CHANTREL	Ing, DTF, Saint-Etienne
	Laurent VECELLIO	Ing, Université de Tours
Directeurs de thèse :	Didier BERNACHE-ASSOLLANT	PU, Ecole des Mines de Saint-Etienne
	Francis DUBOIS	PUPH, Université Jean Monnet, St-Etienne
Co-encadrants :	Marc DURAND	PH, Chercheur associé, Université Jean Monnet, Saint-Etienne
	Jérémie POURCHEZ	CR, Ecole des Mines de Saint-Etienne

Spécialités doctorales :
 SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 IMAGE, VISION, SIGNAL
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables :
 K. Wolski Directeur de recherche
 S. Drapier, professeur
 F. Gruy, Maître de recherche
 B. Guy, Directeur de recherche
 D. Graillet, Directeur de recherche
 O. Roustant, Maître-assistant
 O. Boissier, Professeur
 J.C. Pinoli, Professeur
 A. Dolgui, Professeur

EMSE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BENABEN	Patrick	PR1	Sciences et génie des matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLLANT	Didier	PR0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean Pierre	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaid	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BORBELY	Andras	MR(DR2)		SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BURLAT	Patrick	PR2	Génie Industriel	FAYOL
COLLOT	Philippe	PR0	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR0	Génie des Procédés	DIR
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	CR	Image Vision Signal	CIS
DELAFOSSE	David	PR1	Sciences et génie des matériaux	SMS
DESRAYAUD	Christophe	PR2	Mécanique et ingénierie	SMS
DOLGUIT	Alexandre	PR0	Génie Industriel	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
FEILLET	Dominique	PR2	Génie Industriel	CMP
FOREST	Bernard	PR1	Sciences et génie des matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR0	Sciences et génie de l'environnement	DIR
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
GIRARDOT	Jean-jacques	MR(DR2)	Informatique	FAYOL
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	DR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HAN	Woo-Suck	CR		SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
INAL	Karim	PR2	Microélectronique	CMP
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
LI	Jean Michel		Microélectronique	CMP
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MONTHEILLET	Franck	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR2	Génie des Procédés	DFG
PIJOLAT	Christophe	PR0	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean Charles	PR0	Image Vision Signal	CIS
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)		FAYOL
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	CMP
TRIA	Assia		Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	MR(DR2)	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR1	Informatique	CIS
ENISE : Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)				
FORTUNIER	Roland	PR	Sciences et Génie des matériaux	ENISE
BERGHEAU	Jean-Michel	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
DUBUJET	Philippe	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
LYONNET	Patrick	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
SMUROV	Igor	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
ZAHOUANI	Hassan	PU	Mécanique et Ingénierie	ENISE
BERTRAND	Philippe	MCF	Génie des procédés	ENISE
HAMDI	Hédi	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
KERMOUCHE	Guillaume	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
RECH	Joël	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
TOSCANO	Rosario	MCF	Mécanique et Ingénierie	ENISE
GUSSAROV	Andrey	Enseignant contractuel	Génie des procédés	ENISE

PR 0	Professeur classe exceptionnelle	Ing.	Ingénieur
PR 1	Professeur 1 ^{ère} classe	MCF	Maître de conférences
PR 2	Professeur 2 ^{ème} classe	MR (DR2)	Maître de recherche
PU	Professeur des Universités	CR	Chargé de recherche
MA (MDC)	Maître assistant	EC	Enseignant-chercheur
DR	Directeur de recherche	IGM	Ingénieur général des mines

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
FAYOL	Institut Henri Fayol
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, le Pr. Didier Bernache, directeur adjoint chargé de la recherche de l'Ecole de Mines de Saint-Etienne pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je lui suis très reconnaissante pour la confiance et le temps qu'il m'a accordé.

Un amical remerciement à mon deuxième directeur de thèse, le Pr. Francis Dubois, chef du service de Médecine Nucléaire du CHU de Saint-Etienne, un *grand maestro* de la radioactivité et physique des aérosols, je tiens à le remercier pour la gentillesse qu'il a manifestée à mon égard durant cette thèse, pour ses sages conseils et pour sa sympathie.

J'adresse également mes remerciements à mon co-encadrant de thèse, Jérémie Pourchez, responsable du département de Biomatériaux et Particules Inhalées (BioPI), et à mon deuxième co-encadrant de thèse, Marc Durand, professeur et chef de la division de Chirurgie et d'Anesthésie au Centre Hospitalier de Puy en Velay.

Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse le Pr. Patrice Diot de l'Université de Tours et le Pr. Bruno Louis, de l'Université Paris XII pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

J'associe à ces remerciements le Pr. Jean-Michel Vergnon de Université Jean Monnet, Laurent Vecellio de l'Université de Tours et Gilles Chantrel de DTF pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens notamment à remercier Laurent Vecellio, un grand expert des aérosols, pour ses enseignements, sa disponibilité, ses conseils et sa sympathie, qui ont été essentiels pour la réussite de cette thèse.

J'adresse de sincères et chaleureux remerciements à toute l'équipe INSERM U1100-EA6305 de Tours pour m'avoir accueillie chaleureusement au sein de ses laboratoires. Un grand merci à Laurent, Déborah, Maria, Georges, Jérôme, Sandrine, Nicolas, Nabile, Michèle et tant d'autres collègues, pour leur expertise, leur sympathie et pour la bonne ambiance de toujours.

Je désire grandement remercier Françoise Bresson, pour sa constante attention, son agilité, sa franchise et sa gentillesse qui m'ont permis d'avancer plus rapidement dans les démarches de mon doctorat. Je la remercie vivement.

Un aimable remerciement à Anne-Marie Danna et Marie Claude Bartholin, pour m'avoir aidée et soutenue lors du travail au sein du laboratoire, pour leur expertise et technique et également pour leur remarquable gentillesse et empathie.

Je tiens à remercier amicalement tous les membres des équipes CIS et SPIN pour leur aide et leur bonne humeur. En particulier, aux amis du troisième étage, nous avons partagé de très bons moments ! Merci pour l'accueil chaleureux, notamment à Laetitia Patural et à Mélanie Pailleux, qui m'ont montré la vraie vie à la française...

Bien sûr, atteindre ces objectifs n'aurait pas été possible sans l'aide des membres de l'Ecole des Mines qui ont participé au projet ainsi que l'équipe de DTF qui a été fondamentale pour le développement de ce travail.

Je souhaite remercier ma chère coloc et amie Raquel Tavares, pour son enthousiasme, sa joie de vivre, sa culinaire gourmand... enfin pour son amitié et soutien. Je la remercie vivement !

J'adresse un chaleureux remerciement à Florence, pour son empathie et sa motivation, toujours accompagnée de son beau sourire. Merci beaucoup ma chère Florence !

Enfin, je ne pourrais pas finir sans remercier ceux qui ont toujours été là : ma famille aimée ! Tous mes aimables remerciements à mon Francisco, pour son soutien quotidien indéfectible sans lequel je n'en serais pas là aujourd'hui. Je remercie mes parents aimés et ma sœur Ana, ma *guru*, je les remercierai toujours pour leur enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général.

Muito obrigada,

Isolanda

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	7
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	10
1. LES NANOPARTICULES A VISEE PULMONAIRE	10
1.1. Les nanoparticules et le système respiratoire	10
1.2. Intérêt des aérosols nanométriques	14
2. LA GENERATION DES AEROSOLS	17
2.1. Généralités sur la physique des aérosols	17
2.2. Les différentes technologies de génération d'aérosol	19
3. LA GENERATION DES D' AEROSOLS SUBMICRONIQUES ET NANOMETRIQUES	25
3.1. Aérosols vectorisés sous forme de particules solides	29
3.2. Aérosols vectorisés sous forme de particules liquides	31
3.3. Aérosols radiomarqués	33
4. CARTOGRAPHIE DE DEPOT DES AEROSOLS SUBMICRONIQUES ET NANOMETRIQUES	40
4.1. Les mécanismes de dépôt	41
4.2. Les modèles de cartographie de dépôt	47
5. LA REPARTITION REGIONALE DU DEPOT DES AEROSOLS DANS LES VOIES AERIENNES	53
6. CONCLUSIONS ET OBEJCTIFS	54
II. MATERIEL ET METHODES	56
1. LES GENERATEURS D' AEROSOL	56
1.1. Aérosols vectorisés sous forme de particules nanométriques liquides	56
1.2. Aérosols vectorisés sous forme de particules nanométriques solides	58
2. LA METROLOGIE DES AEROSOLS	60
2.1. Mesure par Impacteur en Cascade à basse pression – ELPI	60
2.2. La granulométrie des aérosols générés par nébulisation	64
2.3. Granulométrie des aérosols radioactifs	66
2.4. Traitement des données de granulométrie	69
3. LA CARTOGRAPHIE DE DEPOT IN VIVO	73
3.1. Les manipulations in vivo	73
3.2. Le traitement de donnés de scintigraphie	75

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS	78
1.GENERATION DE RADIONANOTRACEURS A FAÇON	78
1.1.Résumé Introductif	78
1.2.Article accepté dans le <i>Journal of Aerosol Science</i> 55 (2013)1-11	80
2.GENERATION DE « NANOCARRIER » LIQUIDE A FAÇON	91
2.1.Résumé Introductif	91
2.2.Résultats et discussions.....	93
2.3.Conclusions.....	103
3.CARTOGRAPHIE DE DEPOT DE NANO-AEROSOL.....	105
3.1.Résumé Introductif	105
3.2.Article soumis en <i>Aerosol Science and Technology</i>	107
IV. CONCLUSIONS.....	131
V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133
ANNEXES	144
ANNEXE 1: METROLOGIE DES AEROSOLS - NORMATIVE EUROPEENNE (NF EN 13544-1).....	145
ANNEXE 2: MANUTENTION DE L'ELECTRODE DE L'IONOMETRE	149
ANNEXE 3 : METROLOGIE DES AEROSOLS RADIOACTIFS	151
ANNEXE 4 : UTILISATION DU GENERATEUR DE TECHNEGAS MODIFIE – OPERATION DES PARAMETRES DE GENERATION D'AEROSOL	154
ANNEXE 5 : CARTOGRAPHIE DE DEPOT DES AEROSOLS – METHODES DE TRAITEMENT D'IMAGE .	159

INTRODUCTION GENERALE

Une augmentation significative de l'incidence des pathologies respiratoires, telles que maladies pulmonaires obstructives chroniques (BPCO), l'asthme, les infections respiratoires et le cancer, a été observée au cours des dernières décennies. Dans l'Union européenne, la BPCO et l'asthme se placent comme la troisième cause de décès. Dans la majorité des cas, ces pathologies respiratoires peuvent être associées à l'augmentation de l'exposition des individus à des facteurs de risques, comme le tabac, la pollution de l'air. Ces pathologies sont de diagnostic tardif, avec des effets soudains, imprévisibles, voire mortels. De ce point de vue, les enjeux médicaux et le contexte socio-économique des maladies respiratoires sont d'une importance majeure à l'échelle mondiale.

Une approche pour combattre les maladies respiratoires est la compréhension de l'influence des facteurs extérieurs (tel que la pollution de l'air) sur le système respiratoire humain. Actuellement, la lutte contre ces maladies se situe dans le développement des procédures de prévention et des soins curatifs personnalisés, capables d'anticiper les diagnostics et de répondre rapidement et spécifiquement aux zones de traitement à cibler. A l'avenir, il est également envisageable que l'évolution de ces traitements aille vers des procédures mieux maîtrisées, mini-invasives et mieux-tolérées, visant à réduire les traumatismes et la durée des soins avec une diminution conséquente des coûts et de la morbidité.

Parmi les procédures mini-invasives classiques, l'aérosolthérapie se distingue par sa capacité à administrer des médicaments à traiter les pathologies locales, dans les voies respiratoires, comme les sinus ou la région pulmonaire mais aussi pour le traitement systémique de maladies dans des organes distants de l'appareil respiratoire, via la circulation sanguine.

En Aérosolthérapie, le dépôt des aérosols au niveau du tractus respiratoire est dépendant de la taille et de la vitesse des particules ainsi que des paramètres respiratoires et anatomiques du patient. En général, les particules micrométriques (de 1 à 10 μm) sont majoritairement déposées dans les voies aériennes supérieures, alors que les particules nanométriques (de 10 à 100 nm) se déposent de préférence dans la région alvéolaire (ICRP, 1994; Hinds, 1999). Les générateurs d'aérosols médicaux classiques produisent principalement des particules de l'ordre du

micromètre, qui résulte le plus souvent dans un dépôt majeur dans les voies aériennes supérieures (ORL). De ce fait, la taille micrométrique de ces particules peut représenter une limitation pour leur utilisation dans des traitements à visée pulmonaire exclusive. Les enfants qui possèdent des voies aériennes de plus petits diamètres que les adultes, il serait souhaitable que l'aérosol soit formé par des particules plutôt nanométriques afin de pouvoir traverser les segments proximaux des voies respiratoires.

L'utilisation des nanoparticules à visée pulmonaire a fait l'objet de grandes avancées ces dernières années, qui se traduisent par une augmentation régulière du nombre de publications scientifiques sur ce sujet. La petite taille de ces particules et leur comportement inertiel négligeable induisent un coefficient de diffusion très important. De cette façon, les aérosols nanométriques ont une faible impaction dans les voies aériennes supérieures et vont se déposer préférentiellement dans le poumon profond. Cette grande capacité de diffusion fait des aérosols nanométriques un vecteur prometteur pour des actions thérapeutiques et diagnostiques.

Afin de contribuer à l'évolution des traitements des maladies des voies respiratoires, cette thèse s'est orientée vers le développement des nouvelles technologies de génération d'aérosols nanométriques et submicroniques, capables de cibler des régions spécifiques de l'appareil respiratoire d'un patient. Pour cela, il est nécessaire de se confronter à une problématique majeure : contrôler la taille des particules de l'aérosol afin de promouvoir un dépôt ciblé chez le patient. Il est donc d'abord nécessaire d'avoir une large gamme de taille d'aérosols, de micronique à nanométrique, puis déterminer la relation entre la taille des particules et leur site de dépôt dans les voies respiratoires. De ce fait, les objectifs principaux de cette thèse sont la caractérisation métrologique et l'évaluation des performances des aérosols nanométriques en termes de cartographie de dépôt.

Pour aboutir à ces objectifs, le soutien financier de l'Association Régionale d'Aide aux Insuffisants Respiratoires (ARAIR) a été déterminant, ainsi que les aides de Saint-Etienne Métropole et du Conseil Général de la Loire et le partenariat scientifique industriel avec Aerodrug – DTF Medical . De la même manière, une grande partie des travaux expérimentaux a été réalisée grâce à des partenariats très constructifs avec les laboratoires INSERM U1100-EA6305 de l'Université François Rabelais de Tours et le Laboratoire Interdisciplinaire des Nanoparticules

Aérosolisées, LINA EA 4624 notamment à travers le Département de Médecine Nucléaire du CHU de Saint Etienne.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES NANOPARTICULES A VISEE PULMONAIRE

1.1. Les nanoparticules et le système respiratoire

Depuis de nombreuses années les nanoparticules focalisent l'intérêt de divers domaines de la science, tels que la physico-chimie, l'électronique, la biologie et la médecine. Bien qu'il n'y ait pas encore de consensus, les nanoparticules sont couramment définies comme des particules ayant des diamètres inférieurs à 100 nm (Yang et al., 2008; Zhang et al., 2011). En effet, il est connu que dans l'intervalle de 1-100 nm (pour un groupe de particules en suspension avec la masse fixe ($10\text{mg}/\text{m}^3$), le ratio du nombre de molécules qui affleurent à la surface des particules par rapport au nombre total de molécules dans le volume des particules augmente de façon exponentielle quand leur diamètre diminue (Oberdorster et al., 2005). Cela conduit à une plus grande proportion d'atomes ou de molécules sur la surface que dans le volume de la particule, ce qui rend les nanoparticules beaucoup plus réactives (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006).

Aussi, par rapport à des particules micrométriques classiques, cette plus grande réactivité surfacique permet aux particules nanométriques et submicroniques d'assurer une meilleure dissolution des médicaments peu solubles (El-Gendy et al, 2009) et de diminuer la clairance par les macrophages (Azarmi et al, 2008).

Les nanoparticules présentent également des caractéristiques biomimétiques importantes, car c'est aussi dans la dimension nanométrique que se situent les anticorps, les récepteurs membranaires, les acides nucléiques et les protéines, parmi d'autres biomolécules (Sanvincens & Marco, 2008). Ces caractéristiques ajoutées aux propriétés intrinsèques uniques des nanoparticules, font de ces dernières de puissants outils pour la santé humaine. Ainsi, la Nanomédecine devient très prometteuse pour le développement des traitements médicaux et des thérapies ciblées, ainsi que pour l'amélioration des diagnostics, la régénération tissulaire et le développement de nouveaux médicaments. Des matériaux et dispositifs de dimensions nanométriques ont déjà été approuvés pour une utilisation clinique et de nombreux produits sont

en cours d'évaluation dans des essais cliniques (Tableau I.1) (Sanvincens & Marco, 2008 ; Parveen et al., 2012).

Tableau I.1. Exemples d'applications commerciales de nanoparticules dans le domaine médical (Sanvincens & Marco, 2008).

Composants des nanoparticules	Applications	Indications	Société fabricante
Liposomes	Délivrance des médicaments	Cancer	Liplasome Pharma (Lyngby, Denmark), Schering-Plough Corp (Kenilworth, NJ, USA)
		Vaccines: <i>influenza</i> , l'hépatite A	Berna Biotech AG (Basel, Switzerland)
		Infections fongiques	Enzon (Bridgewater, NJ, USA), Gilead Science (Foster City, USA)
Dendrimères	Thérapeutique	VIH, le cancer, l'ophtalmologie, l'inflammation	Starpharma (Melbourne, Australia)
Nanotubes de carbone	Diagnostic <i>in vitro</i>	Surveillance de la fonction respiratoire	Nanomix (Emeryville, CA, USA)
	Imagerie	Microscopie à force atomique, embout des sondes	Carbon Nanoprobes Inc (Seattle, WA, USA)
Quantum dots	Diagnostic <i>in vitro</i> , imagerie	Réactifs d'étiquetage: Western blot, cytométrie en flux, biodétection	Evident Technologies (New York, NY, USA), Quantum Dot Corp. (Hayward, CA, USA), Nanoco Technologies Ltd (Manchester, UK)
Nanoparticules magnétiques	Diagnostic <i>in vitro</i>	Cancer	Immunicon (Huntingdon, USA)
	Imagerie, thérapeutique	Les tumeurs du foie, les maladies cardiovasculaires, l'anémie	Advanced Magnetics (Cambridge, MA, USA)
	Thérapeutique	Cancer	Nanospectra Biosciences Inc (Houston, TX, USA)
Les nanoparticules d'or	Diagnostic <i>in vitro</i>	VIH	Amersham/GE (Little Chalfont, UK)
	Diagnostic <i>in vitro</i> , imagerie	Réactifs d'étiquetage (PCR, ARN, Western blot), l'angiographie et les reins	Nanoprobes Inc. (Yaphank, NY, USA)

En ce qui concerne l'usage médical des nanoparticules, il existe différentes voies d'administration, les plus courantes étant les voies orale, intraveineuse, transdermique, oculaire et pulmonaire (Card et al., 2008 ; Zhang et al., 2011). Parmi ces principales voies d'administration, la voie pulmonaire, peut devenir une voie de choix pour délivrer des nanoparticules thérapeutiques ou diagnostiques aux patients, à visée locale ou systémique (Ely et al., 2007; Arzami et al., 2008). En effet, la voie pulmonaire bénéficie de plusieurs avantages : d'abord, elle contourne le premier passage hépatique, le « first-pass metabolism », qui réduit la dose des composés actifs administrés ; ensuite, la voie pulmonaire est aussi très efficace pour l'absorption des principes actifs, grâce à sa grande surface alvéolaire (plus de 100 m²), la faible épaisseur de sa barrière épithéliale (0.2-1 µm) et sa vaste vascularisation. En plus, les voies respiratoires disposent d'une activité protéolytique relativement faible, qui contribue à maintenir une biodisponibilité élevée. Enfin, la nature non-invasive de l'administration par voie pulmonaire augmente le confort du patient (Ely et al., 2007; Arzami et al., 2008 ; Zhang et al., 2011).

La mise en valeur de la voie pulmonaire comme voie thérapeutique a été marquée par l'approbation de la mise sur le marché de l'insuline inhalée en 2006 aux Etats-Unis, commercialisée sous la désignation commerciale Exubera (Pfizer, New York, NY). Exubera représentait un nouveau système d'administration d'insuline pour les patients de diabète type 1 ou de type 2, pouvant atténuer certains obstacles à l'initiation de l'insulinothérapie et fournissant un contrôle glycémique efficace, comparable à celui observé avec l'insuline sous-cutanée et supérieur à celui observé avec le traitement par voie orale, avec une tolérance favorable et un bon profil de sécurité (Davis, 2008). Néanmoins le coût supplémentaire d'Exubera par rapport à l'insuline injectable avec une efficacité comparable, fait qu'il n'était pas rentable. En Octobre 2007, Pfizer a donc annoncé l'arrêt de la production d'Exubera en raison de la faiblesse des ventes (Simons, 2007).

Une autre possibilité de l'administration par voie inhalée est constituée par les vaccins antigrippaux, qui sont généralement administrés par injection intramusculaire. La vaccination par voie inhalée, sans aiguille, peut offrir plusieurs avantages par rapport aux injections intramusculaires: ils sont sans douleur, facile à distribuer, réduisent les risques de contamination par aiguille (dans des pays en développement) et sont plus faciles à administrer aux patients. En outre, l'administration de vaccins par la voie inhalée suscite des réponses immunitaires au niveau

du mucus alvéolaire et une meilleure immunité cellulaire, améliorant ainsi l'efficacité du vaccin (Amorj et al., 2010). En France, il y a sur le marché un vaccin par inhalation à virus vivant atténué, commercialisé comme Fluenz® (Astra Zaneca), qui est utilisé efficacement pour la prévention de la grippe chez des sujets âgés de 24 mois à moins de 18 ans.

Un autre exemple de l'utilisation de particules submicroniques en aérosolthérapie sont les inhalateurs de corticostéroïdes utilisés comme thérapie de contrôle en asthme. Des inhalateurs classiques contenant de chlorofluorocarbones (CFC) utilisés dans le contrôle de l'asthme ont été progressivement supprimés et remplacés par des alternatives basées sur le hydrofluoroalcane (HFA). La reformulation de ces inhalateurs a permis d'améliorer la technologie inhalation et les caractéristiques physiques des formulations de corticostéroïdes. Un des dispositifs les plus efficaces de cette nouvelle génération d'inhalateurs est le Qvar (Teva Respiratory) qui contient du HFA-dipropionate de bécloéthasone (HFA-BDP) lié à une technologie d'atomisation améliorée, capable de produire un aérosol extrafine avec un diamètre aérodynamique moyen en masse (DAMM) de 1,1 µm (plus petit que le DAMM de 3,5 à 4,0 µm habituellement trouvé avec les inhalateurs CFC-BDP). Il a été démontré que grâce à la petite taille de ses particules le QVAR est déposée davantage dans les poumons par rapport à celui observé avec le CFC-BDP, en particulier dans les voies aériennes petites, un site majeur de l'inflammation (Vanden Burgt et al. 2000).

Toutefois, la réactivité accentuée des nanoparticules peut aussi conduire à des effets indésirables, comme une plus grande toxicité et l'induction de stress oxydatif (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006). En plus, des études épidémiologiques ont montré une corrélation positive entre l'augmentation de la concentration de particules ultrafines atmosphériques et les augmentations à court terme de la morbidité et de la mortalité (Borm et Kreyling, 2004; Powell et Kanarek, 2006).

Ainsi, le système respiratoire est une cible privilégiée pour les effets potentiels, bénéfiques ou néfastes, des nanoparticules. Cela met en évidence l'intérêt croissant pour mieux comprendre le dépôt pulmonaire des nanoparticules, qui se traduit par l'augmentation régulière du nombre de publications scientifiques sur ces sujets au cours de la dernière décennie (Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006 ; Gonda, 2006 ; Gill et al. 2007 ; Mansour et al., 2009 ; Yang et al., 2010).

1.2. Intérêt des aérosols nanométriques

Les nanoparticules destinées à un usage médical, comme les liposomes et les dendrimères, sont en général d'une taille trop petite (d'un ordre inférieur à 100 nm) pour être adaptées à une livraison directe au poumon profond à travers de systèmes classiques d'aérosolthérapie. Ainsi, le défi majeur pour la délivrance pulmonaire de nanoparticules est la conception de dispositifs appropriés pour la délivrance d'actifs nanovectorisés. Cependant, la taille des particules des nanoparticules à usage médical est trop petite pour être adaptée à la livraison directe du poumon (Azarmi et al, 2008).

L'administration des principes actifs sous forme aérosol dans les voies respiratoires des patients, i.e., l'Aérosolthérapie, est une technique connue et pratiquée depuis l'Antiquité. En effet, cette pratique réunit les avantages de l'administration par voie pulmonaire, augmentant ainsi l'efficacité et la rapidité d'action des médicaments à visée pulmonaire ou systémique, tout en limitant ses effets secondaires. Néanmoins, l'efficacité de ce type de traitement dépend fortement du dépôt de l'aérosol dans les voies respiratoires, qui à son tour dépend des propriétés physiques de l'aérosol (taille, vitesse, hygroscopie des particules), les conditions d'inhalation, les paramètres respiratoires et l'anatomie des voies respiratoires (Vecellio, Lemarié & Diot, 2005).

L'utilisation d'aérosols médicaux submicroniques et nanométriques (avec des particules inférieures à 1000 nm) devient une technique de plus en plus attractive et émergente en Aérosolthérapie (Arzimi et al, 2008 ; Longestetal et al, 2012). Cela parce que ces aérosols sont connus pour avoir un très faible dépôt dans les voies respiratoires extrathoracique (orale et nasale), réduisant considérablement les pertes par impaction de particules, qui sont normalement observées lors de l'utilisation des aérosols médicaux classiques (avec des particules micrométriques) (Xi & Longest, 2007; Xi & Longest, 2008a, 2008b).

Les applications potentielles des aérosols submicroniques ou nanométriques se situent tant dans le domaine de la prévention (vaccination) et du diagnostic (imagerie isotopique par exemple), que pour des fins thérapeutiques, tels que des traitements pour le cancer du poumon, le cancer

bronchique, la fibrose kystique, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et l'asthme (Card et al., 2008 ; Arzimi et al, 2008 ; Hureaux, 2009).

Wiedmann et al. (1997) ont montré des performances supérieures des aérosols utilisant des nanoparticules par rapport à des formulations conventionnelles avec microparticules (taille moyenne des particules de 10,5 μm). Ces auteurs signalent qu'en comparaison à un aérosol de microparticules, les aérosols contenant des nanoparticules résultent dans un *output* d'environ trois fois plus grand (40 vs 14%) et dans une fraction respirable cinq fois plus élevée (14 vs 3%). D'autres études comparant formulations de nanoparticules versus formulations de microparticules avec de tailles vers 4 μm , ont également montré une tendance similaire (Luangkhot et al., 2000 ; Keller et al., 2002). Selon ces auteurs, un autre avantage pour l'utilisation des nanoparticules est l'obtention d'un temps plus court d'administration. En effet, les nanoparticules solides des aérosols peuvent être entraînées dans des gouttelettes plus petites et mieux réparties au sein de celles-ci, augmentant ainsi la fraction de particules fines dans l'aérosol (Luangkhot et al., 2000 ; Keller et al., 2002 ; Ali et al., 2009 ; Zhang et al., 2011).

Luangkhot et al., (2000) ont également démontré des performances améliorées pour les aérosols formés avec des suspensions de nanoparticules par rapport à ceux formulés avec des solutions conventionnelles. Ces performances supérieures ont été attribuées au fait de que les aérosols de nanoparticules réduisent les irritations possibles et la toxicité causée par la présence de solvant dans les formulations conventionnelles (normalement présente en grandes quantités).

Bien que les aérosols contenant des nanoparticules semblent améliorer la performance thérapeutique par rapport à des formulations contenant des microparticules, ces suspensions de nanoparticules restent cependant confinés dans des gouttelettes micrométriques, et ces gouttelettes micrométriques ne contribuent pas à la délivrance de l'aérosol vers le poumon profond, limitant ainsi son usage thérapeutique (Luangkhot et al., 2000 ; Zhang et al., 2011). Dans des nombreux études qui rapportent le potentiel de l'utilisation de nanoparticules dans la formulation des aérosols à visée pulmonaire, le plus courant est que des nanoparticules soient

aérosolisées dans des vecteurs, i.e. *carriers*, non-nanométriques (Kawashima et al., 1998 ; Sham et al., 2004 ; Grenha et al., 2005 ; Ely et al., 2007). Par exemple, des nanoparticules polymériques vectorisées par des *carriers* de lactose dans la formulation des poudres-sèches (~2.5 µm de diamètre) (Figure I.1), ou la nébulisation de dispersions aqueuses contenant des nanosphères de PLGA, résultant en gouttelettes liquides micrométriques (6.5 µm de diamètre) (Sham et al., 2004 ; Yamamoto et al., 2005 ; Hureaux et al., 2009). Ainsi, bien que l'administration pulmonaire des nanoparticules par voie aérosol soit une voie prometteuse, il reste encore beaucoup à optimiser.

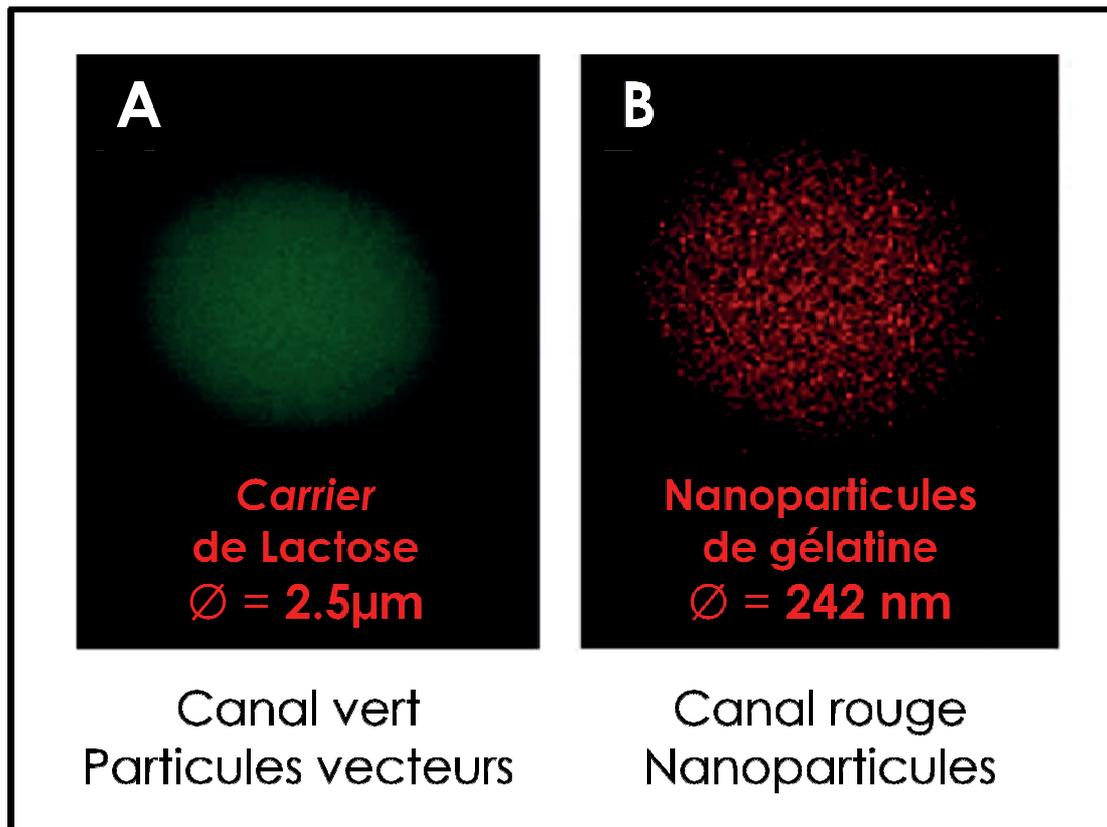


Figure I.1. Exemple de nanoparticules aérosolisées dans des vecteurs non-nanométriques - Composition d'une poudre sèche contenant des nanoparticules destinées à l'aérosolisation dans les poumons : le canal vert montre la particule *carrier* de lactose (A) et le canal rouge montre les nanoparticules solides de gélatine à l'intérieur du *carrier* (B). (Sham et al., 2004).

Une possibilité d'optimisation des aérosols pour assurer une délivrance efficace aux poumons profonds pourrait être que les vecteurs des particules dans l'aérosol soient aussi dans la gamme nanométrique, c'est-à-dire, des aérosols totalement nanométriques. Pour cela, la taille des vecteurs, les paramètres de nébulisation, ainsi que la matrice des nanoparticules (dans le cas des

nanoparticules solides) doivent être améliorées à fin d'empêcher l'agrégation des particules. Dans le cas de la nébulisation de nanoparticules, il est aussi important de développer des suspensions physiquement et chimiquement stables pour pouvoir atteindre une pertinence clinique dans un futur proche (Arzimi et al, 2008).

2. LA GENERATION DES AEROSOLS

2.1. Généralités sur la physique des aérosols

Par définition, un aérosol est une suspension de particules solides ou liquides dans un gaz. Il s'agit ainsi d'un système de particules dont le diamètre est suffisamment petit pour qu'elles restent en suspension dans le gaz. Ces particules de différentes tailles peuvent avoir des formes diverses et être de nature solide (poudre) ou liquide (gouttelettes) (Bricard, 1977).

Les lois de la physique des aérosols sont souvent établies pour des particules supposées sphériques (Bricard, 1977). Pour pouvoir généraliser à des particules non-sphériques, il est commode de définir un diamètre équivalent à une sphère. Ce dernier est déterminé à partir des propriétés dynamiques des aérosols. Plusieurs définitions existent :

- Le diamètre équivalent en volume (d_v en m) est le diamètre d'une sphère ayant la même masse que la particule et la masse volumique du matériau ;
- Le diamètre de Stokes (d_s en m) correspond au diamètre d'une sphère ayant même vitesse de sédimentation et la même masse volumique que la particule considérée ;
- Le diamètre aérodynamique équivalent (d_{ae} en m) est le diamètre de la sphère ayant la même vitesse de sédimentation que la particule et une masse volumique égale à 1000 kg.m^{-3} ;

La Figure I.2 est une représentation de ces différents diamètres à partir d'une particule quelconque. χ_p désigne le facteur de forme permettant de se ramener à la vitesse de sédimentation de la particule.

La définition physique la plus pertinente dans les cas des aérosols médicaux est le diamètre aérodynamique équivalent (d_{ae}), car il permet de caractériser la taille des particules quels que soient leur poids, leur forme et leur densité. Les propriétés aérodynamiques des aérosols sont ainsi les principaux facteurs qui déterminent leur site de dépôt dans les voies respiratoires.

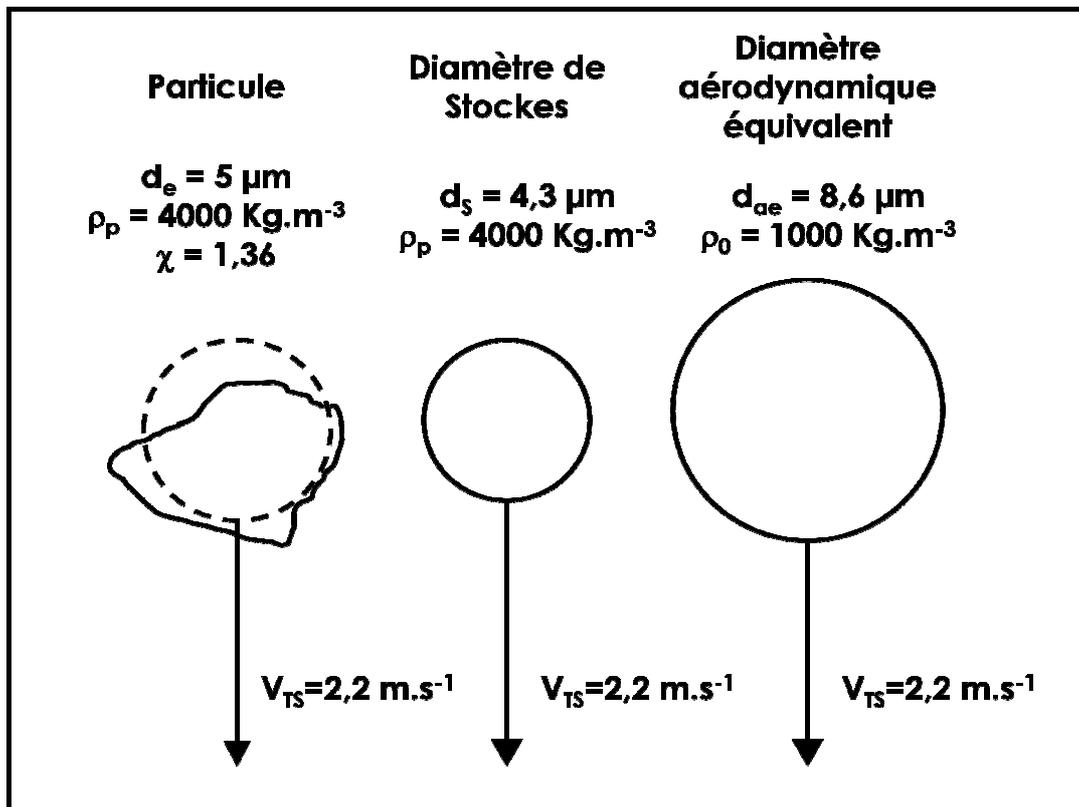


Figure I.2. Différents diamètres équivalents pour une particule quelconque : V_{TS} correspond à la vitesse terminale de chute (Hinds, 1999).

Étant donné que les aérosols médicaux sont le plus souvent polydispersés, c'est-à-dire constitués de particules de tailles de différentes, l'interprétation statistique de la distribution en taille des particules de ces aérosols est donc réalisée à travers l'utilisation du diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM). Le DAMM est ainsi le diamètre qui divise la masse de l'aérosol en deux moitiés également réparties de part et d'autre du DAMM (Figure I.3). Avec les paramètres respiratoires du patient, le DAMM conditionne le site de dépôt des aérosols dans les voies aériennes (Bricard, 1977).

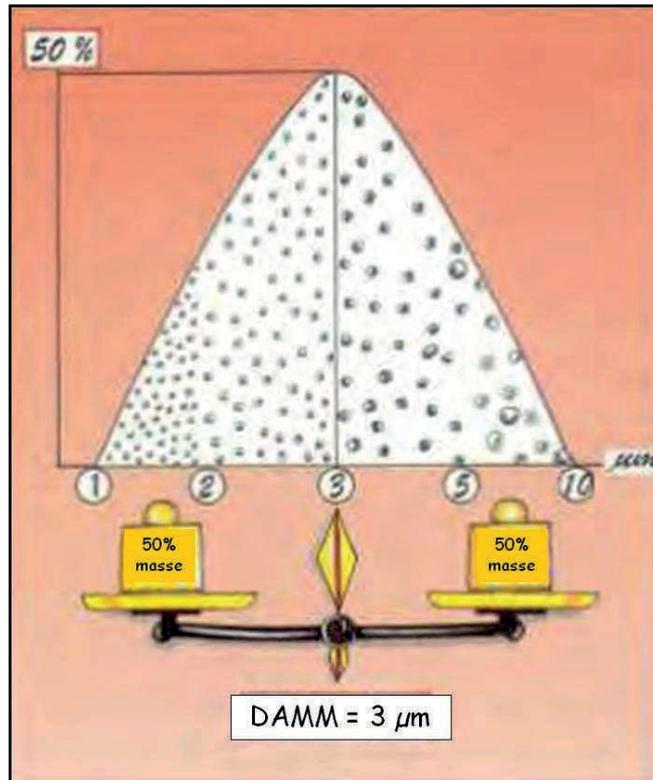


Figure I.3. Schéma pour expliquer le diamètre aérodynamique médian en masse (DAMM) dans la courbe de distribution des particules d'un aérosol (Dessanges, 1993).

2.2. Les différentes technologies de génération d'aérosol

La manière la plus simple de générer un aérosol médical consiste à nébuliser une formulation aqueuse renfermant le principe actif. Il existe 3 familles de générateurs d'aérosols par nébulisation : les nébuliseurs pneumatiques, les nébuliseurs ultrasoniques et les nébuliseurs à tamis vibrant.

D'autres systèmes générateurs d'aérosol peuvent aussi être utilisés pour administrer des médicaments formulés sous forme de poudre sèche (DPI ou Dry Powder Inhaler) ou d'aérosols-doseurs avec gaz propulseurs (MDI ou Metered Dose Inhaler) (Vecellio, 2005 ; Dautzenberg et al., 2007).

Tous les générateurs d'aérosol à usage thérapeutique doivent répondre à la norme européenne (EN) et française (NF) 13544-1 et obtenir le marquage CE avant commercialisation. Le choix du générateur découle de l'indication médicale, du site de dépôt privilégié, du volume à nébuliser, des

recommandations de bonnes pratiques, de la capacité du patient à bien utiliser le dispositif choisi, et de critère économiques (Bertrand, 2005 ; Foret, Casali, 1996 ; Chantrel et al, 2006, Hureaux, 2010).

2.2.1. Les nébuliseurs pneumatiques

Dans des nébuliseurs pneumatiques la solution contenant le principe actif est atomisée par effet Venturi sous l'effet d'un gaz comprimé (oxygène ou air comprimé). Cela résulte en une projection des gouttelettes qui vont ensuite être impactées et fractionnées sur un déflecteur, puis sélectionnées. Les plus grosses vont s'impacter sur les parois du nébuliseur pour être recyclées sous forme de solution, les plus petites vont être administrées au patient (Figure I.4) (Vecellio, 2005 ; Majoral, 2007).

La pression ou le débit de l'air introduit dans le nébuliseur détermine le DAMM et le débit de l'aérosol. En effet, l'augmentation de la pression d'alimentation est un moyen de diminuer la taille moyenne des gouttelettes et d'augmenter le débit de l'aérosol. La tension superficielle et la masse volumique de la solution influent également sur le diamètre des particules. Ainsi, en raison de cette relation entre flux gazeux et diamètre particulaire, il n'est pas possible de modifier le débit de l'aérosol sans modifier sa granulométrie. La modification du compresseur peut augmenter ou diminuer le diamètre des particules de l'aérosol, modifiant ainsi le site de dépôt. Le couple nébuliseur-compresseur est ainsi indissociable (Vecellio, 2005 ; Majoral, 2007).

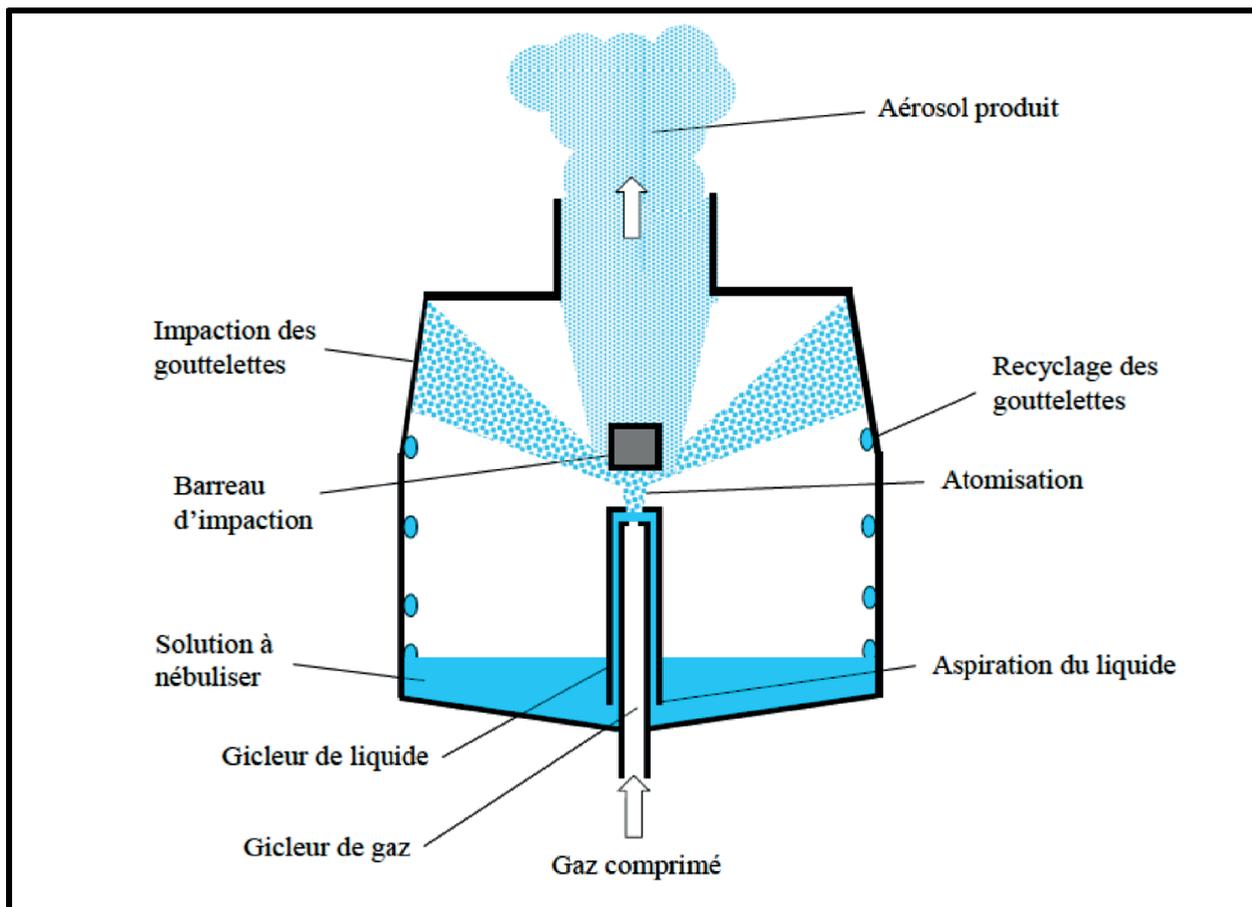


Figure I.4. Principe de fonctionnement d'un nébuliseur pneumatique (Vecellio, 2006).

2.2.2. Les nébuliseurs ultrasoniques

Dans les nébuliseurs ultrasoniques la solution contenant le principe actif est nébulisée sous l'effet d'ultrasons produits par un système piézo-électrique (quartz) oscillant à haute fréquence. Les vibrations produites, de l'ordre du mégahertz (1,5 à 2,5 MHz), créent un phénomène de cavitation qui va générer des gouttelettes. L'aérosol est ensuite délivré au patient par une ventilation continue, ou stocké dans la chambre du nébuliseur puis inhalé.

Les générateurs ultrasoniques sont plus silencieux que les nébuliseurs pneumatiques. Néanmoins, ces générateurs ne sont pas compatibles avec tous les médicaments en raison d'un échauffement de la solution à nébuliser qui peut potentiellement dénaturer le principe actif. De plus, en raison de leur format, les nébuliseurs ultrasoniques sont très difficiles à nettoyer, ce qui rend difficile le contrôle de l'hygiène après une séance de nébulisation.

Des nébuliseurs ultrasoniques de seconde génération ont été créés pour pallier à ces difficultés. Au lieu de verser le médicament directement sur le quartz, ces nébuliseurs sont équipés d'une coupelle jetable dans laquelle le médicament est placé, cette coupelle étant séparée du quartz par une réserve d'eau tampon (Chantrel et al, 2006) (Figure I.5).

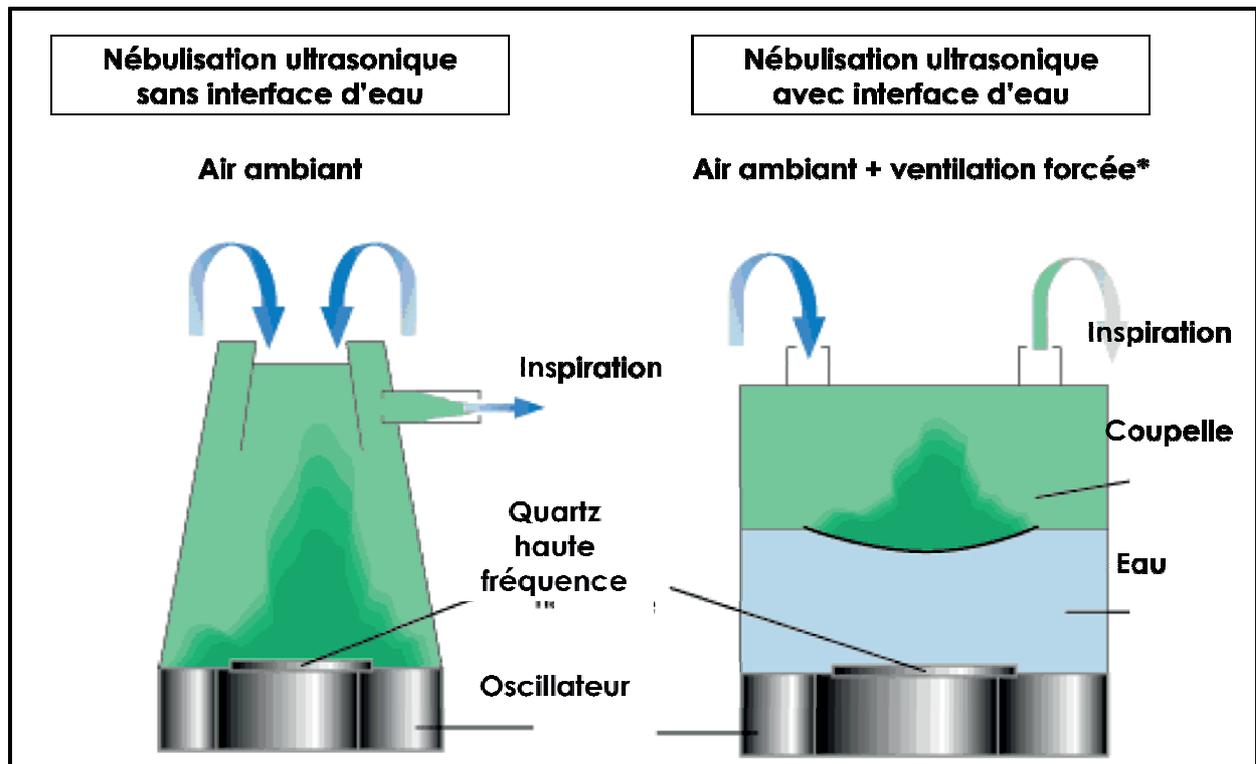


Figure I.5. Principe de fonctionnement des nébuliseurs ultrasoniques (Majoral, 2007). Ventilation forcée nécessaire seulement dans certains appareils.

2.2.3. Les nébuliseurs à tamis

Dans des nébuliseurs à tamis (ou à membrane), la solution contenant le principe actif est nébulisée grâce à son passage, sous très haute fréquence, à travers une membrane percée de trous de taille micrométrique (de 1000 à 6000 trous par nébuliseur, selon les modèles).

Selon le type de nébuliseur, le tamis peut être fixe ou vibrant. Dans le premier cas, un cristal piézo-électrique est en contact avec la solution et les vibrations sont transmises au transducteur qui va pousser le liquide à travers les trous de la membrane pour détacher des gouttelettes vers

l'extérieur. Dans les nébuliseurs à tamis vibrant, un transducteur piézo-électrique entoure la membrane pour la mettre en vibration, et par conséquent, la solution en contact avec la membrane est donc projetée au travers des trous de celle-ci vers le patient (Figure I.6).

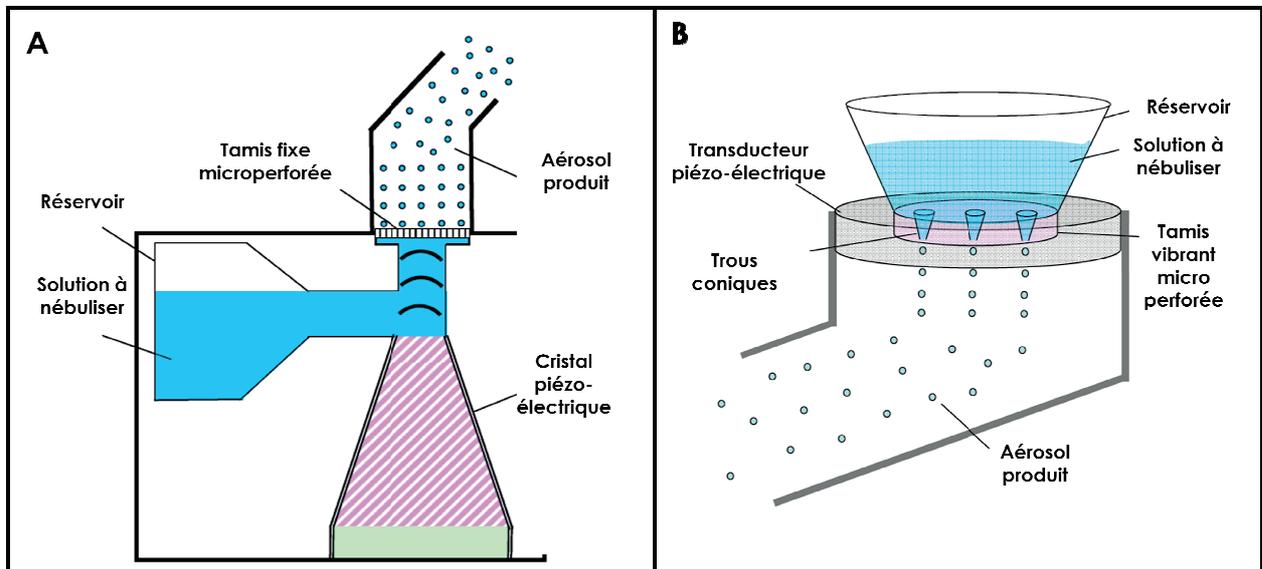


Figure I.6. Principe de fonctionnement des nébuliseurs à tamis (Vecellio, 2006).

Ces types de générateurs sont silencieux, de petite taille, et compatibles avec tous les médicaments. Ils permettent d'obtenir un débit de nébulisation élevé se traduisant par un raccourcissement de la durée de nébulisation pour les patients (Vecellio, 2006 ; Majoral, 2007 ; Hureaux, 2010).

2.2.4. Les aérosols doseurs de liquide ou MDI

Le principe des aérosols-doseurs repose sur la théorie de l'atomisation. Le principe actif est dissous dans un flacon avec le gaz propulseur liquéfié sous pression, avec des excipients qui accroissent la stabilité de l'ensemble. Un système de valve doseuse se remplit avec cette suspension liquide alors que le flacon est positionné « tête en bas ». Le déclenchement de la valve permet au gaz contenu dans le flacon de propulser le médicament à grande vitesse sous forme de gouttelettes, i.e. sous forme aérosol (Vecellio, 2005 ; Majoral, 2007) (Figure I.7).

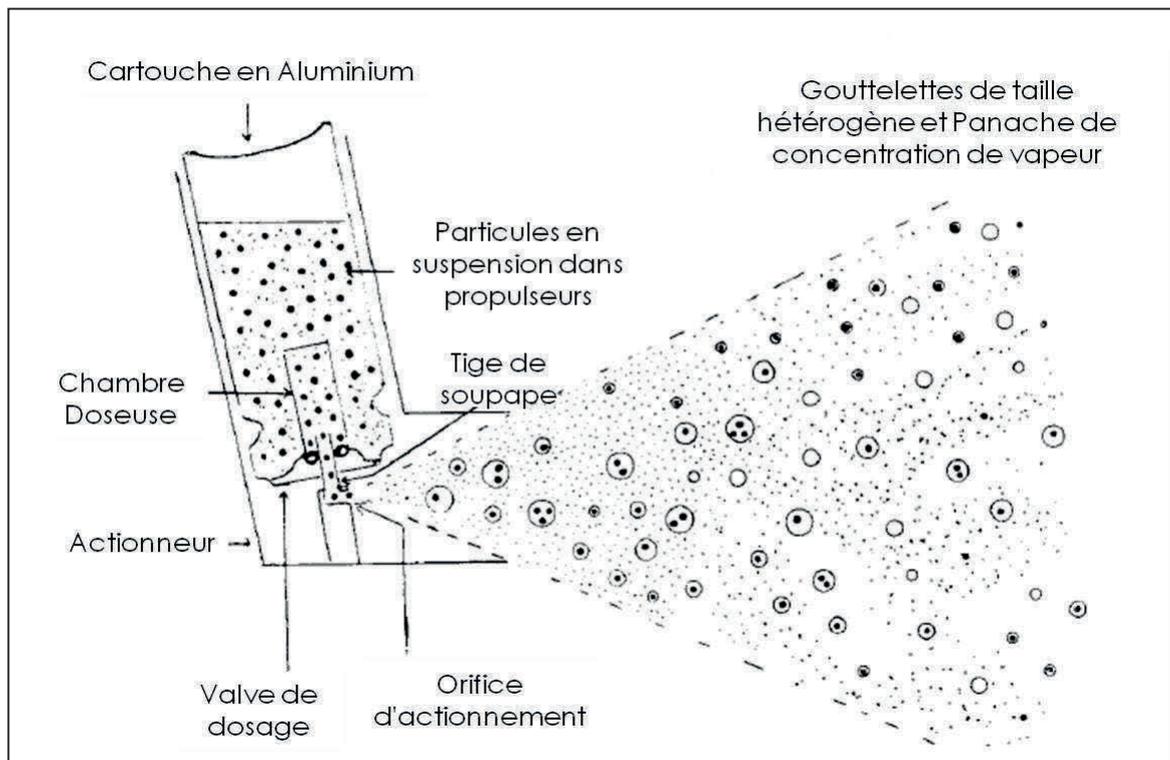


Figure I.7. Composition d'un MDI (Hickey, Evans, 1996)

2.2.5. Les aérosols doseurs de poudre ou DPI

Les aérosols doseurs de poudre combinent la technologie des poudres avec la technologie de dispersion des particules de poudres sèches en aérosol dans le flux d'air inspiratoire du patient. Ils ne contiennent pas de gaz propulseur. Ainsi le principe actif sous forme de poudre est contenu dans des gélules ou dans un réservoir unitaire. Après armement de l'inhalateur, le médicament sous forme de poudre est aspiré par le flux d'air turbulent induit par l'effort inspiratoire du patient. Pour obtenir une bonne efficacité du système, des forts débits inspiratoires sont nécessaires (30 L/min à 120 L/min). Cette forte inspiration a pour effet de désagréger la poudre et de lui assurer une bonne dispersion. Par conséquent, ce système génère des aérosols de structures variables selon le débit inspiratoire du patient (Vecellio, 2005 ; Majoral, 2007) (Figure I.8).

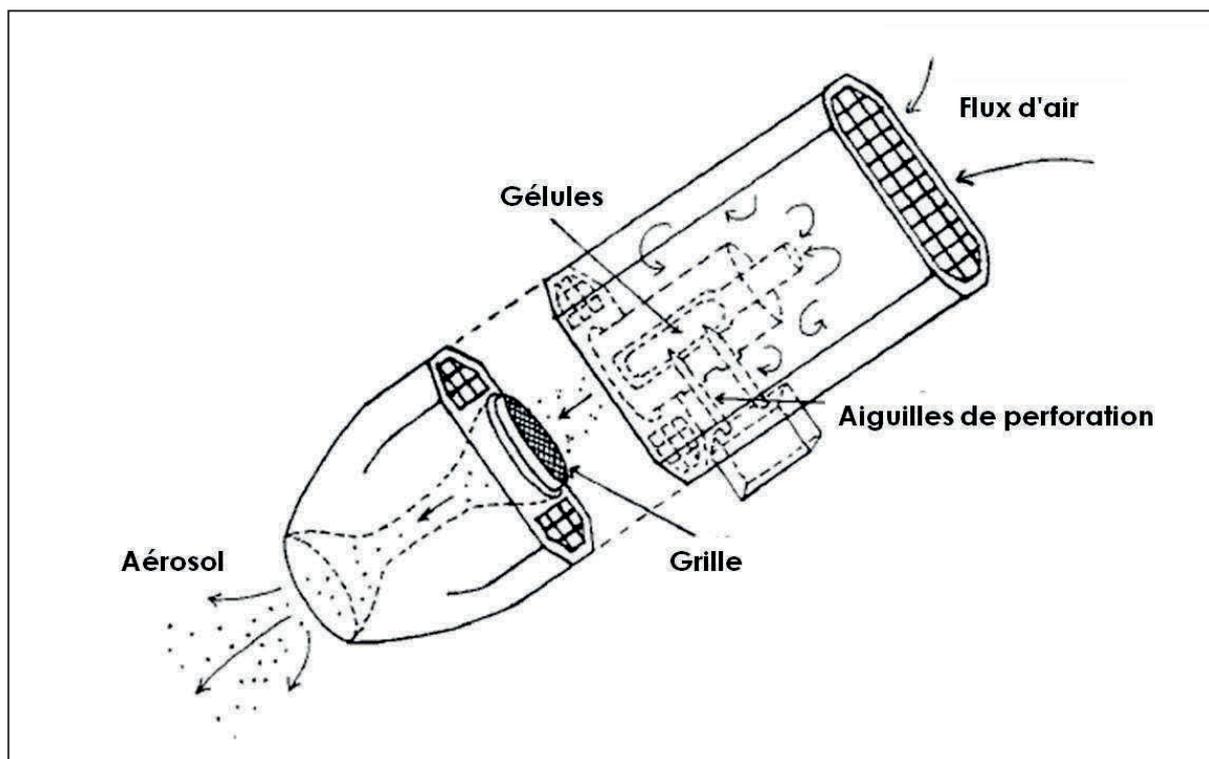


Figure I.8. Composition d'un MDI (Dalby et al, 1996)

3. LA GENERATION DES D'AEROSOLS SUBMICRONIQUES ET NANOMETRIQUES

Il est bien connu que les générateurs classiques d'aérosolthérapie (soit pneumatiques, ultrasoniques, MDI ou DPI), produisent des aérosols qui se déposent dans les poumons avec des rendements très faibles, de l'ordre de 12% du médicament aérosolisé (Rau, 2005). Ces aérosols sont aussi caractérisés par une grande variabilité inter et intra-sujet, ce que rend leur utilisation à visée pulmonaire encore plus difficile (Borgstrom, Olsson, & Thorsson, 2006 ; Byron, 2004 ; Cheng, Fu, Yazzie, & Zhou, 2001 ; Leach, Davidson, & Bouhuys, 1998 ; Zhang, Gilbertson, & Finlay, 2007). Pour que la délivrance de médicaments dans les poumons soit une alternative viable, il est crucial qu'une nouvelle-génération de techniques d'aérosolisation permette d'augmenter le dépôt pulmonaire et diminuer la variabilité inter et intra-sujet (Byron, 2004 ; and Smaldone, 2006).

Dans une synthèse bibliographique, Borgstrom et al. (2006) ont montré qu'indépendamment du type de générateur d'aérosol ou de la catégorie du sujet, un dépôt pulmonaire élevé était toujours associé à une faible variabilité de dépôt et vice versa. Une faible variabilité du dépôt dans les poumons ne peut donc être obtenue que si un dépôt pulmonaire important est atteint. Le dépôt des aérosols dans la région pulmonaire peut être significativement augmenté au travers de la diminution du dépôt des particules dans les régions ORL et trachéo-bronchique.

Les aérosols submicroniques et nanométriques sont connus pour produire des très faibles dépôts dans les voies aériennes supérieures (orale et nasale) (Cheng et al, 1996; Xi & Longest, 2007; Kim & Jaques, 2004 ; Xi & Longest, 2008a, 2008b). Des études théoriques ainsi que des études expérimentales sur le dépôt de particules inhalées signalent que la fraction totale déposée de l'aérosol croît de manière significative lorsque le diamètre des particules diminue (ICRP, 1994 ; Jaques & Kim, 2000). Nonobstant, une petite taille des particules peut aussi limiter leur dépôt dans les voies aériennes. En effet, un pourcentage élevé des particules nanométriques est exhalé, par exemple, la rétention pulmonaire totale d'aérosols de 100 nm peut être aussi basse que 25% (Jaques & Kim, 2000). La Figure I.9 montre que la courbe de dépôt totale des aérosols dans le tractus respiratoire diminue avec la croissance du diamètre de particules et atteint un minimum pour les particules vers 300 nm. Cela est dû au fait que pour la gamme de taille vers 300 nm les particules inhalés possèdent une mobilité intrinsèque insuffisante pour les faire avoir un contact effective avec les surfaces des voies respiratoires. Il s'agit donc d'une gamme de taille où les particules sont trop grosses pour que leur diffusion soit importante et trop petites pour que les phénomènes d'impaction et de sédimentation soient sensibles (Hervé-Bazin, 2007).

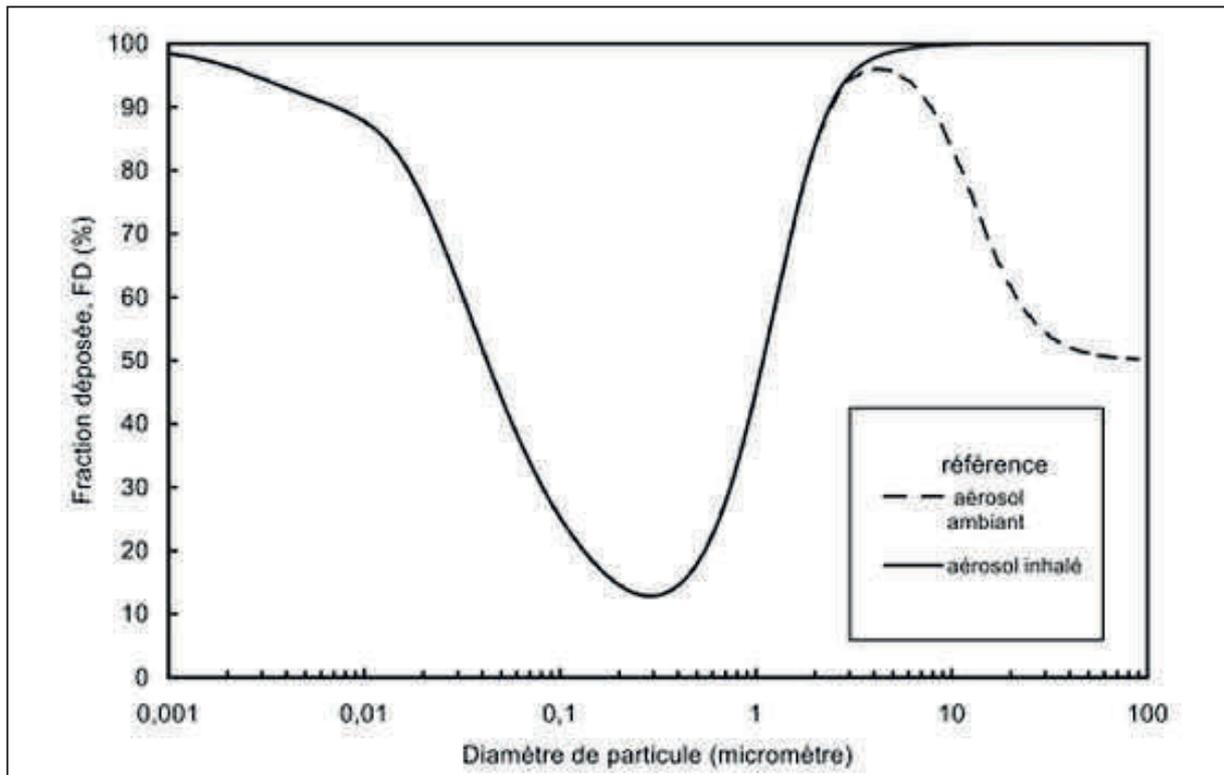


Figure I.9. Prédiction du dépôt total dans les voies respiratoires chez l'homme en fonction du diamètre des particules. La courbe en trait plein n'inclut pas l'inhalabilité. Les conditions correspondent à un travail standard pour une personne respirant par le nez suivant le modèle de l'ICPR (2004). D'après Hervé-Bazin (2007).

Une des nouvelles approches proposée pour améliorer considérablement le dépôt des aérosols médicaux dans les poumons est la technique de croissance par condensation (Longest et al, 2012). Cette technique est basée sur le phénomène de condensation qui se produit généralement lorsqu'une vapeur est refroidie ou comprimée à sa limite de saturation. Lorsque la vapeur est sursaturée, elle se condense sur les surfaces de noyaux de condensation telles que des particules d'aérosol (Figure I.10). L'augmentation de la taille des aérosols en raison de la croissance par condensation influe sur le dépôt et la cinétique des ces aérosols (Park et al, 2011).

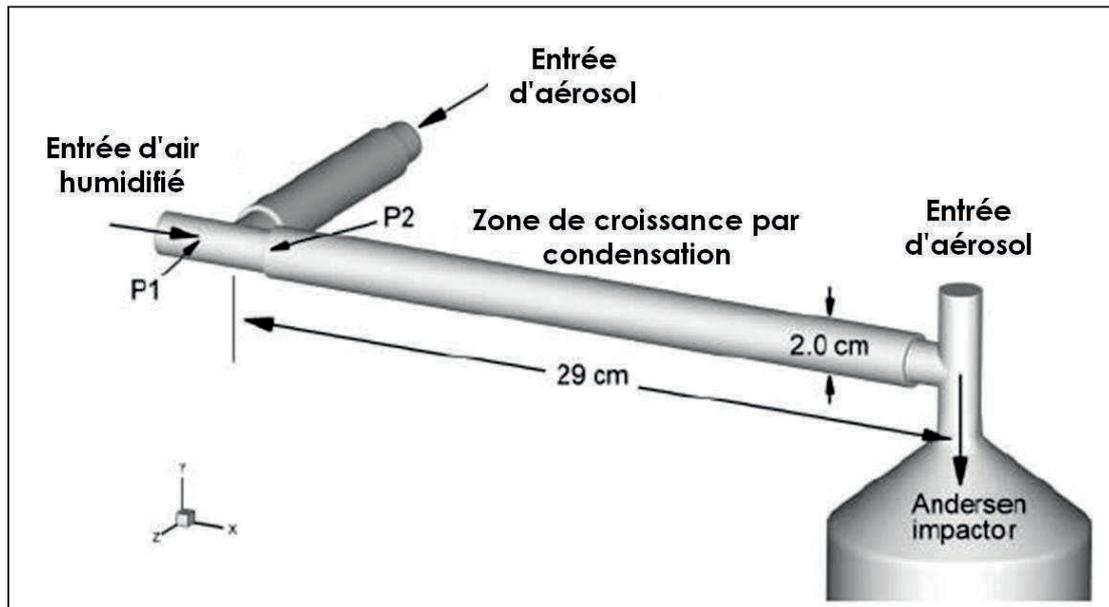


Figure I.10. Modèle de la technique de croissance par condensation des aérosols submicrométriques. Le mélange du courant d'aérosol avec l'air humidifié produit des conditions de sursaturation et de croissance de l'aérosol. Le diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) final de l'aérosol peut donc être déterminé grâce à l'impacteur en cascade Andersen (ACI), situé à la fin de la zone de croissance par condensation (Longest et al. 2010).

Deux méthodes de croissance par condensation sont utilisées pour augmenter la taille des particules et assurer le maintien des particules de l'aérosol dans les poumons. La première méthode, dite croissance par condensation renforcée (Enhanced Condensational Growth - ECG), libère un aérosol initialement submicronique à l'égard d'un courant d'air saturé avec vapeur d'eau à une température de quelques degrés au-dessus des conditions des voies respiratoires. Le refroidissement du courant d'air dans les voies aériennes provoque une condensation sous forme de gouttelettes et une augmentation de la taille de particules de l'ordre du micromètre (Longest & Hindle, 2010; Longest et al., 2011; Tian et al., 2011). La deuxième méthode, croissance renforcée de l'excipient (Excipient Enhanced Growth - EEG), met en œuvre la délivrance de gouttelettes ou de particules submicroniques qui combinent le médicament avec un excipient hygroscopique, sans utiliser un flux d'air saturé par inhalation. Les conditions proches de la saturation observées dans les poumons sont utilisées pour favoriser l'augmentation de taille des gouttelettes hygroscopiques et assurer le dépôt de l'aérosol (Longest & Hindle, 2010; Longest et al., 2012).

La validation des nouveaux dispositifs de génération des aérosols, ainsi que la description de la composition et distribution granulométrique des particules sont souvent réalisées par simulation numérique en dynamique des fluides (CFD - *Computational Fluid Dynamics*). Cette branche de la mécanique des fluides utilise des méthodes numériques et algorithmiques pour analyser et résoudre des problèmes qui impliquent des flux de fluides. Des prédictions peuvent être obtenues au travers de la simulation des interactions liquide-gaz.

Dans des études récentes, Longest et al. (2012) ont utilisé des modélisations CFD pour explorer la génération des aérosols submicroniques et nanométriques par des nébuliseurs à tamis couplés à des méthodes de croissance par condensation (ECG et EEG). Cette étude a montré qu'un chauffage des courants d'air à contre-courant est la meilleure méthode pour la production de l'aérosol submicronique pour les nébuliseurs à tamis. En plus, les auteurs ont aussi identifié les conditions optimales des méthodes ECG et EEG pour les différentes voies d'inhalation.

En résumé, la génération d'aérosols nanométriques et submicroniques à visée pulmonaire doit s'occuper non seulement des technologies visant la diminution de la taille des particules ou vecteurs, mais aussi étudier la méthode d'administration de ceux-ci, afin d'assurer le dépôt des particules dans la région alvéolaire.

3.1. Aérosols vectorisés sous forme de particules solides

Des nombreuses études rapportent la formulation des poudres-sèches qui utilisent des nanoparticules dans des vecteurs solides micrométriques. Les poudres-sèches sont normalement produits grâce à des techniques d'atomisation (*spray-dry*), qui consistent en méthodes de déshydratation où une solution liquide est pulvérisée en fines gouttelettes dans une enceinte cylindrique verticale au contact d'un courant d'air chaud afin d'évaporer l'eau. La poudre obtenue est entraînée par le flux de chaleur jusqu'à un cyclone ou un filtre à manche qui séparent l'air de la poudre. L'administration de ces poudres-sèches est normalement réalisée par des aérosols doseurs de poudre (DPI).

Le concept de formulation d'aérosols contenant des nanoparticules encapsulées dans des vecteurs solides a été introduit par Sham et al. (2004). Dans cette étude, une poudre-sèche a été préparée par la dissolution d'un vecteur solide (lactose) dans une suspension de nanoparticules (gélatine ou iso-butyle cyanoacrylate) suivie d'un séchage ultérieur par atomisation. Grenha et al. (2005) ont également développé une poudre-sèche avec des excipients particuliers aux aérosols comme le lactose et le mannitol. Grâce à des techniques d'atomisation, ces chercheurs ont réussi à incorporer des nanoparticules de chitosane chargées en insuline dans des microsphères. Ely et al. (2007) ont utilisé des techniques de séchage par pulvérisation pour la formulation de vecteurs solides effervescents contenant des nanoparticules de ciprofloxacine, conduisant ainsi à un aérosol avec un mécanisme actif de délivrance par voie pulmonaire. Ils ont également montré que ces vecteurs solides effervescents peuvent être synthétisés avec une taille appropriée pour un dépôt au niveau du poumon profond. Toutefois, la majorité des études consacrées au développement de la formulation d'aérosols utilisent des vecteurs solides non-nanométriques (Figure I.11), empêchant ainsi une délivrance efficace des particules dans la région alvéolaire, et par conséquent diminuant l'efficacité thérapeutique ou diagnostique de l'aérosol.

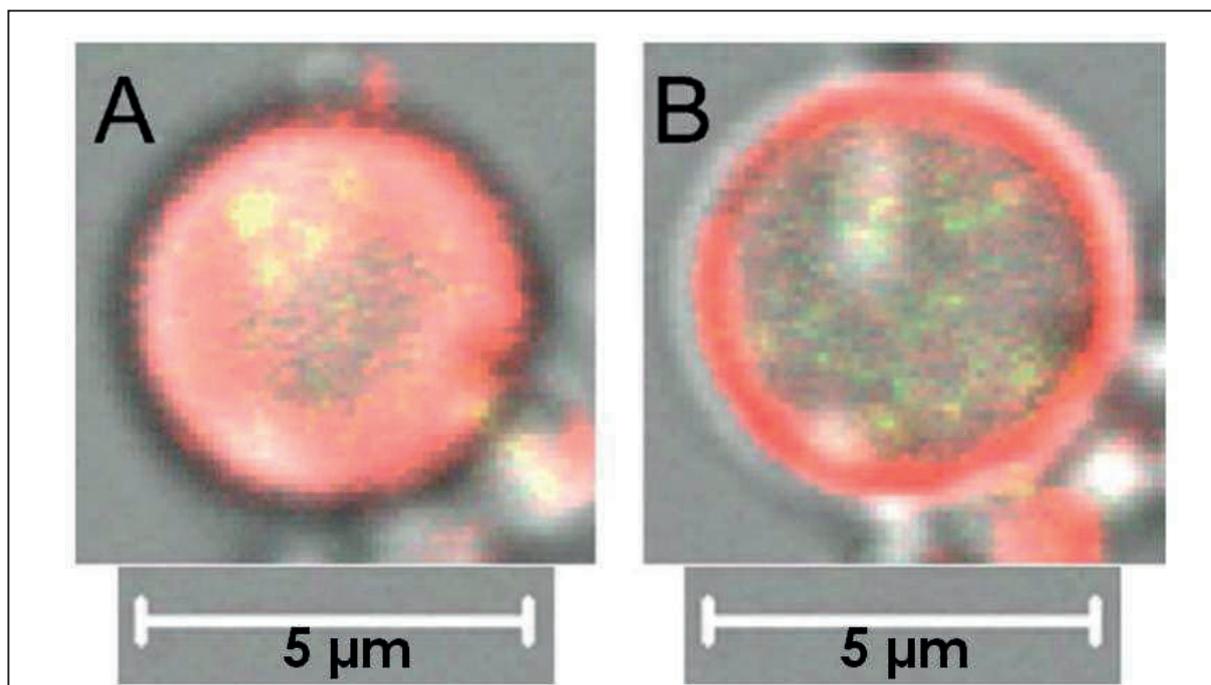


Figure I.11. Coupe transversale d'une particule d'aérosol vecteur de nanoparticules coloré en rouge. Les taches jaunes et vertes sont des nanoparticules : noyau de la particule (A); section transversale de la particule (B). Sham et al. (2004).

Des procédés de broyage humide dans des solvants appropriés peuvent également être utilisés pour le développement de nanoparticules destinées à l'aérosolthérapie, ces méthodes nécessitent généralement l'ajout de grandes quantités de surfactants ou d'autres composés pour contrôler l'agrégation (Chan & Kwok, 2011; Chen et al, 2002; Couvreur et al, 1995). A partir de ces nanoparticules, les techniques d'atomisation peuvent être utilisées pour former des vecteurs submicroniques (Chan & Kwok, 2011). Bien que ces techniques de formation soient efficaces, la création d'un nano-aérosol requiert une re-dispersion des particules, ce qui peut être un vrai défi en raison d'importantes forces de cohésion des particules.

Somme toute, la majorité des études consacrées à la génération d'aérosols nanométriques solides réside encore dans le développement de formulations de nanoparticules qui utilisent des vecteurs solides non-nanométriques.

3.2. Aérosols vectorisés sous forme de particules liquides

De nombreuses études rapportent la formulation des suspensions destinées à la nébulisation de nanoparticules. Dans la plupart de ces études, des nébuliseurs pneumatiques ont été choisis pour produire l'aérosolisation. Dailey et al. (2003) ont introduit un nouveau système de nanoparticules biodégradables sans tensioactif pour l'aérosolthérapie. Pour cela, ils ont formulé des suspensions de nanoparticules à partir d'un polyester ramifié, le PVAL DEAPA--g-PLGA¹, avec des quantités croissantes de carboxyméthylcellulose. Ils ont ensuite démontré que ce nouveau polymère possède une capacité d'encapsulation des molécules de drogue élevée grâce à des interactions électrostatiques. La suspension de nanoparticules résultante peut être nébulisée avec des nébuliseurs pneumatiques ou ultrasoniques, conduisant ainsi à un dépôt alvéolaire. Pandey et al. (2003, 2005) ont étudié la nébulisation de médicaments anti-tuberculeux (rifampicine, isoniazide et pyrazinamide) chargés dans des nanoparticules de PLG² et dans des nanoparticules lipidiques. Des analyses *in vivo* (cobayes) ont montré que la nébulisation de ces suspensions sous forme de nanoparticules conduit à une biodisponibilité supérieure à son administration orale ou

¹ diethylaminopropyl amine-poly (vinyl alcohol)-grafted-poly (lactide-co-glycolide)

² poly(D,L-lactide-co-glycolide)

intraveineuse (Pandey et al. 2003). Dans une autre étude, Yamamoto et al. (2005) a préparé une suspension de nanosphères de PLGA avec la surface modifiée par du chitosane, afin d'améliorer l'administration pulmonaire de la calcitonine par mucoadhésion après le dépôt dans les poumons (Figure I.12).

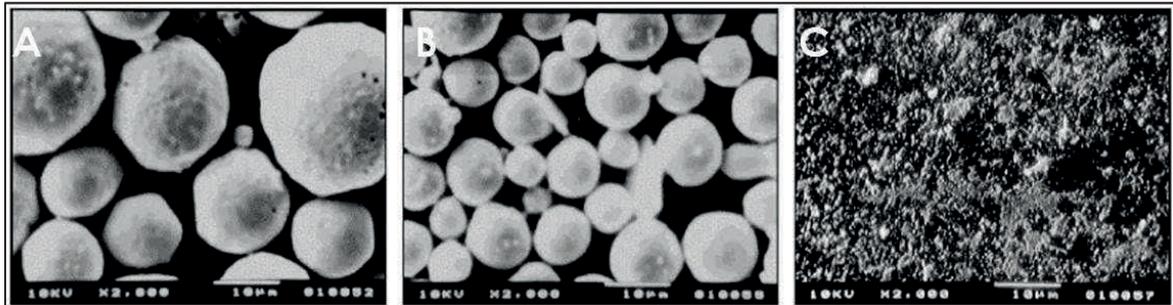


Figure I.12. Microscopie électronique à balayage (MEB) d'une suspension de nanosphères et des microsphères de PLGA. Le diamètre moyen des particules est égal à (a) 12,5 μm (b) 7,07 μm et (c) 0,66 μm . D'après Yamamoto et al. (2005).

Une autre méthode de génération d'aérosols pour des applications pharmaceutiques, l'atomisation électro-hydrodynamique ou électro-nébulisation, peut effectivement produire des gouttelettes de taille micronique ou submicronique hautement monodispersées (Yurteri et al., 2010). Toutefois, dans ce type d'atomisation les taux d'écoulement de liquide sont très faibles par rapport aux systèmes de génération d'aérosol médicaux classiques, et en plus, les gouttelettes résultantes sont électriquement chargées et nécessitent une neutralisation pour pouvoir être efficacement livrées aux poumons (Ijsebaert et al., 2001).

En résumé, bien que la majorité des études développent des suspensions de nanoparticules à visée pulmonaire, le résultat final est souvent une encapsulation dans les gouttelettes non-nanométriques. De cette façon, la taille des particules et le comportement des aérosols résultants ne peuvent pas assurer un dépôt spécifique-alvéolaire.

3.3. Aérosols radiomarqués

Un radiotracteur est une entité composée d'une molécule vectrice et d'un isotope radioactif détectable à l'aide de dispositifs tels que les gamma-caméras ou la tomographie par émission de positons, même à très faible concentration. L'utilisation de radiotraceurs sous forme aérosol est une voie qui permet l'identification et le suivi des particules dans les voies aériennes. Par conséquent, ce type d'aérosol est déjà largement utilisé en Médecine Nucléaire, spécifiquement pour fins diagnostiques, comme dans des examens de scintigraphie de ventilation.

Les aérosols nanométriques destinés à l'inhalation sont de grand intérêt dans les domaines thérapeutiques, diagnostiques et toxicologiques (Cheng et al, 1996; Xi & Longest, 2007; Oberdörster, Oberdörster et Oberdörster, 2005 ; Xi & Longest, 2008a, 2008b ; Jögi et al., 2010 ; Sanchez-Crespo et al., 2011). Afin de pouvoir évaluer l'efficacité thérapeutique et diagnostique des nano-aérosols, le principal défi reste de générer un aérosol nanométrique facilement utilisable pour des études d'inhalation chez l'homme (c'est-à-dire, avec des données toxicologiques bien connues), avec radiomarquage stable et une granulométrie bien définie. Ainsi, la conception d'un aérosol vectorisé sous forme de particules radiomarquées de taille nanométrique apparaît fondamental pour examiner expérimentalement le dépôt des nanoparticules et leur clairance dans les poumons.

Les aérosols radiomarqués sont considérés comme le moyen le plus approprié pour étudier les modèles atmosphériques de dépôt des nanoparticules ainsi que la clairance pulmonaire (Möller et al, 2006; Sanchez-Crespo et al, 2011; Carvalho, Peters, et Williams, 2011).

Un exemple d'aérosol vectorisé sous forme des particules nanométriques radiomarquées est le Technegas. Les départements de médecine nucléaire des hôpitaux européens sont généralement équipés de générateurs de Technegas (*Technegas Generator*). L'aérosol produit par ces appareils est connu sous le nom Technegas, même si ce n'est pas un vrai gaz, mais une dispersion ultrafine de particules de carbone marquées au technétium (^{99m}Tc). Depuis plus de deux décennies, cet aérosol radioactif est régulièrement utilisé en Europe comme un agent de scintigraphie de ventilation, sans aucun problème toxicologique (Jögi et al, 2010 ; Senden et al, 1997; Lloyd et al, 1995; Burch, Sullivan, et McLaren, 1986). En raison de la courte demi-vie du ^{99m}Tc (6.02 h), la dose de

rayonnement peut être maintenue bas ($<0,1$ mSv), tout en offrant des images scintigraphiques de haute qualité en Médecine Nucléaire. De ce fait, le Technegas ainsi que de nouveaux aérosols radiomarqués basés sur la technologie Technegas (par exemple « Gallgas » (Borges et al. 2011) et « In-Technegas » (Sanchez-Crespo et al., 2011)) semblent être les plus intéressants moyens de réaliser des procédures expérimentales d'inhalation et de clairance chez l'homme en bon accord avec les attentes éthiques.

La génération du Technegas a été rapportée pour la première fois en 1986 comme une procédure utilisant un éluant de ^{99m}Tc dans un creuset en graphite à 2500°C (Burch, Sullivan, et McLaren, 1986). Toutefois, ce n'est que dix ans après son invention, grâce au travail de Senden et al. (1997), que la nature physico-chimique du Technegas a été élucidée. Ces auteurs suggèrent que la formation et la stabilisation de la particule active dans le Technegas étaient principalement dépendantes du réducteur chimique (le carbone), de la volatilisation rapide de l'éluant et de la passivation de la surface de l'aérosol métallique résultant. Toutefois l'exactitude du mécanisme physico-chimique de formation du Technegas reste encore sans consensus.

La technique de génération du Technegas est divisée en deux étapes : le *simmer stage* et le *burn stage*. La production de l'aérosol commence par une modification de la composition du gaz de la chambre du générateur, grâce à une purge d'argon de 6 minutes, accompagnée d'un léger chauffage du creuset jusqu'à 80°C , i.e. le *simmer stage*. Dans ces conditions l'éluant est évaporé, offrant ainsi un contact intime entre le creuset et la solution de pertechnétate de sodium. Par la suite, commence le *burn stage*. Lors de cette phase, le creuset est finalement chauffé à 2550°C pendant 10 secondes. Ce chauffage conduit à l'évaporation du technétium et du carbone suivie de leur condensation et de la formation de l'aérosol (Figure I.13) (Jogi et al, 2010 ; Senden et al, 1997;.. Lloyd et al, 1995;.. Burch, Sullivan, et McLaren, 1986).

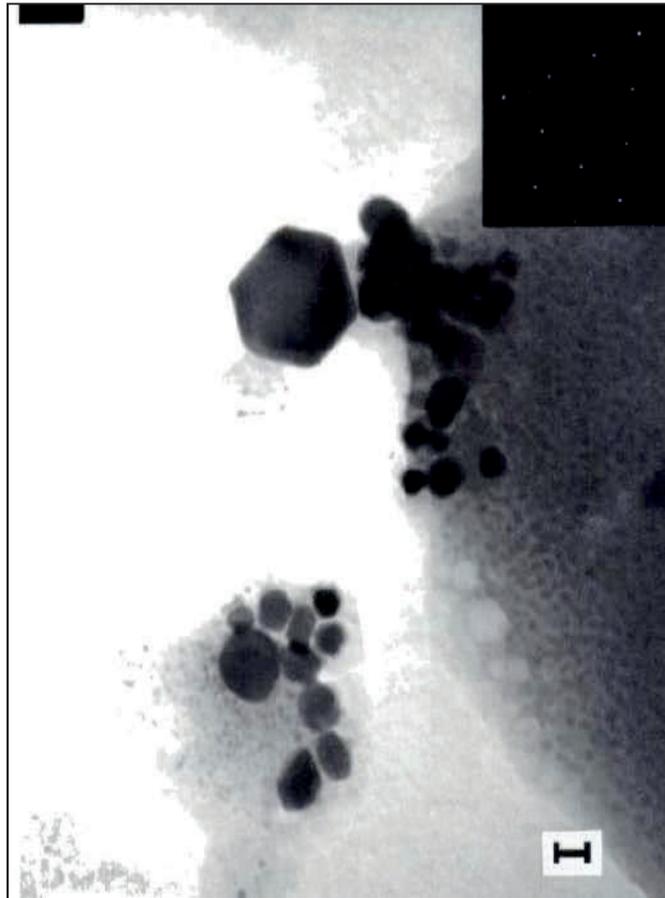


Figure I.13. Microscopie électronique à transmission (MET) d'un cluster typique des particules de Technegas précipitées, considérées comme des plaquettes quasi-parfaitement hexagonales. L'échelle est de 20 nm. L'encart montre un diagramme de diffraction d'électrons d'une plaquette unique. Senden et al. (1997).

Bien qu'il soit généralement accepté que le Technegas ait une taille de particule plus petite que les autres aérosols radiomarqués classiques (par exemple les aérosols ^{99m}Tc -DTPA produits par des nébuliseurs pneumatiques de médecine nucléaire: Swirler - Amici et Venticis II - CISBIO), peu de données sont disponibles sur sa granulométrie, ainsi le diamètre moyen en nombre de ses particules s'étend de 200 à 400 nm (Borges et al 2011, Lemb et al, 1993;.. Strong & Agnew, 1989; Möller et al, 2006). En plus, il n'y a pas d'informations sur le diamètre aérodynamique moyen en activité (DAMA) du Technegas, i.e. le diamètre moyen de l'aérosol tenant en compte que les particules radiomarquées.

L'expérience clinique en médecine nucléaire indique que les particules radiomarquées du Technegas sont susceptibles de se déposer par impaction lors du passage d'obstructions dans les voies respiratoires (Figure I.14), ce qui est un comportement caractéristique des aérosols de taille micrométrique. Les dépôts localisés de Technegas à cause d'obstructions (*Hot-spots*) peuvent rendre difficile l'interprétation des scintigraphies de ventilation pulmonaire. Par conséquent, de nouvelles perspectives sur l'utilisation des aérosols produits par le générateur Technegas dépendent essentiellement d'une élimination des particules micronique présentes ainsi que la détermination précise de la granulométrie de ses particules radiomarquées (actives).

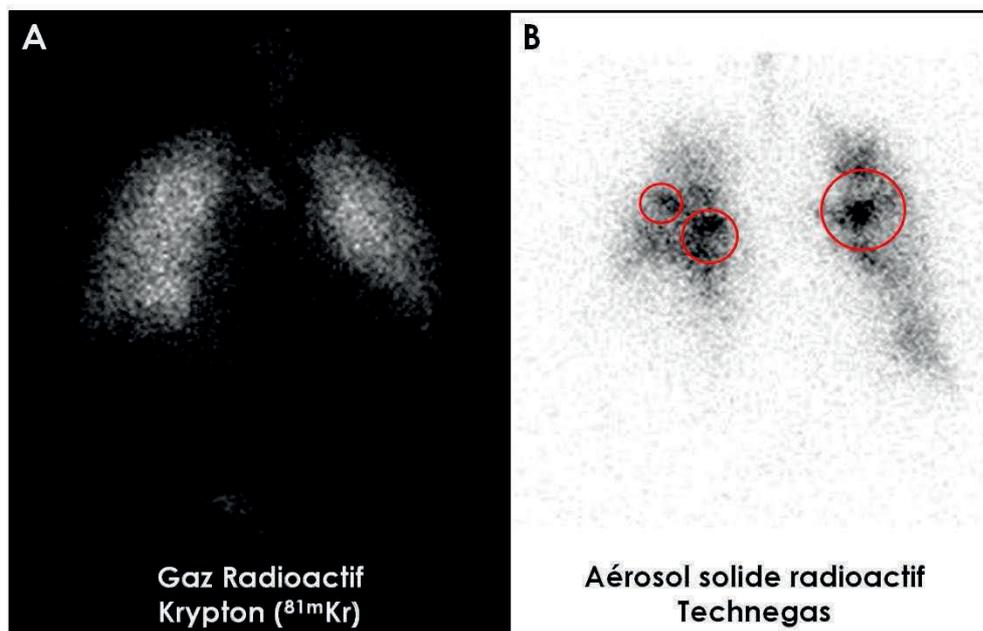


Figure I.14. Images de scintigraphie de ventilation d'un patient atteint d'obstructions pulmonaires en utilisant le gaz radioactif Krypton (A) versus le Technegas (B) : les cercles rouges signalent la présence des dépôts localisés (*hot-spots*) des particules du Technegas qui peuvent conduire à une mauvaise interprétation du diagnostic.

Une meilleure compréhension de la génération des aérosols nanométriques à partir du générateur Technegas a été obtenue à partir du travail initié par Möller et al. (2006). Ces auteurs ont exécuté et testé plusieurs modifications sur les conditions de fonctionnement du générateur commercial (utilisé en mode de maintenance) afin d'améliorer la stabilité chimique des particules et contrôler la taille et la concentration en nombre des particules de l'aérosol. Pour aboutir à cette optimisation les auteurs ont proposé des techniques permettant de diminuer la lixiviation des

particules radioactives, i.e. des techniques pour éviter l'extraction des particules radioactives lors de la génération de Technegas :

- Le remplacement des tubes de PVC de la conduite de gaz d'argon à partir du réservoir vers la chambre d'aérosol du générateur par des tubes métalliques ;
- La purification d'avantage du gaz argon (99,999%) avec l'élimination de vapeur d'eau, d'oxygène et de substances organiques en utilisant des filtres d'absorption appropriés / unités de filtration (Oxisorb, Messer Griesheim, Allemagne) ;
- L'augmentation du volume de balayage de l'argon dans la chambre aérosol avant le chauffage du creuset (15 min de balayage, considérant que le standard est de 5 min), afin de mieux éliminer l'oxygène présent dans la chambre ;
- Suppression de la solution saline de l'éluat par une colonne échangeuse d'ions : parce que le NaCl présente dans l'éluat est formé de particules très hygroscopiques qui finissent pour former des cristaux hygroscopiques et pour lixivier les marqueurs radioactifs lors de l'évaporation.

Des mesures pour contrôler la taille des particules ont été également étudiées :

- Faire varier la température de chauffage du creuset en graphite entre 2400 et 2700°C par le potentiomètre interne du circuit de commande de chauffage du générateur ;
- Faire varier le temps de chauffage entre 1 et 10s à l'aide d'un système électronique supplémentaire (Time relay UF3, Kuhnke, Malente, Allemagne).

Les résultats obtenus par Moller et al. (2006) montrent que la suppression de solution saline de l'éluat de ^{99m}Tc garantit les propriétés non hygroscopiques de l'aérosol résultant et arrive à réduire le taux de lixiviation des particules jusqu'à 4% dans les 24 heures (12% dans des conditions normales) (Figure I.15).

L'étude de Möller et al. (2006) a également montré que l'augmentation du temps de résidence de l'aérosol dans la chambre favorise l'agglomération des particules et l'augmentation de la taille

moyenne, suivie d'une diminution de la concentration en nombre de particules et une diminution de l'écart-type géométrique (Figure I.16). En plus, il a été démontré que le diamètre moyen en nombre de particules augmente linéairement avec l'augmentation de la température de chauffage du creuset, i.e. la température de synthèse du Technegas (Figure I.17).

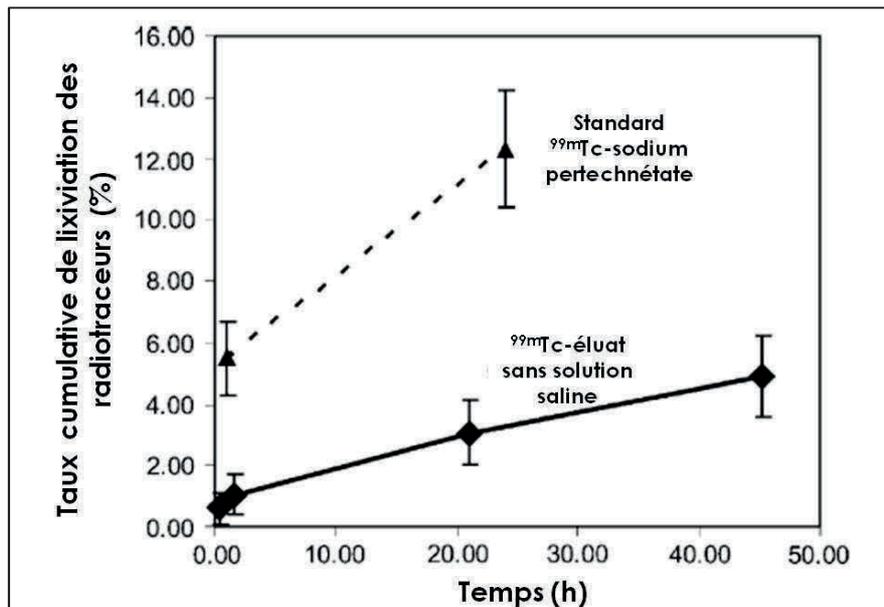


Figure I.15. Taux de lixiviation des particules de Technegas générées en utilisant le ^{99m}Tc -pertechnétate de sodium standard (trait pointillée) ou le ^{99m}Tc -éluat sans solution saline (trait plein). Adapté de Möller et al. (2006).

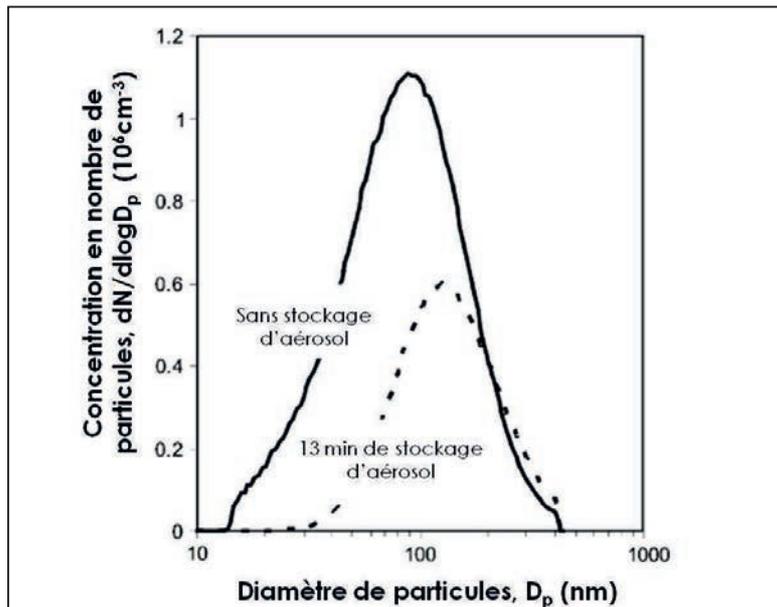


Figure I.16. Distribution de la taille des particules mesurée directement après la génération de l'aérosol (sans stockage – trait plein) et avec un temps de résidence de 13 minutes (trait pointillée). Tous les aérosols ont été générés avec le ^{99m}Tc -éluat sans solution saline et dilués dans un sac conducteur de 15 L immédiatement après la génération. Adapté de Möller et al. (2006).

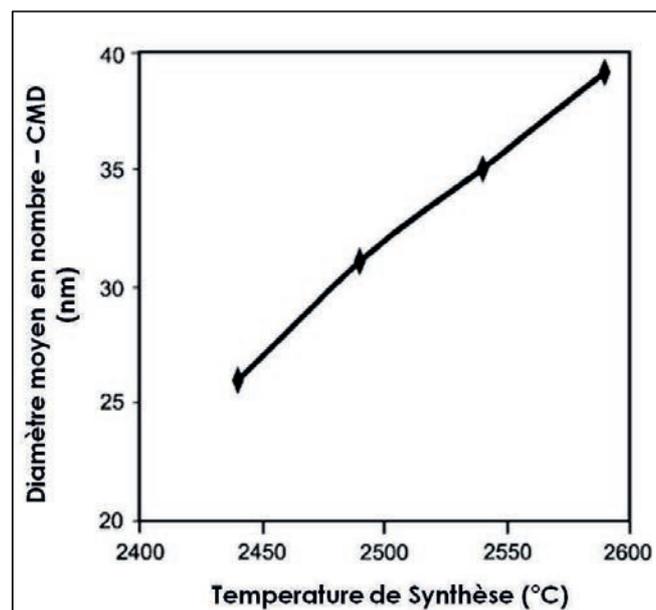


Figure I.17. Dépendance du diamètre moyen des particules (CMD – *count median diameter*) en fonction de la température de synthèse. Adapté de Möller et al. (2006).

Finalement, les résultats montrent aussi que des temps de chauffage plus court (*burn stage*) (2 s) et une dilution immédiate de l'aérosol dans un sac conducteur résultent en la génération de particules stables ultrafines de Technegas, dont le diamètre médian en nombre varie entre 40 et 100 nm (versus le standard de 200 nm), avec un écart-type géométrique de 1,6.

Bien que l'étude réalisée par Möller et al. (2006) a élucidé et optimisé les procédures de génération du Technegas, il subsiste encore un manque de connaissances du DAMA des aérosols radioactifs produit par le générateur de Technegas, alors que ce paramètre est essentiel pour caractériser les particules « actives », car en effet ce sont les particules actives qui apparaissent sur l'image scintigraphique utilisée pour l'interprétation du dépôt.

4. CARTOGRAPHIE DE DEPOT DES AEROSOLS SUBMICRONIQUES ET NANOMETRIQUES

Le système respiratoire humain est divisé en trois grandes parties (Figure I.18):

- Les voies aériennes supérieures, ou région extrathoracique, constituées du nez, de la bouche, du pharynx et du larynx ;
- La région trachéobronchique, ou thoracique, qui comprend la trachée, les bronches et les bronchioles ;
- La région alvéolaire, composée des bronchioles respiratoires (non cartilagineuses) et des alvéoles, où le transfert d'oxygène est réalisé.

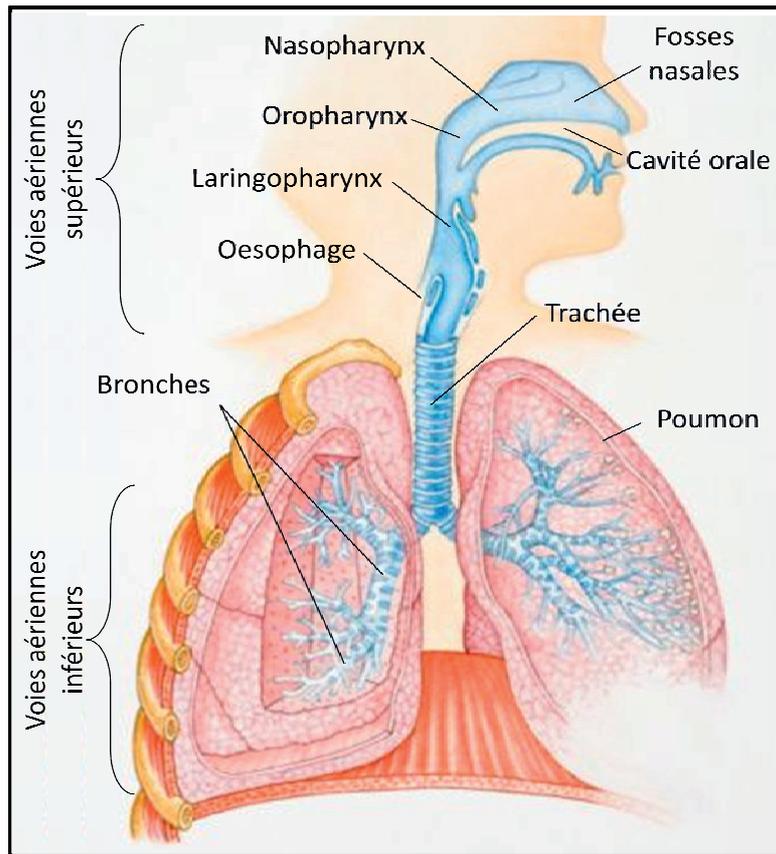


Figure I.18. L'anatomie du système respiratoire humain.

4.1. Les mécanismes de dépôt

Une fois les particules d'un aérosol à l'intérieur du système respiratoire, elles peuvent se déposer sur les différentes parties de celui-ci. Le dépôt dans les voies respiratoires dépend de différents facteurs : le diamètre des particules et leur vitesse de déplacement *in situ*, mais aussi les propriétés géométriques et physiques des voies aériennes (i.e., diamètre et courbure des voies). Cinq mécanismes distincts interviennent dans cette déposition : l'impaction, la sédimentation, la diffusion, l'interception et la déposition électrostatique (Faurisson, 1996 ; Hinds, 1999 ; Zhang et al, 2011).

Le phénomène d'impaction résulte du changement de direction des particules lorsqu'elles rencontrent un obstacle. Il se produit lorsque l'énergie cinétique de la particule l'emporte sur ses forces de cohésion avec l'air en mouvement. La particule va alors s'impacter sur l'obstacle au lieu de suivre les lignes de courant de l'air porteur. Dans le cas du système respiratoire, cet obstacle

peut être une bifurcation, comme celle où la trachée se divise en deux bronches. Le dépôt des particules par impaction se situe majoritairement au niveau des voies aériennes supérieures (ORL) et concerne les particules de tailles plus importantes (DAMM supérieures à $5\mu\text{m}$) (Figure I.19) (Faurisson, 1996 ; Hinds, 1999 ; Zhang et al, 2011).

La sédimentation résulte de la force de pesanteur qui agit au sein de régions de faibles dimensions et qui sont traversées par l'air à une vitesse également faible, i.e., la trachée, les bronches et les voies horizontales des bronchioles et de la région alvéolaire. Ce type de mécanisme est plutôt représentatif des gouttelettes de taille moyenne (DAMM entre 2 et $6\mu\text{m}$), dépendant ainsi du débit, de la taille et de la densité de ces particules, et augmentant avec le temps d'inspiration (Figure I.19) (Faurisson, 1996 ; Hinds, 1999 ; Zhang et al, 2011).

La diffusion est provoquée par le mouvement brownien des particules, plus précisément, le dépôt de particules diffusées est causé par le choc des particules projetées contre les parois des voies respiratoires sous l'effet de son agitation moléculaire. Ce mécanisme correspond au régime thermodynamique, ainsi le dépôt augmente avec le temps d'inspiration et est indépendant de la densité de la particule et du débit. La diffusion est un phénomène important pour les particules qui possèdent un très grand coefficient de diffusion, comme les particules ultrafines ($< 100\text{ nm}$), qui vont se déposer dans les voies aériennes plus petites comme la région alvéolaire (Figure I.19). Cependant, le petit diamètre des particules ultrafines est également associé à une faible fraction inhalable, qui peut être un facteur limitant pour assurer une délivrance pulmonaire efficace (Longest et al, 2012).

D'autres mécanismes de dépôt de moindre importance, et habituellement négligeables sont l'interception et la déposition électrostatique. La première est appliquée seulement aux particules de forme allongée et se produit lorsque l'extrémité d'une particule, sans se dévier de la trajectoire du fluide, entre en contact avec la surface de la voie aérienne à cause de ses dimensions physiques. Le deuxième mécanisme, la déposition électrostatique, survient seulement lorsque les particules sont fortement chargées électriquement. Dans ce cas, elles induisent une charge électrique de signe contraire des voies aériennes, et sont donc attirées par celles-ci, tout en étant

soumises à une répulsion avec les particules voisines (dans le cas où celles-ci sont des mêmes charges) (Figure I.19).

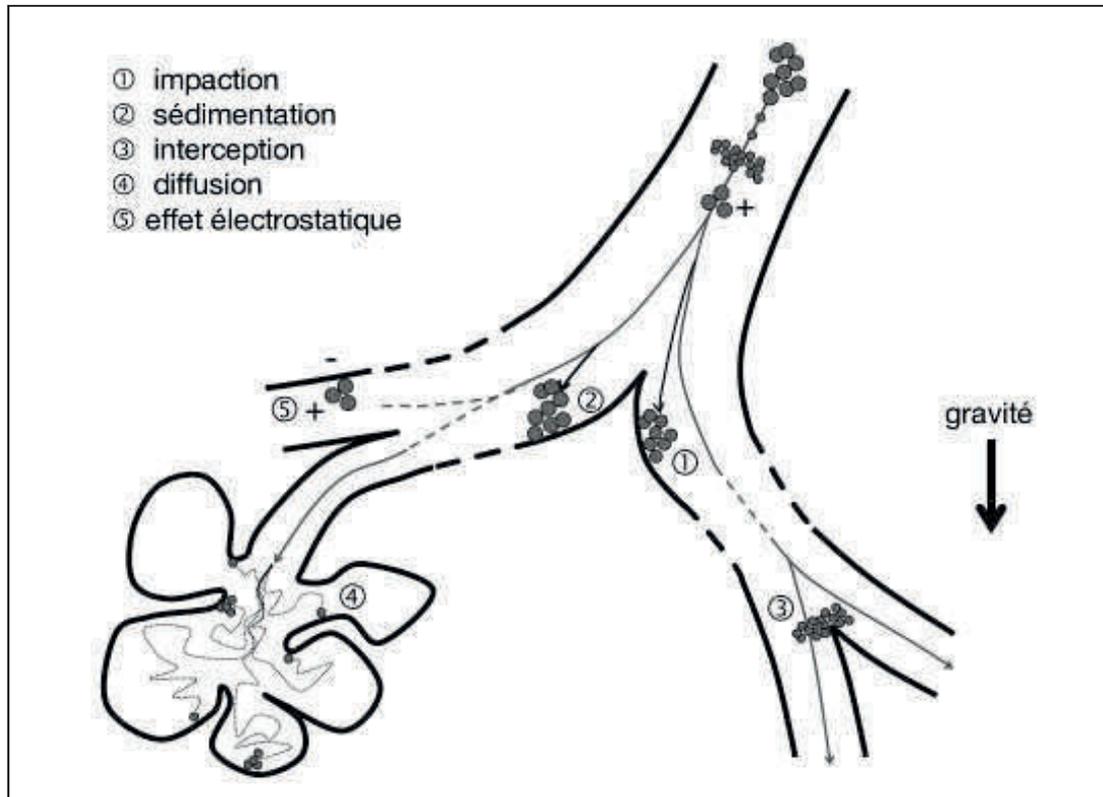


Figure I.19. Illustration des différents mécanismes de dépôt des particules inhalées dans les voies respiratoires. Hervé-Bazin (2007).

Le site de dépôt des particules d'un aérosol dans les voies respiratoires est donc fonction du diamètre aérodynamique des particules, qui à son tour, est directement soumis aux mécanismes d'impaction, sédimentation et diffusion (Hinds, 1999). Effectivement, comme démontre la Figure I.20 (ICRP, 1994) les principaux sites de dépôt peuvent être décrits par trois grandes gammes de taille de particules : les particules de l'ordre micrométrique, de 1 à 10 μm ; les particules de l'ordre nanométrique, de 10 à 100 nm et les particules submicroniques intermédiaires, de 200-500 nm.

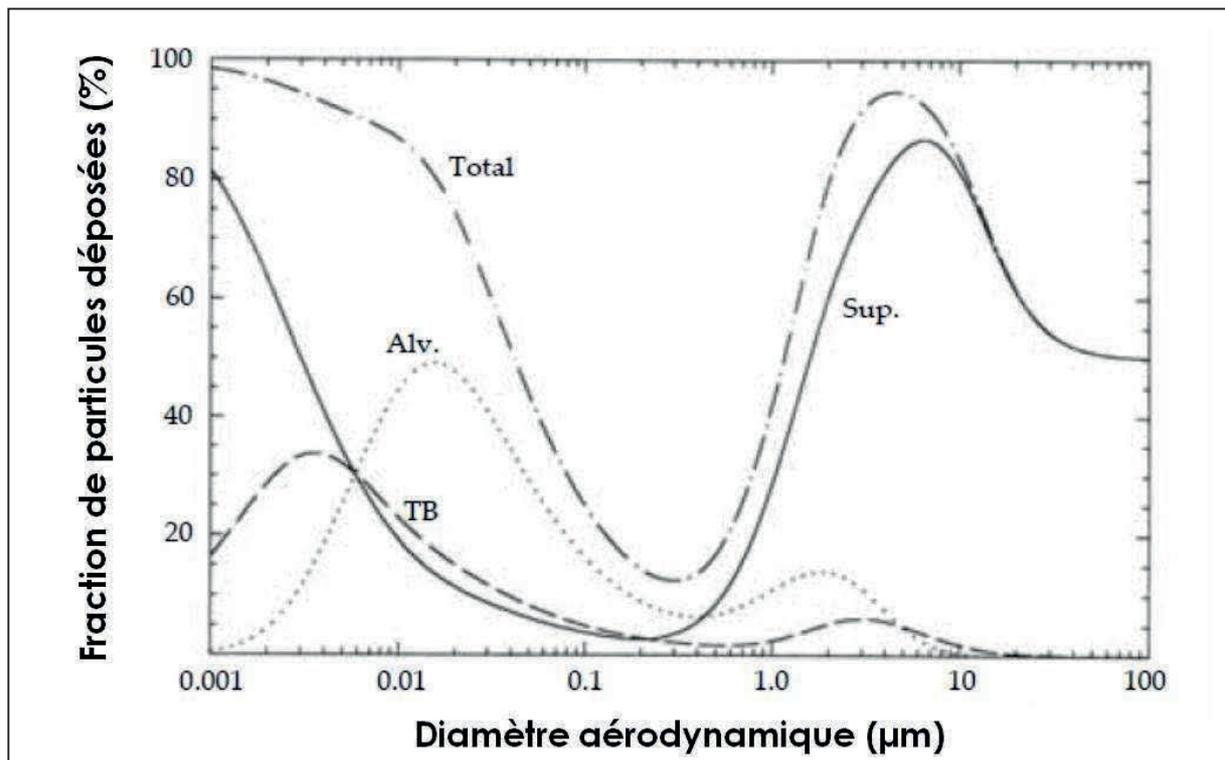


Figure I.20. Pourcentage des particules déposées dans l'ensemble de l'appareil respiratoire (Total) et dans les différentes régions de celui-ci, en fonction de la taille. Alv. : Région alvéolaire. TB : Région trachéobronchique. Sup. : Voies aériennes supérieures. (ICRP, 1994).

Comme montré dans la figure I.20, les particules de l'ordre du micromètre, de 1 à 10 µm sont majoritairement liées à un dépôt par impaction dans les voies aériennes supérieures, car dans cet ordre de taille, les particules ont un comportement inertiel assez important. Ce comportement inertiel augmente avec la taille. Au-dessus de 10 µm, la taille devient trop grande et les particules commencent à ne plus être inhalées. D'autre part, les particules nanométriques, de 10 à 100 nm, ont un coefficient de diffusion très important et leur comportement inertiel est négligeable. Elles se déposent alors de préférence dans la région alvéolaire, et d'autant plus que leur taille devient petite (le coefficient de diffusion augmente lorsque la taille diminue). Néanmoins, les particules de moins de 10 nm ont un coefficient de diffusion tellement élevé, qu'elles vont se déposer par diffusion même dans les voies aériennes supérieures, qui ont des dimensions plus grandes. Finalement, les particules submicroniques intermédiaires, de 200-500 nm, sont majoritairement exhalées, se déposant faiblement dans les voies respiratoires. En effet, pour ces particules aucun des mécanismes décrits n'est significatif. Ainsi, ces particules suivent l'air respiré, sont inhalées puis exhalées sans se déposer dans aucune des trois régions du tractus respiratoire.

Il est néanmoins important de préciser que le dépôt des particules peut varier aussi en fonction des facteurs anatomiques de l'individu : le sexe, l'âge, les pathologies pulmonaires, ainsi que ses paramètres respiratoires et son activité physique. Par exemple, les obstructions bronchiques dans le cas des patients souffrant de BPCO peuvent entraîner des dépôts localisés des particules. Le rôle des obstructions pulmonaires dans le dépôt des particules a été analysé dans l'étude clinique réalisé par Magnant et al. (2006). Dans cette étude les auteurs ont comparé les résultats des scintigraphies de ventilation chez des patients atteints de BPCO en utilisant deux différentes approches : des aérosols (Technegas et un aérosol de $4.5\mu\text{m}$ nébulisé avec du $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$) et des gaz radioactifs ($^{81\text{m}}\text{Kr}$ et ^{133}Xe). Les résultats ont montré que l'aérosol micrométrique de $^{99\text{m}}\text{Tc-DTPA}$ ($4.5\mu\text{m}$) était caractérisé par un dépôt plus élevée dans les régions centrales par rapport au ^{133}Xe , ce qui peut être associé au phénomène d'impaction inertielle des particules de l'aérosol (Figure I.21). Pour ce qui concerne le Technegas, il possède plus submicrométrique, les résultats ont montré un dépôt des particules significativement plus élevé dans les parties inférieures des poumons par rapport à la distribution $^{81\text{m}}\text{Kr}$, ce qui peut être expliqué par le phénomène de sédimentation des particules (Figure I.22). Nonobstant, le dépôt préférentiel des particules dans les régions inférieures pourrait également être influencé par la technique d'inhalation utilisée. L'inhalation d'aérosols à partir de la capacité résiduelle fonctionnelle contribue à un dépôt préférentiel dans les lobes inférieurs alors qu'une inspiration profonde suivie d'une apnée courte homogénéise la déposition pulmonaire. Néanmoins ces modes d'inhalation sont difficiles à réaliser pour les patients atteints des obstructions dans des voies respiratoires (Faurisson, 1996; Magnant et al. 2006).



Figure I.21. Scintigraphies de ventilation chez un patient de 80 ans atteint de BPCO dans stade léger ($FEV_1 = 60\%$; $FEV_1/FVC = 64\%$; $FEF_{25-75} = 30\%$; $RV/TLC = 104\%$)³ et avec une baisse ratio I/E⁴ = 0.6 . Remarquable impaction des particules de l'aérosol $^{99m}Tc-DTPA$ ($4.5\mu m$) dans la région centrale des poumons (figurent comme des *hot spots* dans l'image scintigraphique) (C) par rapport à la distribution de dépôt avec ^{133}Xe (A) et ^{81m}Kr (B). Magnant et al. 2006.

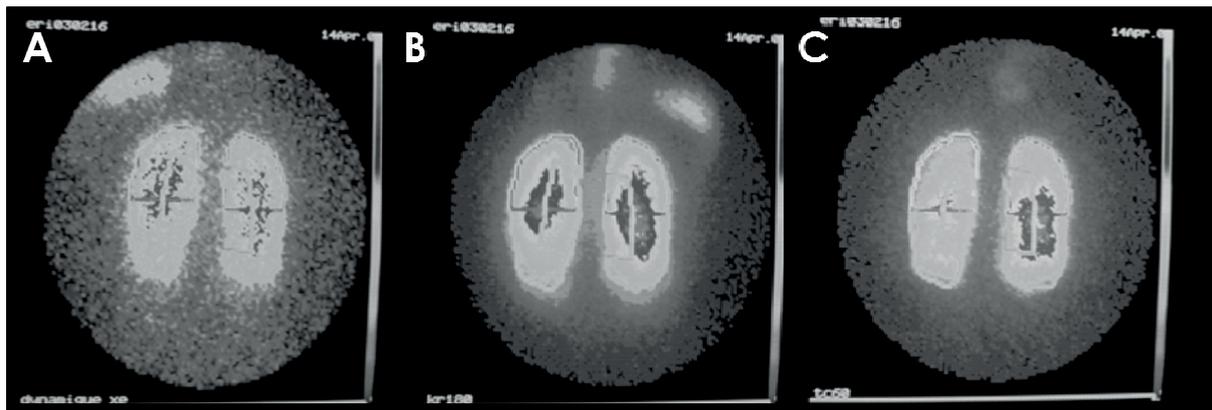


Figure I.22. Scintigraphies de ventilation chez un patient de 71 ans atteint de BPCO dans stade léger ($FEV_1 = 68\%$; $FEV_1/FVC = 64\%$; $FEF_{25-75} = 21\%$; $RV/TLC = 107\%$). Bonne corrélation entre les trois méthodes utilisés : ^{133}Xe (A), ^{81m}Kr (B) et Technegas (C). Un dépôt significativement plus élevé dans les parties inférieures des poumons est observé dans la scintigraphie avec du Technegas (C). Magnant et al. 2006.

³ Tests de fonction pulmonaire : volume expiratoire maximal en 1 seconde (FEV_1) ; volume expiratoire forcé en 1 seconde / capacité vitale forcée (FEV_1/FVC), forcé la mi-débit expiratoire (FEF_{25-75}), volume résiduel/ capacité pulmonaire totale (VR / CPT)

⁴ Paramètre respiratoire du patient : volume inspiratoire / volume expiratoire (I / E)

4.2. Les modèles de cartographie de dépôt

Au cours des dernières années, plusieurs groupes de chercheurs se sont intéressés au développement de modèles pour identifier les sites de dépôt des particules aérosolisées. Cette recherche sur des nouvelles techniques de cartographie de dépôt a été fortement encouragée en raison des coûts élevés et des risques prohibitifs liés aux essais précliniques chez les humains (Longest & Holbrook, 2011). Les modèles développés vont des logiciels mathématiques destinés à la simulation du dépôt dans le tractus respiratoire versus la taille des particules, jusqu'à des modèles mimétiques humains, les méthodes *in vivo* chez le primate ou des modèles plastinés. Toutefois, chaque modèle présente des limitations qui lui sont propres, ce qui les rend complémentaires pour la détermination de la cartographie des dépôts des aérosols dans le tractus respiratoire.

4.2.1. Les modèles mathématiques (LUDEP et MPPD)

Une modélisation mathématique du dépôt des aérosols requiert la connaissance de nombreux paramètres, comme l'anatomie du tractus respiratoire, les paramètres de ventilation, la dynamique de l'écoulement, le mode de dépôt des particules et les équations de simulation du dépôt. De plus, ces facteurs sont corrélés, la morphologie du poumon et les conditions de respiration déterminant la dynamique de l'écoulement qui à son tour affecte le dépôt des particules (Martonen, 1993).

Le modèle mathématique de cartographie de dépôt le plus utilisé est celui de l'ICRP (International Commission on Radiological Protection). Il est né de la nécessité d'évaluation des risques liés à l'exposition potentielle aux aérosols radioactifs. Après plusieurs années de recherche et d'amélioration continue des modèles théoriques de dépôt, le groupe de chercheurs de l'ICRP a fini par développer un logiciel capable de déterminer rapidement la cartographie du dépôt des particules dans le tractus respiratoire humain, le LUDEP (Lung Dose Evaluation Program). Ce logiciel permet ainsi de calculer le dépôt d'un aérosol chez l'homme adulte, avec les options de choix du mode de respiration (par la bouche ou le nez), différenciés parmi les 5 régions anatomiques suivantes (ICRP, 1995):

- Les deux zones extrathoraciques : le conduit nasal antérieur (ET1) et la région extrathoracique principale : bouche-pharynx-larynx (ET2) ;

- La trachée et les grosses bronches : générations 1 à 8 (BB) ;
- Les petites bronches et les bronchioles : générations 9 à 16 (bb) ;
- Les conduits et sacs alvéolaires (AI).

Néanmoins, comme tous les modèles existants, le logiciel LUDEP présente des limites. D'abord il est restreint à un modèle d'homme adulte, ensuite il a été élaboré spécifiquement pour calculer les doses de radioactivité inhalées et absorbées par des travailleurs exposés à des aérosols radioactifs dans leur environnement de travail, induisant des différences non négligeables par rapport à l'usage médical d'un aérosol. Par exemple, les facteurs de respiration utilisés (volume courant et débit inspiratoire) sont différents de ceux d'un patient au cours d'une séance d'aérosolthérapie ; également, la vitesse des particules inhalées est plus faible qu'avec un aérosol médical ; le modèle ne concerne pas les voies respiratoires d'un homme atteint de maladie respiratoire obstructive ; et enfin, le modèle est adapté à l'inhalation de particules radioactives présentes dans l'atmosphère, particules qui sont sèches et se comportent différemment des gouttelettes d'aérosol (Majoral, 2007).

Un autre logiciel de prédiction des dépôts, mieux adapté aux aérosols médicaux, est le MPPD (Multiple Path Particle Dosimetry model). Ce logiciel a été initialement développé par l'Institut Toxicologique de l'Industrie Chimique (CIIT, actuel *The Hammer Institutes for Health Sciences*) conjointement avec l'Institut National Néerlandais pour la Santé Publique et l'Environnement (RIVM). Les avantages de ce modèle sont de permettre de prédire le dépôt chez l'humain ou chez le rat, ainsi que de calculer la clairance pulmonaire pour des particules de $0.01\mu\text{m}$ à $20\mu\text{m}$. Il permet également le choix entre cinq modèles de poumon : (I) le modèle symétrique de Yeh-Schum ; (II) le modèle à 5 lobes de Yeh-Schum ; (III) le modèle de poumon stochastique ; (IV) le modèle symétrique spécifique de l'âge ; (V) le modèle à 5 lobes spécifique de l'âge (Anjilvel & Asgharian, 1995). Pour tous les modèles de poumon le logiciel prédit les fractions régionales de dépôt dans la zone ORL (Head), la région trachéobronchique (TB), la région pulmonaire (P) et le dépôt total, c'est-à-dire la fraction totale déposée (Total) (Figure I.23).

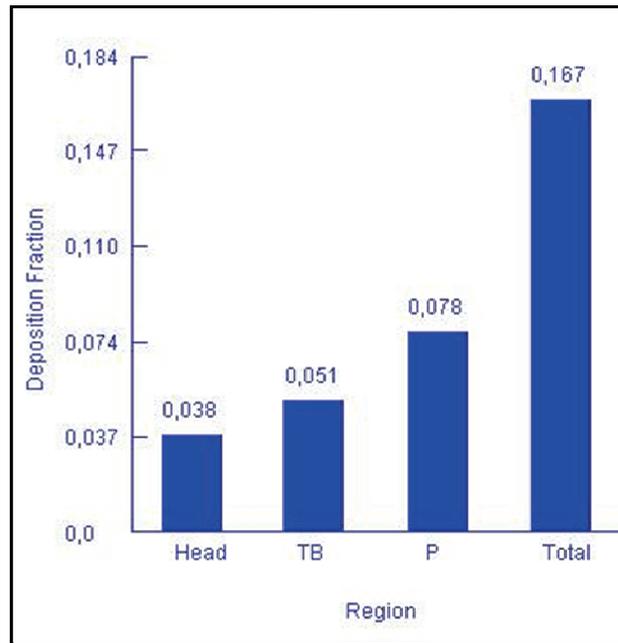


Figure I.23. Démonstration de la répartition des résultats de dépôt calculés par le logiciel MPPD : caractérisation du dépôt d'un aérosol de DAMM de 0.5 µm (concentration de 1g/cm³) prenant en compte les paramètres respiratoires classiques d'un adulte.

4.2.2. Les modèles anatomiques stéréolithographiés

La stéréolithographie est utilisée en médecine depuis les années 90 pour créer des modèles anatomiques en 3D à partir des données obtenues par l'imagerie médicale (Storey-Bishoff et al., 2008 ; Golshahi et al., 2011). Cette technique, également connue sous le nom d'impression 3D, est un procédé de prototypage rapide qui permet de fabriquer des objets solides à partir d'un modèle numérique. La stéréolithographie vise à construire une pièce à travers plusieurs couches successives, employant une résine durcissable aux ultraviolets et un laser ultraviolet. Pour chaque couche, un faisceau laser trace une section transversale du motif de la pièce sur la surface de la résine liquide. Ensuite, l'exposition aux ultraviolets polymérise le motif tracé sur la résine et la relie à la couche inférieure et ainsi successivement (Figure I.24).

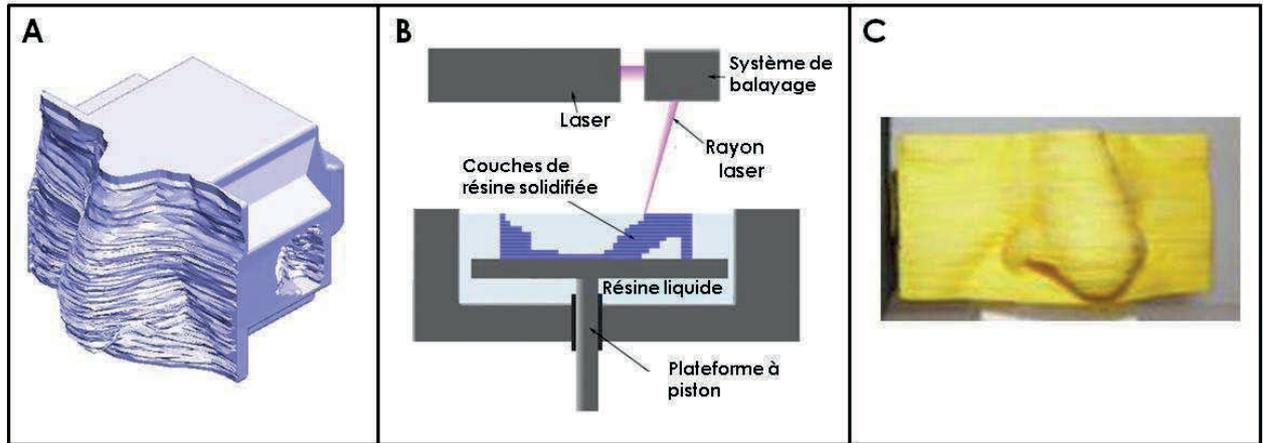


Figure I.24. Les étapes de production d'un modèle stéréolithographié : I - modèle numérique 3D construit à l'aide d'un logiciel de CAO (SolidWorks) à partir des scanners de la région ORL (A) ; II - schéma du principe de fonctionnement d'une imprimante 3D pour la construction des modèles stéréolithographiés (B) et III – un modèle stéréolithographié fini (C).

Les problématiques d'ordre éthique liées aux essais *in vivo* induisent une utilisation de plus en plus répandue des modèles anatomiques stéréolithographiés pour la cartographie de dépôt des aérosols (Storey-Bishoff et al., 2008 ; Golshahi et al., 2011). Toutefois, l'utilisation de ce type de modèle *in vitro* est limitée par l'impossibilité de construction des parois très fines, ce qui empêche la modélisation de ramifications du système respiratoire, comme les bronchioles et alvéoles. En plus, ce type de modèle en résine possède aussi l'inconvénient d'être trop rigide, non déformable et aussi pour l'absence de mucus en surface. De ce fait, les modèles stéréolithographiés sont préférentiellement utilisés pour simuler les voies aériennes supérieures (sphère ORL) dans des études de cartographie de dépôt des aérosols.

4.2.3. Les modèles anatomiques plastinés

La plastination est une technique de conservation anatomique utilisée depuis les années 80 qui consiste à éterniser les spécimens en extrayant l'eau et les graisses des tissus qui seront remplacés par des résines (polymères). L'architecture est ainsi préservée jusqu'à l'échelon cellulaire, résultant en modèles anatomiques secs, facilement manipulables et non périssables. Cette technique représente une avancée majeure dans l'enseignement des sciences biologiques mais aussi dans la modélisation du dépôt des aérosols (Durand, 2008). Les principes de la plastination résident dans quatre grandes étapes : (I) la fixation dans du formol à 10% (à 4°C, pendant laquelle peut avoir

lieu une dissection); (II) la déshydratation et le dégraissage (dans l'acétone à -25°C), où a lieu le remplacement de l'eau et des lipides des tissus par substitution à froid ; (III) l'imprégnation forcée, sous vide dans un bain de silicone, entraînant une dépression relative à l'intérieur des tissus qui à son tour va induire l'entrée du polymère à l'état liquide dans ceux-ci, en permettant une stabilisation des membranes cellulaires ; et enfin la polymérisation (IV), qui permet d'obtenir une pièce stabilisée dont les qualités seront dépendantes des tissus, des résines et du résultat souhaité (Durand et al., 2011b).

Des modèles plastinés des voies aériennes supérieures sont désormais utilisés pour la cartographie de dépôt des aérosols, plus précisément pour la détermination du dépôt de médicament dans les sinus maxillaires (Figure II.25) (Durand et al., 2011b). L'utilisation des spécimens plastinés montre des résultats très satisfaisants et des prédictions réalistes par rapport à d'autres modèles *in vitro*. Cela est possible grâce aux avantages uniques de ces modèles : ils possèdent un comportement anatomique et aérodynamique très semblable à l'*in vivo*, la possibilité de nettoyage à l'eau, une accessibilité des sinus maxillaires, une manipulation facile et sans odeur, et de plus ils sont biologiquement inerte et sans contraintes de transport (Durand et al., 2011b).

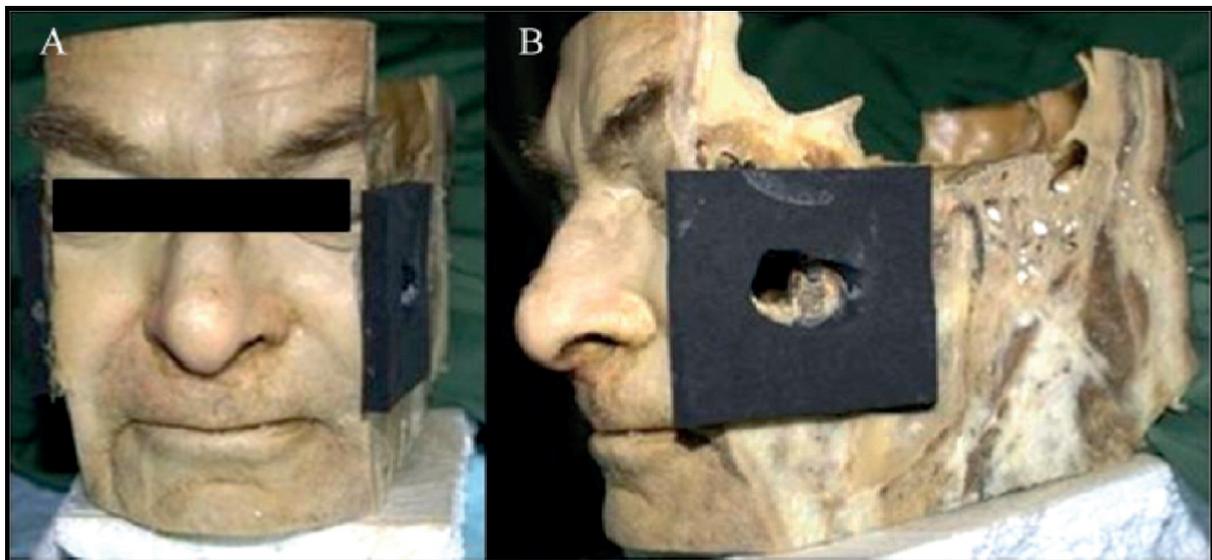


Figure I.25. Modèle de tête plastinée utilisé en cartographie de dépôt des aérosols médicaux (Durand et al., 2011b). (A) Représentation du point de vue antérieur et (B) représentation de la vue latérale montrant l'accès extérieur pour les sinus maxillaire gauche.

4.2.4. Les modèles anatomiques *ex vivo*

Le terme *ex vivo* définit les essais scientifiques mis en place en dehors de l'organisme. Le premier avantage de l'utilisation des modèles *ex vivo* est la possibilité d'effectuer des tests ou des mesures qui ne pourraient être possibles ou éthiques sur des sujets vivants. L'utilisation de modèles *ex vivo* dans la cartographie de dépôt est normalement réalisée à partir d'organes entiers, notamment les poumons et des têtes formolées. Néanmoins, ce n'est pas encore une pratique très répandue, en effet, la faible stabilité dans le temps des organes et les questions de biosécurité liés à ce type de modèle limitent son utilisation par rapport à d'autres modèles *in vitro* (Vietz et al., 2011).

Toutefois, des modèles de poumon *ex vivo* porcins commencent à être désormais utilisés dans la cartographie de dépôt d'aérosols médicaux. Grâce à des techniques actuelles, il est possible de ventiler des poumons *ex vivo*, simulant ainsi la respiration humaine (Vietz et al., 2011).

4.2.5. L'experimentation *in vivo*

Les modèles *in vivo*, comme les essais pré-cliniques, sont indiscutablement les modèles les plus adéquats pour la cartographie de dépôt. Néanmoins, l'exposition de l'homme à des expérimentations scientifiques présente de sérieuses contraintes éthiques et également de coûts très importants, limitant ainsi leur utilisation.

Dans ce contexte, la cartographie de dépôt d'aérosols médicaux est préférentiellement étudiée à travers des modèles Primate Non Humain (PNH) qui sont largement utilisés grâce à la proximité de son anatomie respiratoire à l'humain (Wanert & Vidal, 2006 ; Gay et al. 2012). Les babouins sont ainsi considérés comme le meilleur modèle animal pour l'extrapolation du dépôt des aérosols dans les voies respiratoires de l'homme (Kelly, 2005; Martonen, 2001; Patra, 1986a, 1986b). De cette façon les études chez le primate permettraient de transposer à l'humain les résultats de dépôt de particules dans l'arbre respiratoire pathologique. De plus, les expériences *in vivo* peuvent aussi être utilisées pour la validation des modèles *in vitro* et *in silico*.

5. LA REPARTITION REGIONALE DU DEPOT DES AEROSOLS DANS LES VOIES AERIENNES

Une connaissance plus précise sur les sites de dépôt de particules ultrafines inhalées est essentielle pour l'évaluation des risques liés à la toxicité de ces particules. Cela est également nécessaire pour évaluer l'efficacité thérapeutique et diagnostique des nanoparticules à visée médicale (Geiser and Kreyling, 2010; Yang et al., 2008). En effet, l'efficacité des médicaments inhalés pour le traitement de maladies pulmonaires ou systémiques, dépend directement du site de dépôt du médicament dans les poumons (Newman et al., 2011). Par conséquent, la précision du dépôt des particules dans les voies aériennes, c'est-à-dire, la caractérisation de la répartition régionale du dépôt, peut permettre de prédire le site des changements pathologiques lié à des agents cancérigènes ou des polluants toxiques inhalés ainsi que les effets pharmacodynamiques des médicaments inhalés (Snell et Ganderton, 1999).

Les techniques d'imagerie isotopique sont déjà bien établies pour la cartographie de dépôt des particules inhalées. Ces techniques se basent sur l'inhalation des aérosols radiomarqués suivie par l'observation du dépôt par des méthodes d'imagerie scintigraphique. La répartition du dépôt entre les régions ORL, trachéo-bronchique et pulmonaire peut être réalisée précisément par gamma-scintigraphie, alors que l'évaluation de la déposition régionale pulmonaire est moins simple, en raison de la nature complexe de l'anatomie du poumon, rendant souvent nécessaire l'utilisation de technologies d'imagerie 3D comme la SPECT (Tomographie d'émission de photon unique) ou la PET (Tomographie par Emission de Positons).

Bien que la caractérisation de la répartition régionale du dépôt de particules inhalées en fonction de leur taille chez l'homme dès le début des années 1960, les données expérimentales se concentrent essentiellement sur l'évaluation de la fraction totale déposée (Kuehl et al., 2012; Newman et al., 2011; Londhal et al., 2009; Londhal et al., 2008; Londhal et al., 2007; Daigle et al., 2003; Laube, 1996). Dans la plupart des études de dépôt de particules inhalées, le dépôt total est mesuré en comparant les concentrations de particules inspirées et expirées, sans distinguer la répartition régionale du dépôt dans les voies aériennes. Par exemple, dans l'étude expérimentale chez l'homme sur le dépôt des particules en suspension dans l'air dans une rue très fréquentée à Copenhague - Danemark (Londhal et al., 2009), la détermination du dépôt a été réalisé à travers

un montage qui détermine le dépôt d'aérosol dans les voies aériennes seule par comparaison entre la distribution en nombre de taille de particules inhalées et exhalées (Figure I.26).

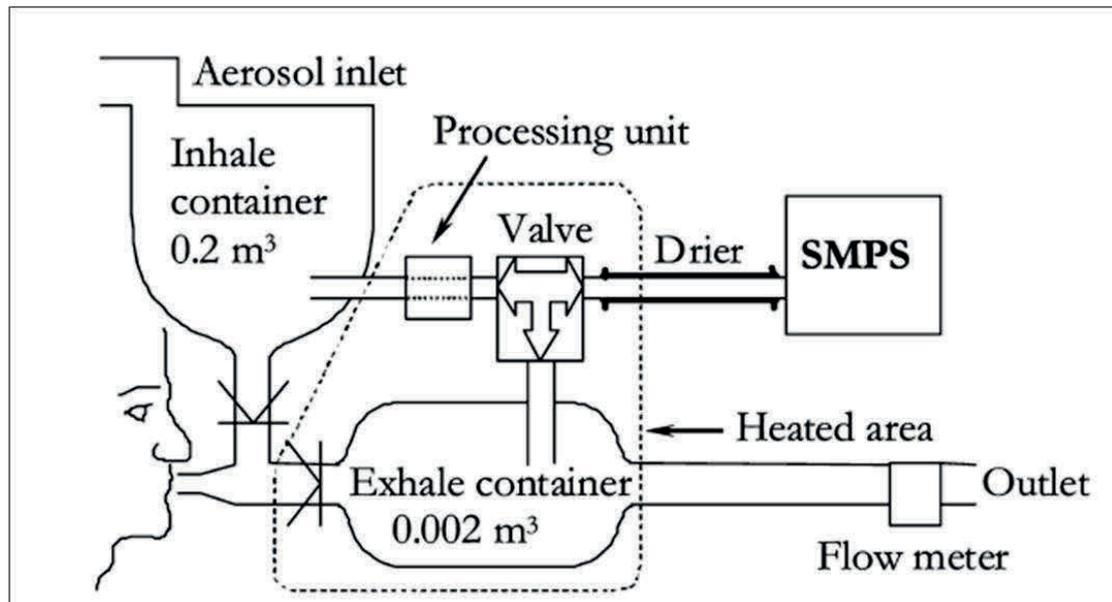


Figure I.26. Schéma du système d'inhalation utilisé par Londhal et al. (2009) pour déterminer la fraction totale d'aérosol déposé sur les voies respiratoires des sujets exposés à des particules en suspension dans l'air dans une rue très fréquentée en Copenhague, Denmark. *SMPS - granulomètre de particules en mobilité ; CPC - compteur de particules par condensation ; DMA - séparateur granulométrique différentiel de mobilité. Adapté de Londhal et al. 2009.

Bien que la détermination de la cartographie de dépôt des aérosols au travers de la fraction totale déposée dans les voies aériennes soit suffisante pour une meilleure compréhension de la relation dépôt-taille des particules, il semble intéressant que cette technique soit accompagnée par une caractérisation de la répartition régionale du dépôt dans les voies aériennes (Newman et al., 2011; Londhal et al., 2009; Londhal et al., 2008; Londhal et al., 2007).

6. CONCLUSIONS ET OBEJCTIFS

Les recherches intensives utilisant les nanotechnologies permettent d'envisager d'énorme progrès en médecine. Dans le domaine de l'aérosolthérapie, le développement d'aérosols nanométriques est potentiellement intéressant dans le cadre du transport des principes actifs destinés à un usage

thérapeutique ou diagnostique. Toutefois, la plupart des formulations destinées à l'aérosolthérapie sont formées par des nanoparticules actives encapsulées dans des vecteurs non-nanométriques. Les aérosols résultants sont ainsi de l'ordre du micromètre contenant des actifs nanométriques. Or, il est connu que le dépôt d'aérosol dans le tractus respiratoire dépend de la taille de ces particules et des paramètres respiratoires des patients. L'aérosolthérapie par nébulisation des particules micrométriques résulte ainsi en un dépôt majeur dans les voies aériennes supérieures, ce qui est susceptible de limiter son efficacité thérapeutique à visée pulmonaire. Cette situation est encore plus problématique chez les patients atteints de maladies obstructives pulmonaires, et chez les enfants. Ajouté à ces facteurs, l'efficacité de nouvelles technologies d'aérosolthérapie caractérisés par une délivrance de particules aux voies aériennes inférieures, tel que l'aérosol de particules ultrafines Qvar, mettent en évidence le potentiel des nano-aérosols en médecine, i.e. l'utilisation des vecteurs nanométriques capables de transporter des principes actifs moléculaires ou des nanoparticules par voie aérosol jusqu'au niveau alvéolaire.

Les principaux objectifs de cette thèse sont d'abord le développement des générateurs de nano-aérosol, tant de particules solides que liquides, puis d'évaluer la cartographie de dépôt dans les voies respiratoires. Le défi majeur de ce travail réside dans la maîtrise des techniques d'aérosolisation permettant de concevoir la génération d'aérosols nanométriques, ainsi que des techniques d'administration *in vivo* pour la détermination de la cartographie de dépôt.

II. MATERIEL ET METHODES

1. LES GENERATEURS D'AEROSOL

Des nouveaux systèmes de générateurs d'aérosol nanométriques ont été développés grâce à un partenariat avec Aerodrug (DTF, France) et Cyclopharma Laboratoires (France). Ainsi les études et analyses de cette thèse ont été effectuées avec les prototypes développées avec nos partenaires puis leurs performances comparées à celui de générateurs commerciaux.

1.1. Aérosols vectorisés sous forme de particules nanométriques liquides

Douze prototypes de nébuliseurs pneumatiques ont été développés en partenariat avec Aerodrug pour produire des aérosols vectorisés sous forme de particules nanométriques (Figure II.1-A). Tous les prototypes élaborés ont le format des nébuliseurs pneumatiques standard, composés par un réservoir, une cuve et une chambre de nébulisation. La source de pression utilisée pour l'atomisation du liquide provient d'une prise murale d'air comprimé, à un débit d'air de 8 L/min. Néanmoins, les détails techniques des prototypes ne peuvent pas être précisément décrits, un brevet étant en cours de dépôt.

Tous les prototypes de nébuliseurs pneumatiques ont été validés par rapport à des nébuliseurs commerciaux conventionnels : Sidestream (Philips Respironics, Ref 12NEB400, England) et Atomisor NL11 (DTF, France) ; soit des nébuliseurs spécifiques pour atteindre la région alvéolaire, commercialisés comme «*Precisaly Alveolar*» : Swirler® (AMICI) et Venticis II® (CISBIO) (Figure II.1).

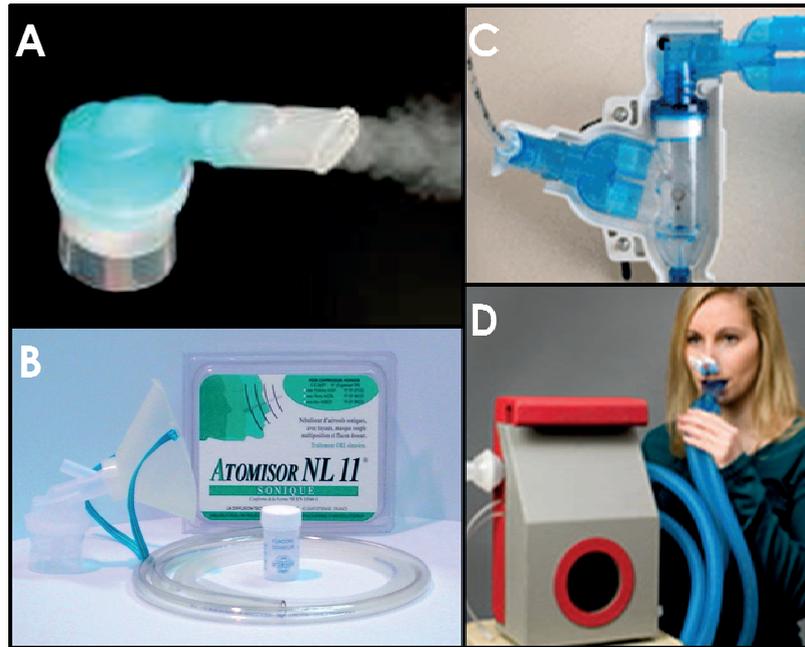


Figure II.1. Les générateurs d'aérosol liquide : le prototype de nébuliseur nanométrique élaboré en partenariat avec Aerodrug (A), le nébuliseur pneumatique classique Atomisor NL11 (B), les nébuliseurs spécifiques «*Precisaly Alveolar*» - Swirler (C) et Venticis II (D).

Tous les nébuliseurs ont été évalués selon la norme 13544-1, qui est une norme européenne (EN) et française (NF) qui s'applique aussi bien aux nébuliseurs pneumatiques qu'aux nébuliseurs ultrasoniques. En effet, la norme NF EN 13544-1 constitue un élément privilégié de conformité au marquage CE (conformité européenne) pour tous les appareils de nébulisation mis sur le marché. C'est une avancée importante dans le domaine de l'aérosolthérapie, car elle permet de connaître les caractéristiques et les performances des nébuliseurs commercialisés, tels que leur volume de remplissage, la pression d'utilisation, le débit d'air d'alimentation et leur niveau sonore. On dispose également d'informations sur la taille des particules produites par le nébuliseur (granulométrie) et sur le volume de liquide que le patient est susceptible d'inhalé (aérosol produit). Les systèmes de nébulisation doivent désormais posséder les informations relatives à la norme comme indiqué dans la Figure II.2. Les procédures de caractérisation normative des aérosols nébulisés sont décrites en détail dans le chapitre II-2.2 et dans l'annexe 1.

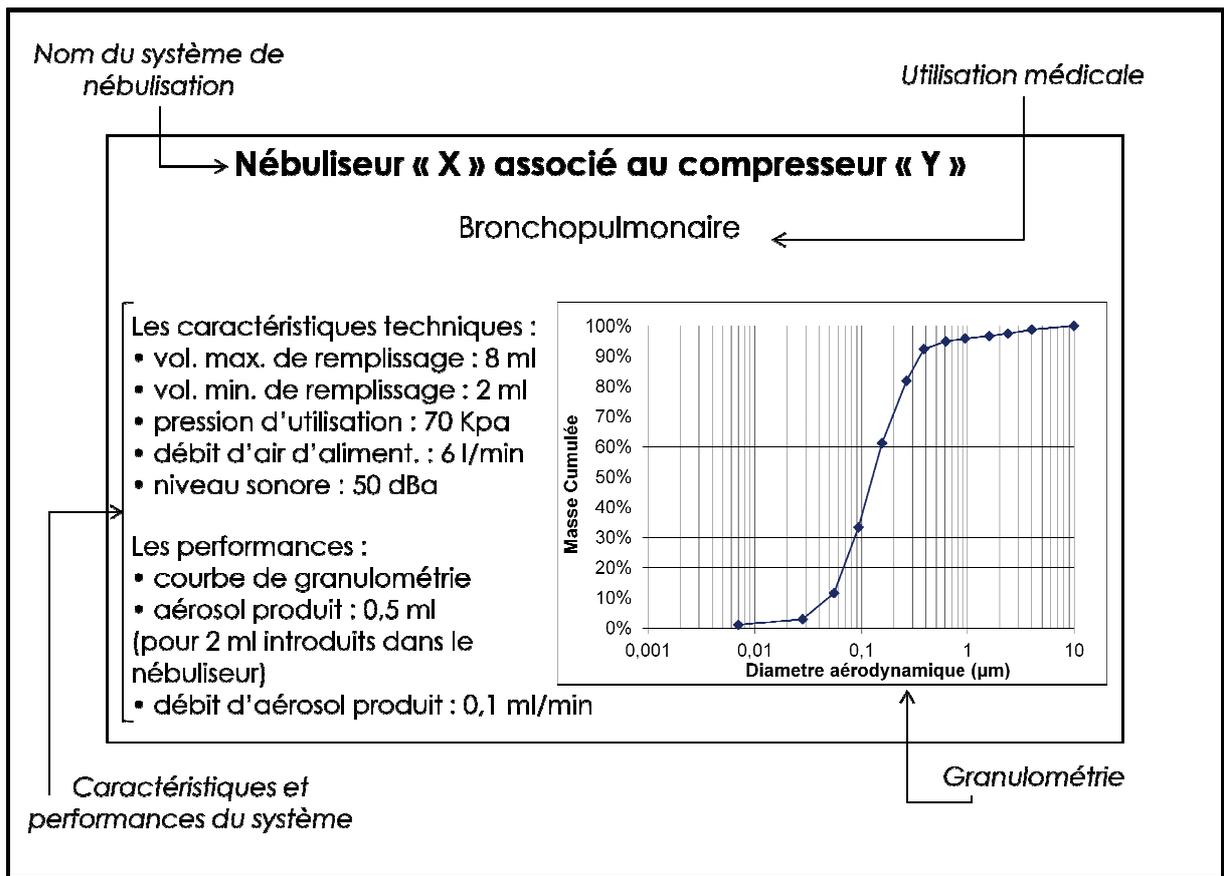


Figure II.2. Exemple d'une marquage-type d'un système de nébulisation selon la norme NF EN 13544-1 (adptation Vecellio, 2004).

1.2. Aérosols vectorisés sous forme de particules nanométriques solides

Les aérosols vectorisés sous forme de particules nanométriques solides étudiés dans ce travail ont été produits en utilisant le *Technegas Generator* (Figure II.3). Ce générateur d'aérosol radioactif produit le *Technegas®*, un aérosol de particules de carbone marquées au Technétium utilisé en médecine nucléaire pour réaliser des scintigraphies de ventilation essentiellement pour le diagnostic de l'embolie pulmonaire. Grâce au partenariat avec Cyclopharma Laboratoires il a été possible de proposer des modifications des paramètres opérationnels du *Technegas Generator* afin de produire un aérosol optimisé, contenant une population de nanoparticules plus importantes.

La génération d'aérosol dans le *Technegas Generator* prend place dans la chambre de l'appareil où un creuset en graphite est inséré entre deux électrodes. Il est ensuite rempli avec une solution

radioactive de pertechnétate de sodium ($\text{Na } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4$). Le Technegas est obtenu par évaporation à sec du pertechnétate dans le creuset en graphite sous ambiance d'argon ultra pur pendant 15 secondes. Après une étude bibliographique détaillée des mécanismes de génération du Technegas (chapitre III-1), il a été convenu que les principaux paramètres clés du *Technegas Generator* sont : (I) la durée d'évaporation du pertechnétate sous argon, (II) la durée et (III) la température de synthèse (chauffage), et (IV) le temps de résidence de l'aérosol dans la chambre du générateur avant d'être inhalé par le patient.

Chaque paramètre d'opération du *Technegas Generator* a été modifié de façon à produire 11 granulométries différentes d'aérosols solides marqués au Technétium. Ces aérosols ont été comparés entre eux et avec la version *standard* du Technegas afin de déterminer les paramètres optimaux pour la génération d'un aérosol nanométrique solide.

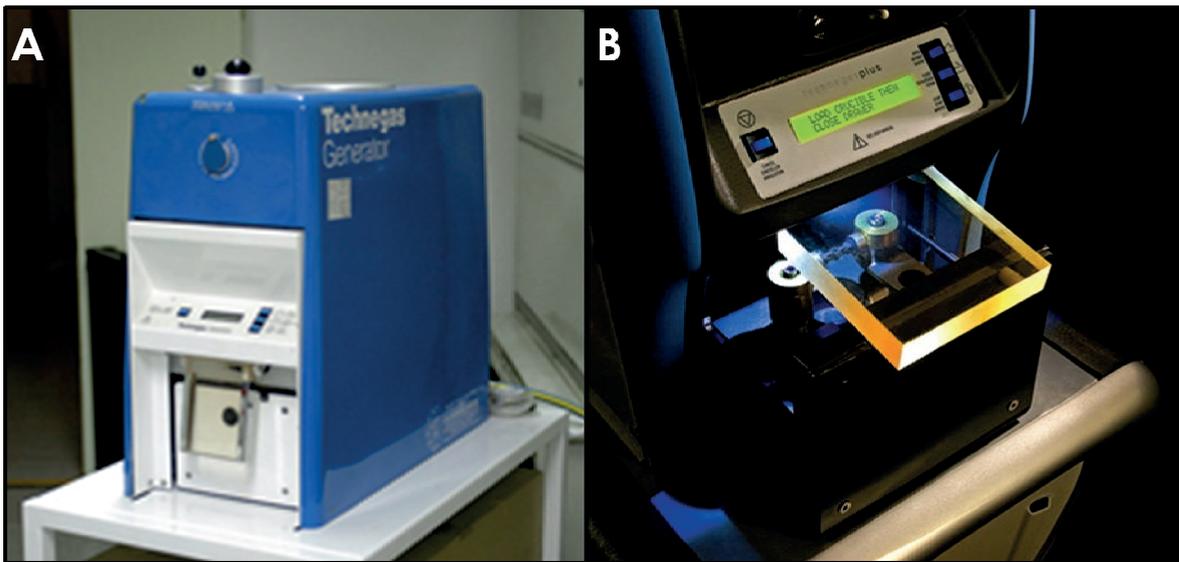


Figure II.3. Le générateur d'aérosol solide *Technegas Generator* (A). Détail de la chambre du générateur où s'insère le creuset en graphite et la solution de pertechnétate de sodium (B).

2. LA METROLOGIE DES AEROSOLS

La description d'une distribution granulométrique nécessite de disposer du nombre total de particules sur chacun des intervalles de diamètre. Sur une gamme de taille allant de quelques nanomètres à quelques micromètres il apparaît plusieurs modes, qui correspondent aux particules ultrafines jusqu'aux particules de plusieurs microns, appelées simplement grosses particules. Une population de particules peut être décrite par sa distribution en nombre, mais également en surface, en volume ou en masse.

Comme discuté précédemment (cf. I-2.1), les aérosols médicaux sont habituellement décrits par leur diamètre aérodynamique moyen en masse (DAMM). La détermination du DAMM d'un aérosol est donc réalisée par la mesure de la taille des particules en terme de masse de principe actif, à l'aide d'un impacteur en cascade.

2.1. Mesure par Impacteur en Cascade à basse pression – ELPI

Les impacteurs en cascade sont considérés comme des appareils de référence pour mesurer la granulométrie des aérosols pharmaceutiques (Keskinen et al., 1992 ; Marjamäki et al., 2000 ; Kotian et al., 2009). Par défaut, un impacteur en cascade est constitué de plusieurs étages d'impaction, chaque étage correspondant à un diamètre de coupure. Les particules de l'aérosol sont entraînées dans l'impacteur grâce à une pompe qui crée le débit d'aspiration. Concrètement, il suffit de mesurer la quantité déposée sur chaque étage de l'impacteur pour déterminer la distribution de l'aérosol en classes granulométriques selon les diamètres de coupure de l'impacteur. Cette mesure se fait généralement par dosage du principe actif contenu dans les particules aérosolisées à l'aide de méthodes adaptées telles que la spectrophotométrie UV ou la chromatographie en phase liquide.

Parmi les différents types d'impacteur en cascade, le granulomètre ELPI™ (Figure II.4-A), est un impacteur électrique à basse pression (Dekati, Finlande) qui se distingue par sa capacité de mesurer en temps réel la concentration particulaire pour 12 classes de taille, s'étendant de 7 nm à 10 µm. L'ELPI est ainsi l'impacteur de choix pour mesurer les aérosols médicaux contenant des

particules dans la gamme du nanomètre (Keskinen et al., 1992 ; Marjamäki et al., 2000 ; Kotian et al., 2009).

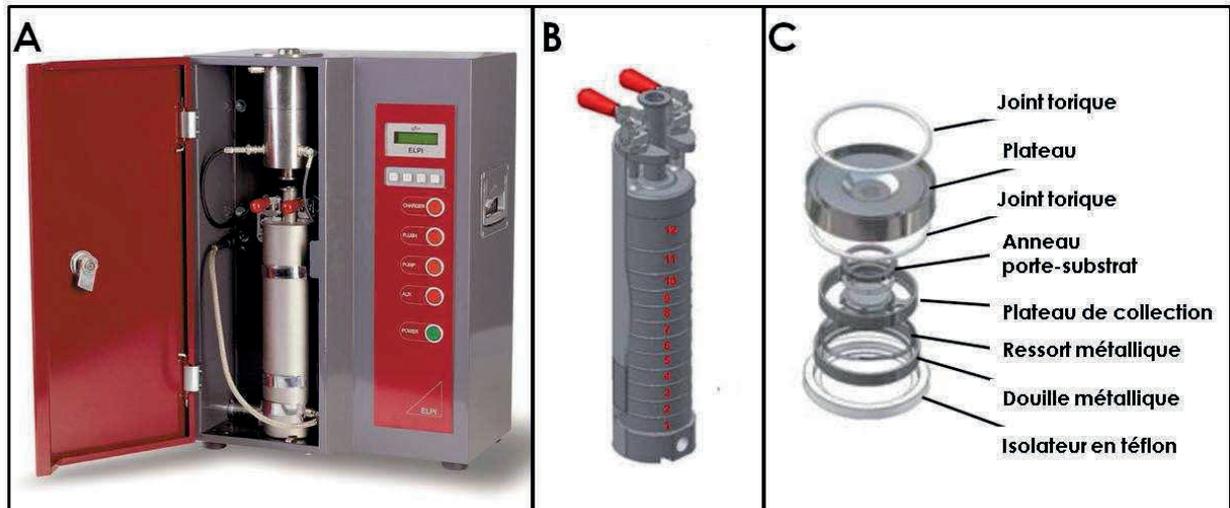


Figure II.4. L'impacteur en cascade ELPI (A), l'impacteur assemblé avec les 12 étages de classification (B) et les détails pour la composition de chaque étage de l'impacteur (C) (adapté - Dekati, 2008).

L'ELPI est composé de trois éléments : un chargeur corona, un impacteur en cascade à basse pression muni de 12 électromètres, et une pompe à vide qui sert à prélever l'aérosol avec un débit constant de 10 L/min. L'impacteur en cascade de l'ELPI est constitué de 13 étages (Figure II.4-B), dont tous sauf le premier sont connectés à un électromètre qui mesure le courant généré lorsque les particules chargées impactent vers le plateau de collection. Les différents étages sont isolés électriquement par des pièces en téflon placées entre deux étages successifs (Figure II.4-C). Les paramètres d'étalonnage mesurés par le fabricant pour chaque étage sont le diamètre de coupure, la pression de stagnation et le temps de séjour. Il faut noter que les étages de l'ELPI sont numérotés à l'envers : le premier étage est le dernier à être traversé par l'aérosol.

Pour les mesures de granulométrie dans ELPI, les aérosols sont dans un premier temps chargés par effet corona (+5kV) dans le chargeur corona, suivi d'un piège à ions servant à exclure du flux les ions positifs en excès. Les particules chargées sont ensuite aspirées à basse pression au travers de la cascade d'impacteurs. Les particules sont ainsi impactées dans les différents étages de l'ELPI

par classification inertielle en fonction de leur diamètre aérodynamique (Figure II.5). Enfin, la concentration est calculée à partir de la mesure de la charge électrique portée par les particules déposées sur chaque plateau d'impaction.

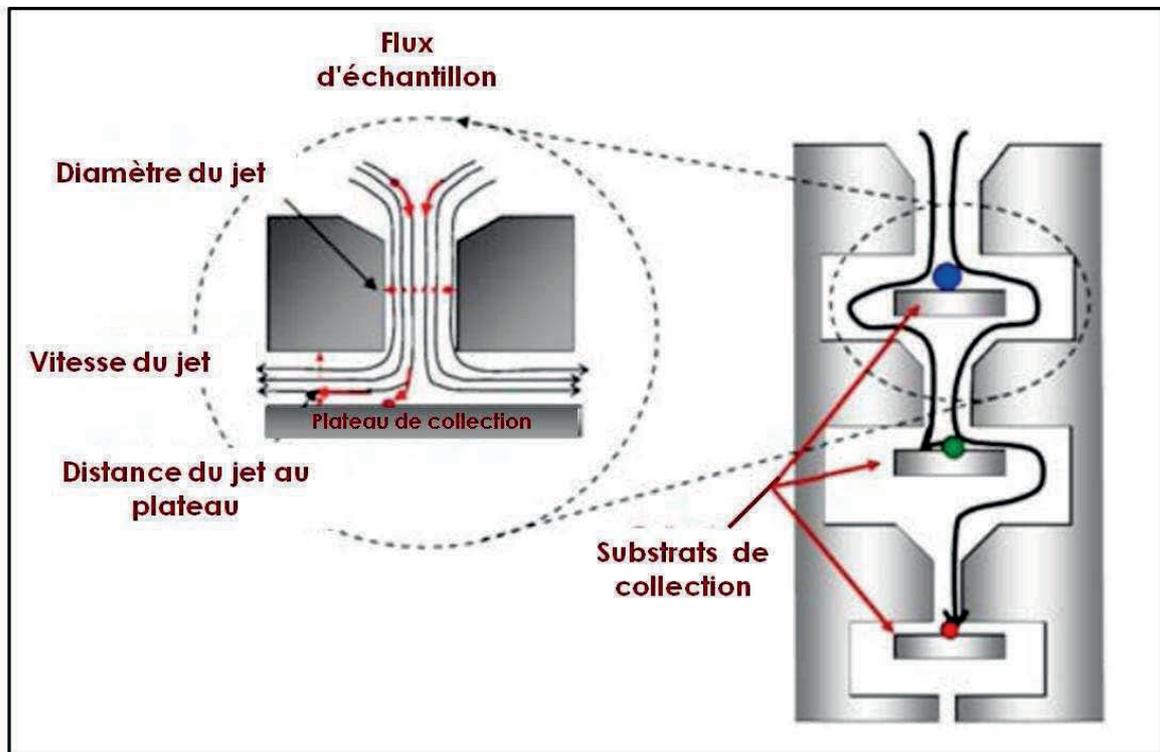


Figure II.5. Principe de fonctionnement de l'impacteur ELPI, montrant la classification inertielle: les particules sont impactées dans les différents étages de l'ELPI selon leur diamètre aérodynamique. (Adaptée Dekati, 2008)

La valeur du courant sur chaque canal est proportionnelle au nombre de particules collectées, et donc à la concentration de particules dans une gamme de taille particulière. Une charge plus élevée correspond ainsi à une plus grande population de particules. Les valeurs des courants sont donc converties en une distribution de taille (aérodynamique) en utilisant les relations dépendantes de tailles de particules, qui décrivent les propriétés du chargeur et des étages de l'impacteur (Moisio, 1999). La méthode de calcul utilisée par ELPI permet ainsi de déterminer la concentration en nombre pour chaque classe granulométrique. La concentration totale peut être calculée comme la somme de toutes ces concentrations. Les concentrations en masse, surface, volume ou nombre peuvent être aussi calculées, en supposant que les particules sont sphériques et en utilisant le diamètre de mobilité équivalente. Bien évidemment les concentrations ainsi

mesurées sont moins précises que celles mesurées par une méthode de mesure directe (CNC pour la concentration en nombre, épiphaniomètre pour la concentration en surface, etc.).

De plus, L'ELPI peut être utilisé dans deux configurations différentes: standard ou « Filtre ». Cette dernière configuration permet d'augmenter la résolution de taille pour les particules au dessous 30 nm grâce à l'utilisation d'un étage supplémentaire de filtration jusqu'à 7 nm (*ELPI Filter stage*), au dessous de l'ensemble des étages de l'impacteur. Toutefois, pour l'insertion de l'étage de filtrage dans la configuration standard de l'ELPI il est nécessaire d'enlever l'étage numéro 12 ($d_{\text{cut-off}}$ de 6.8 μm) de l'ensemble des étages de l'impacteur, ce qui permet une mise à niveau facile et l'utilisation des électromètres existants.

Le filtre utilisé sur l'étage de filtration recueille les particules au dessous 30 nm. Toutefois, les particules sont détectées par leur charge électrique, or les particules inférieures à 7 nm ne reçoivent pas de charge électrique significative dans le chargeur corona. Par conséquent, elles ne peuvent pas être détectées par les électromètres et le point le plus bas de coupure de l'étage de filtration est donc défini à 7nm. De ce fait, l'utilisation de l'ELPI dans sa configuration « Filtre » permet d'étendre la gamme de mesure de l'ELPI de 30nm-10 μm à 7nm-10 μm .

Le débit à travers l'impacteur ELPI est contrôlé par réglage à 100 mbar au dessous du premier étage de l'impacteur. Dans la configuration standard de l'ELPI, cela est fait en mesurant le signal de pression à la sortie de l'impacteur et en ajustant la pression vers 100 mbar. Lorsque l'étage de filtrage est utilisé, certaines modifications doivent être apportées à la mesure de la pression. La pression doit être mesurée à nouveau en dessous du premier étage de l'impacteur, donc au-dessus du filtre (Figure II.6). Pour cela, un tuyau de mesure de pression est utilisé pour permettre la mesure de pression entre le premier étage de l'impacteur et l'étage de filtration.

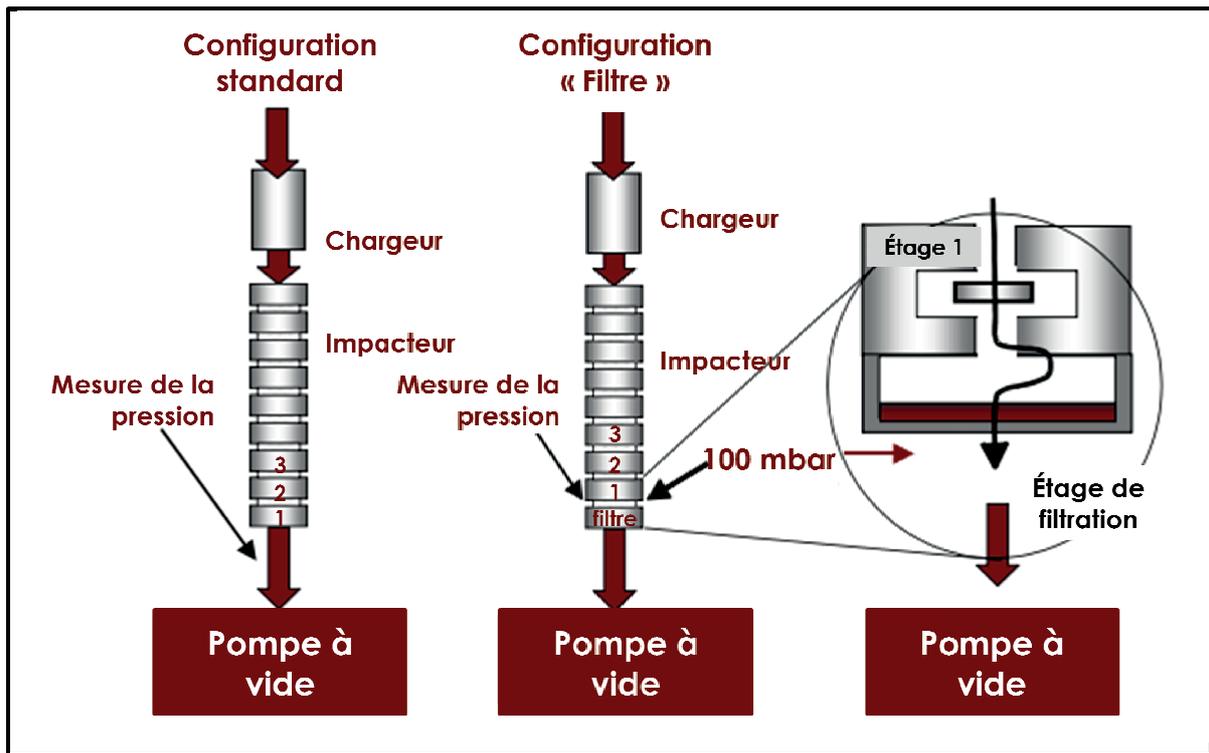


Figure II.6. Les deux possibilités d'assemblage de l'impacteur ELPI : configuration standard ou configuration « Filtre ». Comme signalé dans la figure, la mesure de la pression est toujours réalisée au dessous de l'étage numéro 1 (adapté - Dekati, 2008).

2.2. La granulométrie des aérosols générés par nébulisation

Les aérosols générés par les systèmes de nébulisation, i.e. des aérosols liquidiens, étudiés dans cette thèse ont été caractérisés selon la norme européenne (EN 13544-1, 2001). L'utilisation des techniques décrites dans cette norme permet de mieux connaître les caractéristiques et les performances des nébuliseurs. En plus, cette technique utilise la méthode d'impaction en cascade, qui présente l'avantage de mesurer le diamètre aérodynamique des particules en termes de masse de principe actif, permettant ainsi la détermination du MMAD de l'aérosol (Cf. Etude Bibliographique 3.2) (Figure II.7).

Les mesures de la granulométrie des aérosols nébulisés ont été réalisées à l'aide d'un impacteur en cascade à basse pression avec détection électrique (ELPI, Dekati, Finland). L'impacteur était monté en dérivation entre une pompe aspirant à débit continu de 10L/min et le nébuliseur contenant 4 mL d'une solution de NaF à 2.5% (M/V). La connexion entre le nébuliseur et

l'impacteur était réalisée par une pièce en L en acier inoxydable, décrite dans la norme comme l'embout d'entrée de l'impacteur, et appelée dans cette étude « la trachée » (Figure II.8-A-B). Le nébuliseur est mis en marche avec de l'air comprimé à 8 L/min. L'échantillonnage dure 5 minutes puis le NaF déposé sur chacun des étages de l'impacteur (Figure II.8-C) est récupéré par rinçage à l'eau distillée (5 mL) (Figure II.8-D). La quantité de NaF impacté sur chaque étage de l'impacteur (y compris la trachée) est donc quantifiée par rapport aux ions F⁻ présentes dans les solutions de rinçage. Cela est réalisé à l'aide d'un ionomètre (Seven Go, Metler Toledo, France). Pour garantir la stabilité des mesures, une solution tampon TISAB est ajoutée à titre de 5% du volume à chaque lecture à l'ionomètre.

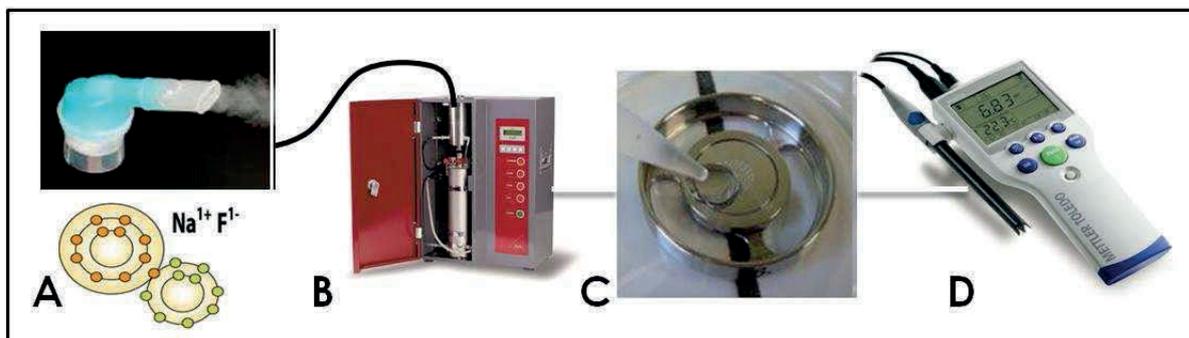


Figure II.7. Illustration de la technique de mesure de la granulométrie des aérosols nébulisés selon la norme EN 13544-1 : nébulisation avec du NaF (A) suivi par l'analyse granulométrique dans l'impacteur ELPI (B) et par la quantification de la concentration des ions F⁻ dans chaque étage de l'ELPI (C) grâce à l'aide d'un ionomètre (D).

L'ELPI a été utilisée dans sa configuration standard (séparation de particules entre 30nm et 10 µm). En plus, pour éviter des problèmes liés aux charges électriques des aérosols, les mesures de granulométrie sont réalisées sans utiliser le chargeur corona de l'ELPI. Ainsi, la détection électrique réalisée à chaque étage de l'ELPI représente uniquement les charges naturelles de particules de l'aérosol. Toutes les analyses ont été réalisées en trois fois.

Le protocole détaillé et illustré de cette procédure est montré dans l'Annexe 1.

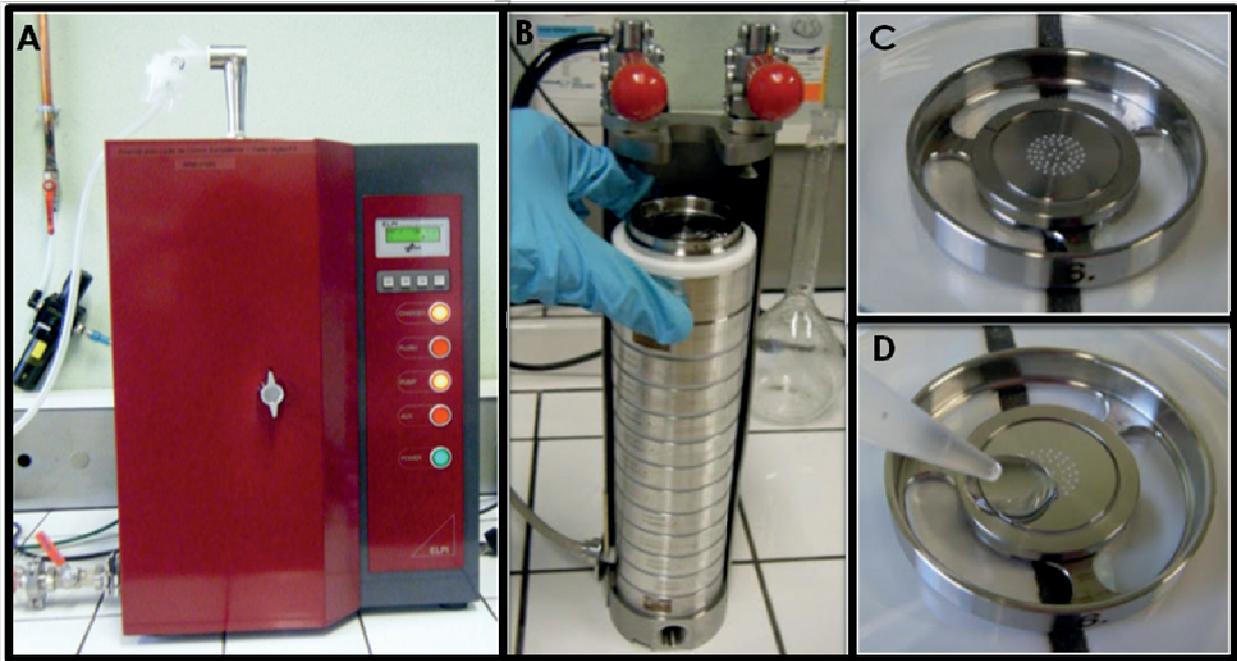


Figure II.8. L'impacteur ELPI avec son embout d'entrée (la trachée) et le nébuliseur (A) ; la cascade d'impacteurs de l'ELPI (B) ; un étage de l'impacteur avec le dépôt de NaF après échantillonnage d'aérosol (C) et la récupération du NaF déposé par rinçage à l'eau distillée (D).

2.3. Granulométrie des aérosols radioactifs

La granulométrie des aérosols radioactifs a été également réalisée à l'aide de l'impacteur ELPI. Dans l'analyse des aérosols radioactifs générés par nébulisation, les nébuliseurs ont été chargés avec 1 mL d'une solution radiopharmaceutique contenant du ^{99m}Tc -DTPA complétés avec 3 mL de sérum physiologique (NaCl 0,9%) et ensuite connectés à l'ELPI. Dans l'analyse d'aérosols radioactifs marqués au technétium produits par le Technegas Generator, la sortie de ce dernier était directement liée à l'embout d'entrée de l'ELPI à l'aide d'un tuyau non-électrostatique.

L'échantillonnage de l'aérosol chez ELPI suit la même procédure que celle des aérosols liquides non-radioactifs (méthode NaF), avec la seule différence que pour celles-ci s'utilise l'ELPI dans sa configuration « Filtre », qui permet la détection des particules impactés depuis le filtre de l'impacteur ($d_{\text{cut-off}}$ de 7nm) jusqu'à son dernier étage ($d_{\text{cut-off}}$ de 10 μm) (cf II 2-1). L'utilisation de l'ELPI dans la configuration « Filtre » est possible que pour les analyses radioactives car il n'y a

pas l'utilisation de l'eau pour la récupération et quantification du dépôt sur chaque étage comme dans la méthode au NaF. Le dépôt radioactif sur chaque étage de l'ELPI (y compris l'étage de filtrage) est quantifié simplement par l'acquisition des données scintigraphiques à la gamma camera (Figure II.9).

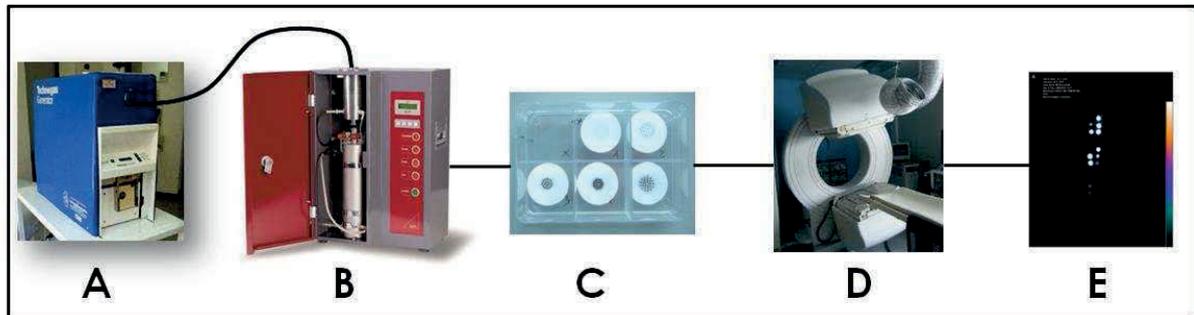


Figure II.9. Illustration de la technique de mesure de la granulométrie des aérosols radioactifs: la génération de l'aérosol radioactif Technegas Generator (A) ou par nébulisation avec du ^{99m}Tc -DTPA, est suivie de l'analyse granulométrique dans l'impacteur ELPI (B) et par la quantification de l'activité des particules impactées dans chaque étage de l'ELPI et collectés dans des membranes de cellulose (C) grâce à l'aide d'une gamma camera (D). La figure E montre l'image scintigraphique finale avec le dépôt des particules sur les 12 étages ELPI.

Afin de diminuer les risques liés à la contamination par des éléments radioactifs, les plateaux de l'impacteur sont recouverts d'une membrane (filtres en acétate de cellulose, Whatman®), qui facilite la récupération du dépôt rendant ainsi possible la répétition des manipulations avec un minimum d'entretien de l'impacteur. L'utilisation des membranes de collection a été validée par une étude préalable, et les résultats montrent que il n'y a pas des différences significatives en terme de diamètre de coupure de chaque étage quant à l'usage des membranes de collection dans les plateaux de l'ELPI (T-test, $p < 0.05$) (Figure II.10).

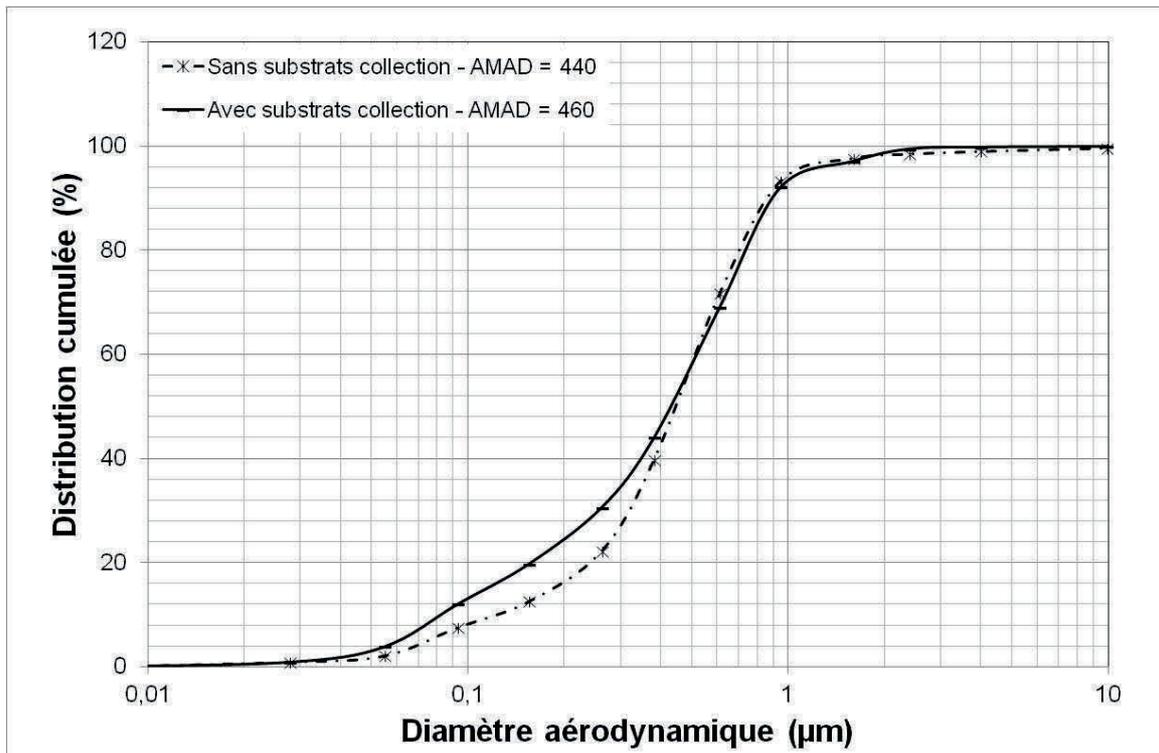


Figure II.10. Distribution cumulée en activité des particules du Technegas standard par rapport à leur diamètre aérodynamique : effet de l'utilisation des substrats de collection en cellulose dans les plateaux de collection de l'impacteur ELPI.

Une fois l'échantillonnage de l'aérosol fini, les plateaux d'impaction sont soigneusement démontés, les membranes contenant les particules radioactives sont enlevées de chaque plateau et leur radioactivité (en nombre de coups) est déterminée à l'aide d'une gamma-camera (GE Millenium) (Figure II.11).

Le protocole détaillé et illustré de cette procédure est montré dans l'Annexe 3.

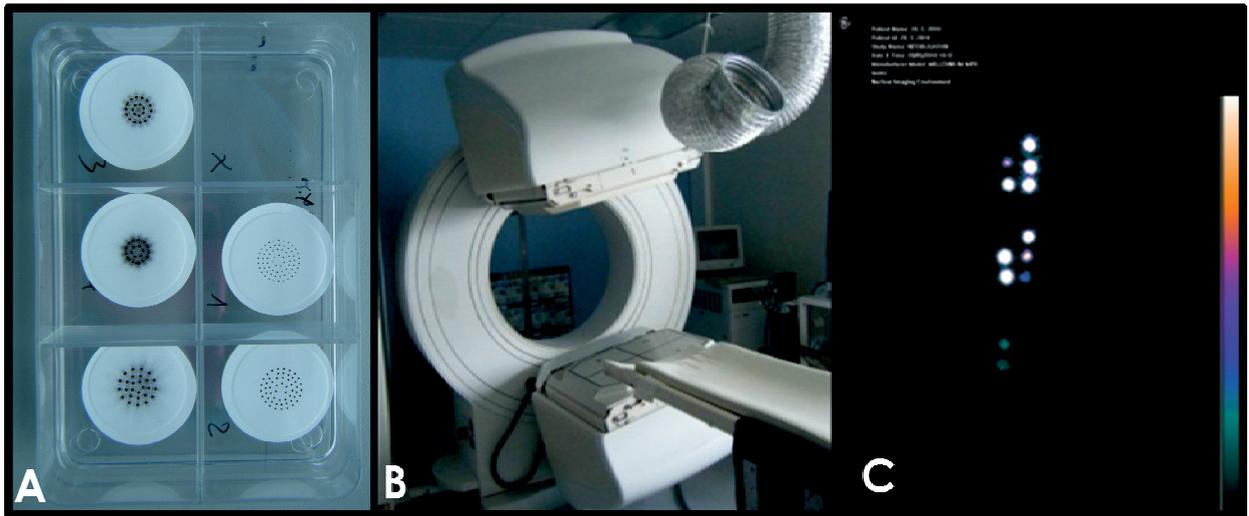


Figure II.11. Le dépôt de particules radioactives d'aérosol de charbon marquées au ^{99m}Tc sur les membranes de cellulose dans des différents plateaux de l'ELPI (A) ; la gamma-camera GE Millennium utilisé dans les manipulations radioactives (B) ; le profil radioactif de l'aérosol permettant la quantification de radioactivité dans les différents granulométries de l'impacteur (C).

2.4. Traitement des données de granulométrie

La plupart des aérosols nébulisés constituent une dispersion hétérogène, i.e., ils ne contiennent pas de gouttelettes identiques, et souvent, les particules couvrent une large gamme de tailles et de formes. Ces aérosols sont souvent considérés comme ayant une distribution log-normale, et approximés comme tels. De ce fait, les aérosols sont normalement représentés par la distribution log-normale des particules ainsi que la distribution cumulative de la masse de particules en fonction du diamètre aérodynamique (Smith, Jordan, 1964; Dick, 2004; Xie et al, 2007). La distribution de taille des particules log-normale dépend du diamètre aérodynamique moyen en masse (MMAD - Mass Median Aerodynamic Diameter) et de l'écart type géométrique (GSD - Geometric Standard Deviation - σ_g) et est définie par la densité de probabilité suivante :

$$f(x) = \frac{1}{x} \frac{1}{\sigma_g \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(\ln(x) - \ln(\text{MMAD}))^2}{2(\ln(\sigma_g))^2}\right)$$

La méthode de calcul utilisée pour le traçage des courbes normales et cumulatives à partir de données expérimentales est montrée dans le Tableau 1 (Dunbar & Hickey, 2000). Comme

résultat, la représentation de la distribution normale de la taille des particules d'un aérosol peut être déterminée par la tracé de la fraction massique normalisée en fonction du diamètre aérodynamique de l'étage de l'ELPI correspondant. Un exemple est montré sur la Figure II.12.

A partir des fractions massiques et de ses diamètres aérodynamiques correspondants il est donc possible tracer la distribution cumulée en masse des particules (Cf. Tableau 1). Le DAMM peut être ainsi calculé par régression linéaire dans la courbe cumulative comme étant le diamètre aérodynamique correspondant à la valeur de rendement massive cumulatif de 50%. Un exemple est montré sur la Figure II.13.

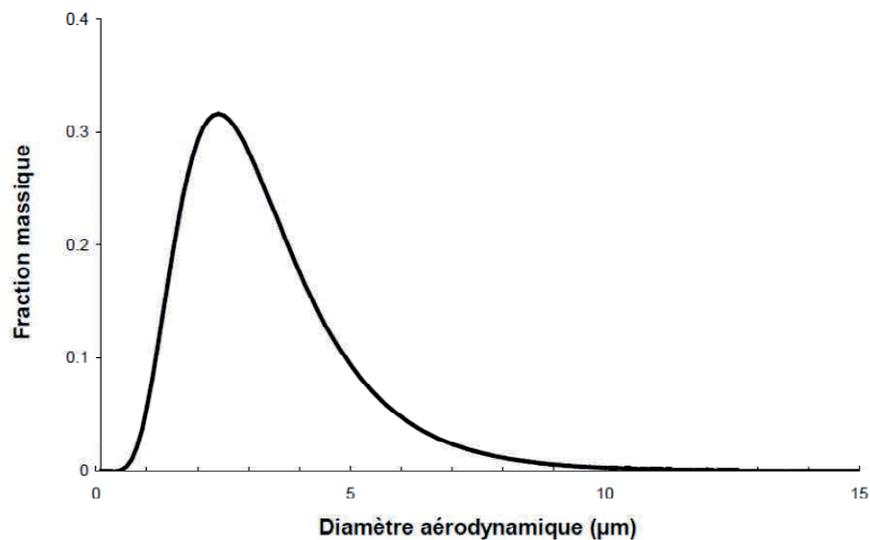


Figure II.12. Distribution log-normale d'un aérosol tracée en échelle normale (Majoral, 2007).

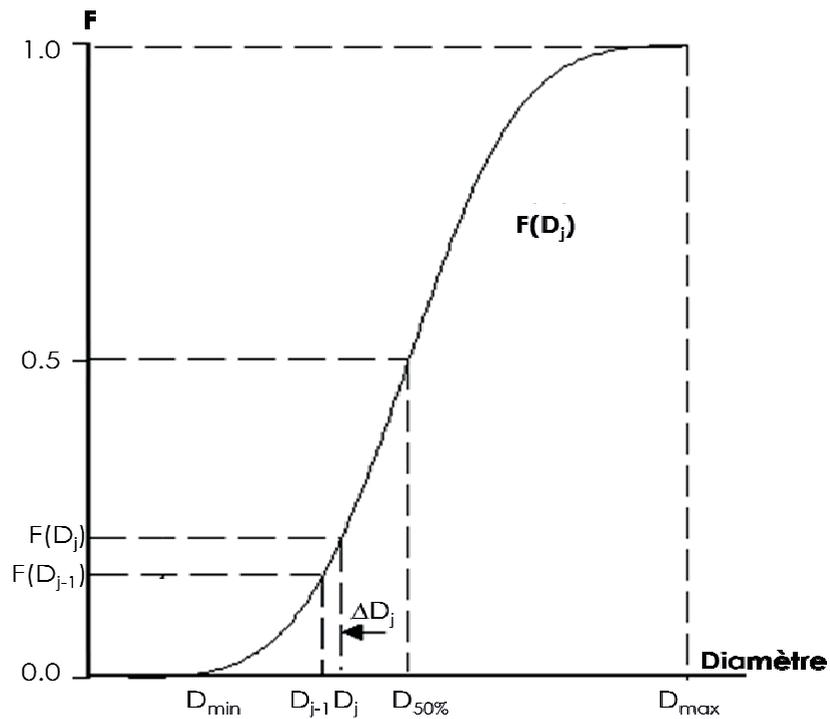


Figure II.13. Représentation de la distribution cumulative d'un aérosol : le $D_{50\%}$ correspond au DAMM.

Enfin, l'écart type géométrique peut être calculé graphiquement par le rapport entre les diamètres sur la courbe de distribution cumulative de la masse des particules :

$$\frac{D_{84.13\%}}{D_{15.87\%}} = \frac{D_{50\%}}{D_{15.87\%}} = \frac{D_{84.13\%}}{D_{15.87\%}}^{1/2}$$

Tableau 1. Calcul des distributions massiques cumulatives $F(D_j)$ et normalisés (p) a partir des données de l'impacteur en cascade ELPI*. (D_j étant la *cut-off diameter* du j étage). *ELPI avec calibration spécifique de l'appareil appartenant au Laboratoire des Particules Inhalées de ENMSE, France.

Etage de l'ELPI	D_j (μm)	Intervalle D_j (μm)	$(D_{j-1}+D_j)/2$ (μm)	$\Delta D_j = [D_{j-1}-D_j]$ (μm)	Masse (mg)	$F(D_j)$	$p((D_{j-1}+D_j)/2)$ (μm ⁻¹)
Filtre	0,007	0,007-0,028	-	-	-	-	-
Plateau 1	0,028	0,028-0,055	0,017	0,0209	m_1	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-1} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 2	0,055	0,055-0,093	0,041	0,0271	m_2	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-2} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 3	0,093	0,093-0,155	0,074	0,038	m_3	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-3} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 4	0,155	0,155-0,262	0,124	0,062	m_4	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-4} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 5	0,262	0,262-0,382	0,209	0,107	m_5	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-5} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 6	0,382	0,382-0,613	0,322	0,12	m_6	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-6} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 7	0,613	0,613-0,949	0,498	0,231	m_7	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-7} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 8	0,949	0,949-1,600	0,781	0,336	m_8	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-8} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 9	1,600	1,600-2,390	1,275	0,651	m_9	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-9} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 10	2,390	2,390-4,000	1,995	0,79	m_{10}	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-10} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 11	4,000	4,000-6,800	3,195	1,61	m_{11}	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-11} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 12	6,800	6,800-9,920	5,400	2,8	m_{12}	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-12} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Plateau 13	9,920	>9,920	-	-	m_{13}	$1 - \frac{1}{\sum_{m=1}^{m-13} \frac{m}{m}}$	$\frac{\frac{m}{m} \times \Delta \frac{m}{m}}{\frac{m}{m}}$
Embout d'entrée	-	-	-	-	m_{14}	-	-

$$\frac{m}{m} = \sum_{m=1}^{m=14} \frac{m}{m}$$

3. LA CARTOGRAPHIE DE DEPOT IN VIVO

3.1. Les manipulations *in vivo*

La détermination *in vivo* de la cartographie du dépôt des aérosols de différentes tailles produit par des nébuliseurs pneumatiques a été réalisée chez un modèle de primate, non humain, le babouin. Comme discuté dans l'étude bibliographique ce modèle animal possède l'avantage d'être très pertinent pour faire des extrapolations et interprétations vers le modèle humain (Martonen et al., 2001 ; Kelly et al., 2005).

L'étude *in vivo* de cartographie de dépôt réalisée dans cette thèse est décrite dans la suite et a été réalisée sous l'approbation du Conseil d'éthique de l'Université de Médecine de Tours, France, sous le numéro de dossier 2010/20. Toutes les manipulations expérimentales ont été mises en place avec trois babouins (*Papio anubis sains*) pesant 10 kg à 14 kg et supervisées par un animalier.

Chaque manipulation commence par la charge du nébuliseur dans la salle de préparation radiopharmaceutique avant chaque procédure *in vivo*. Le nébuliseur est rempli avec 1 mL de ^{99m}Tc-DTPA ajouté de 1mL de sérum physiologique. La charge radioactive du nébuliseur est déterminée par comptage à la gamma-camera pendant 1 minute (Ecam, Siemens).

Ensuite, avec l'aide de l'animalier responsable, l'anesthésie du babouin est réalisée. Cela est effectué par l'administration intramusculaire de xylazine à 1 mg/kg et de ketamine à la dose de 5 mg/kg. Cette anesthésie doit être suffisante pour la sédation des animaux tout en gardant un état d'éveil de façon à garder une respiration spontanée. Une fois anesthésié, le babouin est installé dans une chaise spécifiquement élaborée pour l'administration d'aérosols (Figure II.14-A). En suite, le nébuliseur chargé est connecté à un masque hermétique spécialement conçu pour les babouins (Ref 93815028, Temsega, France). Le masque est maintenu sur le nez et la bouche des babouins permettant la nébulisation (Figure II.14-B). Le temps de ventilation varie selon le nébuliseur utilisé et s'étend entre 6 et 10 minutes. Immédiatement après la fin de la nébulisation de la totalité de la charge, la gamma camera est positionné la face postérieure du babouin assis, et une matrice d'acquisition statique de données est lancée pendant 2 minutes avec une matrice de 128 × 128 pixels. A la fin de l'acquisition des données la manipulation est finie, et le résultat

obtenu est une image scintigraphique de ventilation enregistrée dans l'informatique associée à la gamma camera. Le babouin est alors remis dans son hébergement au sein de l'animalerie.

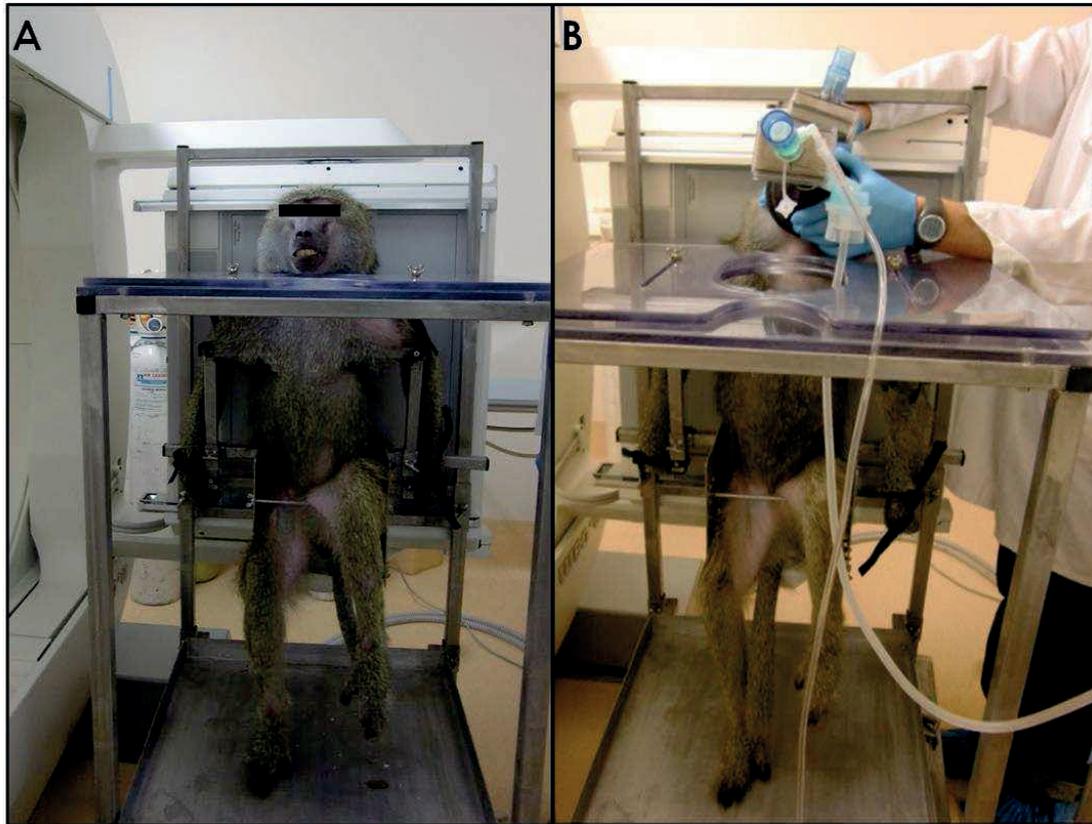


Figure II.14. Les expérimentations animale de cartographie de dépôt : détaille de la procédure avec un des babouins anesthésié jusqu'avant une nébulisation (A) et pendant la nébulisation (B).

Le plan d'expériences mis en œuvre a permis la réalisation de deux nébulisations de chaque nébuliseur par babouin. L'ensemble d'expériences *in vivo* a été randomisé pour chaque babouin, résultant dans 6 inhalations par babouin.

Le protocole détaillé et illustré de ce processus est montré dans la section « Annexes ».

3.2. Le traitement de données de scintigraphie

Toutes les images acquises avec les manipulations *in vivo* ont été post-traitées dans le software d'imagerie médicale SIEMENS. L'identification et la quantification du dépôt grâce aux analyses d'image ont permis ainsi de déterminer la cartographie du dépôt des aérosols radioactifs chez les babouins. La première étape du traitement des données est la définition des « régions d'intérêt » sur l'image scintigraphique, i.e. les ROI (Regions of Interest). Dans un premier temps, les ROI ont été tracées à partir de l'image de scintigraphie de perfusion de chaque singe (Figure II.7-A). La technique de scintigraphie de perfusion permet d'identifier la zone pulmonaire perfusée grâce à l'injection de ^{99m}Tc -macroagréats d'albumine par voie intraveineuse sont bloqués dans les capillaires pulmonaires. L'image résultante permet une identification des subdivisions pulmonaires, i.e. le poumon central, périphérique, supérieure, inférieure. La taille des ROIs correspondantes à ces subdivisions est calculée par rapport à l'unité pulmonaire, c'est-à-dire à la région totale de chaque poumon (Poumon Total). Ces calculs sont effectués par rapport au nombre de pixels de la région délimitée, résultant dans les relations suivantes (Figure II.15-A) :

- Le Poumon Total correspond au total de pixels de chaque poumon (droit et gauche) ;
- Le Poumon Central correspond à 1/3 du Poumon Total ;
- Le Poumon Périphérique correspond à 2/3 du Poumon Total ;
- Les Poumons Supérieure/Inférieure correspondent chacun à 1/2 du Poumon Total.

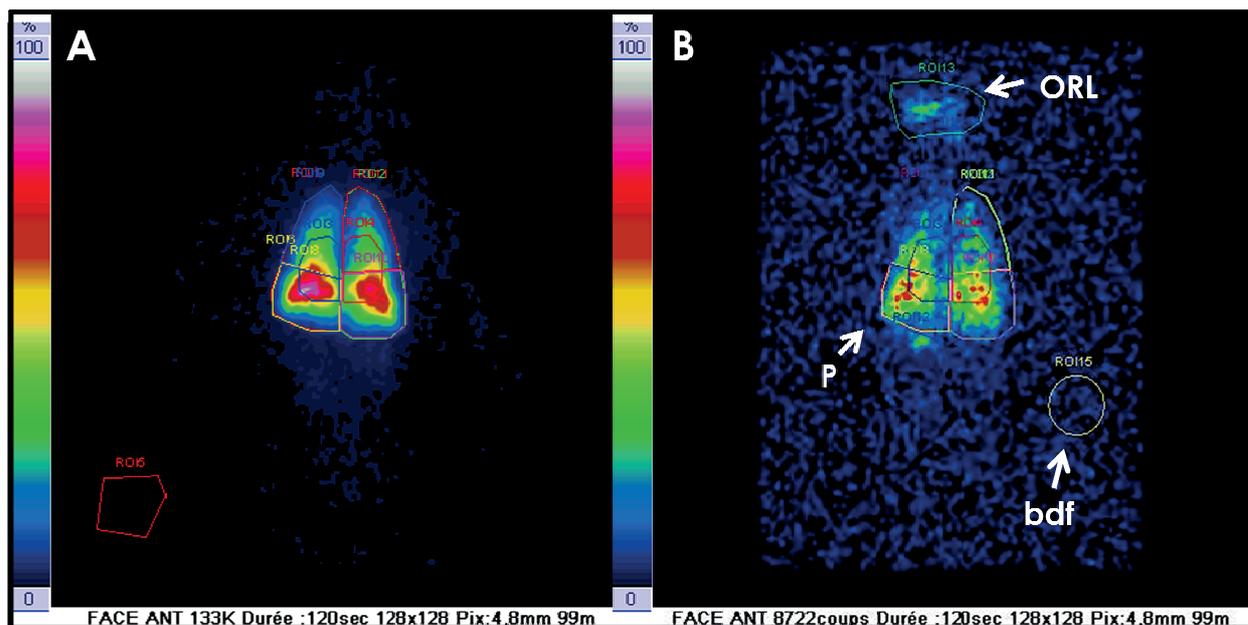


Figure II.15. Image de scintigraphie de perfusion (A) et une image de dépôt d'aérosol (B) pour un même babouin. Les ROIs de la région pulmonaire sont d'abord définis sur l'image de perfusion et ensuite transposés à l'image de ventilation (signalé par les flèches comme P). La région ORL et le bruit de fond (bdf) sont aussi déterminés sur l'image de ventilation (signalé par les flèches).

Une fois que les ROIs de la région pulmonaire ont été définis à partir des images de perfusion elles peuvent ainsi être appliquées aux images de ventilation de chaque babouin correspondant (Figure II.15-A). La cartographie du dépôt est finalement complétée par la détermination de la région de voies aériennes supérieures (ORL) et du bruit de fond (bdf) de l'image de ventilation (Figure II.15-B). La quantification du dépôt, en nombre de coups de radioactivité, est ainsi calculée pour chaque ROI à l'aide du logiciel d'imagerie. Le nombre de coups dans chaque ROI est ensuite corrigé par rapport au bruit de fond de l'image et de la décroissance radioactive. Le dépôt final (en nombre de coups) dans chaque ROI est ainsi déterminé par les équations suivantes :

$$A_{q,c} = A_{q,c} \times e^{-\lambda t}$$

$$A_{q,c} = A_{q,c} - A_{q,c} \left(\frac{t}{t_{1/2}} \right) \quad \lambda = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

Suffix *Aqc* = données provenant de l'acquisition au logiciel d'imagerie

Suffix *bdf* = bruit de fond

$t_{1/2 \text{ vie}}$ = temps de demi-vie du ^{99m}Tc

Afin de permettre une meilleure interprétation des résultats obtenus, toutes les données de quantification du dépôt sont analysées statistiquement. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Graphpad® Prism, version 5. Un test de comparaison multiple de Bonferroni a été utilisée pour comparer les données ($p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significatif).

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

1. GENERATION DE RADIONANOTRACEURS A FAÇON

1.1. Résumé Introductif

Étant donné que le dépôt des particules d'un aérosol dans les voies aériennes est fonction de leur taille, un des requis le plus importantes pour l'emploi d'un radiotracteur sous forme aérosol est la taille de ses particules résultantes. Les particules micrométriques ont tendance à s'impacter dans les bifurcations des voies aériennes, empêchant une bonne visualisation et le suivi du dépôt. Ainsi il est souhaitable que les aérosols radioactifs destinés à être inhalé soient composés de particules sub-micrométriques, préférentiellement dans l'ordre du nanométrique, c'est-à-dire, soit composé des radionanotraceurs.

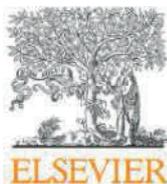
Le Technétium-99m est l'isotope de choix pour les radiotraceurs destinés à être inhalé en médecine nucléaire. Il est utilisé sous forme de $^{99m}\text{Tc-DTPA}$, soit dans sa forme d'ion pertechnétate TcO_4^- . En ce qui concerne les scintigraphies pulmonaires, le radiotracteur $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ est normalement destiné à la génération d'aérosols par nébulisation. Néanmoins cela constitue des aérosols contenant des particules de grande taille, qui n'assurent pas un dépôt dans le poumon profond. Il en résulte, par conséquent, une image scintigraphique de mauvaise qualité. De cette façon, la technique de nébulisation avec le $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ est maintenant rarement utilisée en scintigraphie pulmonaire. À son tour, l'ion pertechnétate est plutôt employée dans la production du Technegas, un aérosol de charbon marqué au Technétium qui montre des résultats, en général, très satisfaisants pour la scintigraphie de ventilation. Le Technegas est ainsi la technique alternative à l'utilisation du gaz krypton 81m dans les diagnostics de scintigraphie pulmonaire.

La seule problématique de l'utilisation du Technegas réside dans la taille de ses particules. La présence de quelques grosses particules dans cet aérosol peut résulter en dépôts localisés dans les bifurcations des voies aériennes, i.e. les *hot spots*, ce qui rend difficile l'interprétation diagnostique d'un examen. De plus chez les patients porteurs de pathologies obstructives, comme les BPCO,

les grosses particules du Technegas s'impactent contre les obstructions bronchiques, empêchant ainsi une ventilation correcte de l'aérosol dans les poumons. L'élimination des grosses particules dans le Technegas et la sélection de ses petites particules semblent être une intéressante voie d'optimisation de cet aérosol, afin d'augmenter son utilisation en Médecine Nucléaire.

En général, la réduction de la taille des aérosols radioactifs au niveau nanométrique, i.e. la production des radionanotraceurs, peut permettre non seulement une meilleure qualité des examens scintigraphiques de ventilation, mais également amener à une meilleure compréhension des mécanismes d'inhalation des nanoparticules et de la toxicologie.

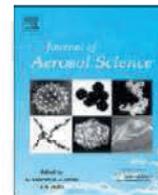
Un des objectifs de cette thèse était ainsi d'établir une procédure pour la génération de radionanotraceurs. Etant donné l'importance du Technegas dans le domaine de la scintigraphie pulmonaire, le *Technegas Generator* est apparu comme l'appareil de choix pour la réalisation de cette étude. En outre, des recherches récentes de Moeller et al. (2006) ont démontré des procédures efficaces pour la génération de nanoaérosols à partir du *Technegas Generator*. Basé sur la méthodologie proposée par ces auteurs, des investigations sur les paramètres de synthèse du générateur de Technegas ont été mises en place. Différentes méthodes de production de radionanotraceurs ont été investiguées, toutes dûment accompagnées de caractérisation métrologique de l'aérosol résultante. Cette étude est décrite en détail dans l'article présenté ci-après, soumis chez *Aerosol Science*.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Aerosol Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jaerosci



Generation and characterization of radiolabelled nanosized carbonaceous aerosols for human inhalation studies

Jérémy Pourchez^{a,b,c,*}, Iolanda M.D. Albuquerque-Silva^{a,b,c}, Michèle Cottier^{a,c,d,e,f}, Anthony Clotagatide^e, Laurent Vecellio^{g,h}, Marc Durand^{a,c,i}, Francis Dubois^{a,c,d,e,f}

^a LINA, EA 4623, Cours Fauriel F-42023, Saint-Etienne Cedex, France

^b Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie et Santé, 158, Cours Fauriel F-42023, Saint-Etienne Cedex, France

^c SFR IFRESIS, Cours Fauriel F-42023, Saint-Etienne Cedex, France

^d Université Jean Monnet, Faculté de Médecine, Cours Fauriel F-42023, Saint-Etienne Cedex, France

^e CHU de Saint-Etienne, F-42055 Saint-Priest en Jarez, France

^f Université de Lyon, Cours Fauriel F-42023, Saint-Etienne, France

^g DTF Aerodrug—Diffusion Technique Française, Tours, France

^h INSERM U1100-EA6305, Université François Rabelais, Tours, France

ⁱ Centre Hospitalier Emile Roux, F-43012 Le Puy en Velay, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2011

Received in revised form

20 July 2012

Accepted 27 July 2012

Available online 7 August 2012

Keywords:

Technegas

ELPI

Radiolabelled nanosized aerosols

Radioactive aerosol

Nanoparticle

ABSTRACT

New insights on the output of a commercial Technegas generator were proposed in order to optimize the generation of a radioactive nanosized aerosol for human inhalation studies. Parameters influencing Technegas generated aerosols (*i.e.* gaseous atmosphere, generation temperature and storage duration) were analyzed by a combination of size-fractionation and gamma-scintigraphy detection to determine the aerosol aerodynamic-related distributions. It was found that the total radioactivity per mass and number concentrations of aerosols was mostly influenced by the burn temperature, while the radiolabelling of particles was mostly driven by their surface area. ^{99m}Tc labeled nanosized carbonaceous primary particles appear mainly to result from nucleation/condensation of the supersaturated vapor during the burning step, and then coalesce into larger particles due to coagulation processes during the residence time in the expansion chamber. We showed that the burn temperature and the aerosol residence time were the main parameters influencing the particle size distribution. Under optimized operating conditions, the amount of radiolabelled nanoparticles substantially increased since the radioactivity median aerodynamic diameter was reduced by half (250 nm—GSD of 2.5) compared with the standard operating conditions of the Technegas generator (450 nm—GSD of 3.4).

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Radiolabelled aerosols are widely used to study airborne particle deposition patterns in the lung as well as lung clearance (Möller et al., 2006; Sanchez-Crespo et al., 2011; Carvalho et al., 2011). Among all the radiolabelled aerosols

* Corresponding author at: Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie et Santé, 158, Cours Fauriel 42230, Saint-Etienne Cedex, France. Tel.: +33 4 77 42 01 80; fax: +33 4 77 49 96 94.

E-mail address: pourchez@emse.fr (J. Pourchez).

clinically used in patients, one of the most convenient is the “Technegas technique” widely used to perform lung ventilation scintigraphy as a diagnostic technique in nuclear medicine. The aerosol produced is commonly known as Technegas, an ultrafine suspension of carbon particles labeled with technetium (^{99m}Tc). Technegas preparation takes place in a specially designed machine, called the Technegas generator, where a solution of sodium pertechnetate is loaded into a graphite crucible and evaporated until dry. Technegas is then generated by heating to 2550 °C in an atmosphere of pure argon. The number size distribution of Technegas particles is mainly below 100 nm (Vita Medical Ltd., 2000). Since more than 2 decades, this radioactive aerosol is regularly used as a ventilation scintigraphy agent, and the device is approved for human application without any toxicological issues (Jögi et al., 2010; Senden et al., 1997; Lloyd et al., 1995; Burch et al., 1986). Due to the short half-life of ^{99m}Tc (6.02 h), the radiation dose can be kept low (< 0.1 mSv) even though the resulting high activities allow high quality gamma-camera imaging in nuclear medicine.

Under standard operating conditions, the Technegas generator produces airborne particles with leaching rates $> 10\%$ which are too high for clearance studies. Since NaCl contained in the ^{99m}Tc -eluate also evaporates and condenses during the burning step, the particles have hygroscopic properties and the radiolabel leaches from them. Recently Möller et al., 2006 proposed several modifications to the operating conditions of the Technegas generator to avoid these drawbacks such as the use of NaCl free ^{99m}Tc -eluate. In addition the particles could be labeled by ^{111}In (Sanchez-Crespo et al., 2011) or $^{68}\text{GaCl}_3$ (Borges et al., 2011) instead of ^{99m}Tc to extend the investigation time of clearance studies from 1 day to a few weeks.

Although it is generally accepted that the Technegas generator produces a smaller particle size than other conventional radiolabelled aerosols, few data are available about its particle size characteristics. To the best of our knowledge no data have yet been reported on the relationship between radioactivity aerodynamic diameter (AMAD) although this parameter is crucial to assess deposition patterns. Even the median diameter remains poorly defined in the range from about 200 to 400 nm (Borges et al. 2011, Lemb et al., 1993; Strong and Agnew, 1989; Möller et al., 2006). In fact, clinical experiments in nuclear medicine indicate that radiolabelled Technegas particles are likely to impact on obstructions within the respiratory tract, which is a behavior typically attributed to micrometer sized aerosols (Jögi et al., 2010).

The radiolabelling mechanism and radiolabelling efficiency of airborne particles related to their aerodynamic size also remain poorly understood. Therefore, this study aims at new insights on the output of a Technegas device generating ^{99m}Tc labeled nanosized carbonaceous aerosols. The physical properties of the airborne nanoparticles in term of radiolabelling efficiency, number, mass and surface area concentrations are characterized by using a combination of size-fractionation and gamma-scintigraphy detection. Based on the experimental methodology previously developed by Möller et al., 2006, we also propose a better understanding of the effect of Technegas generator operating conditions on the characteristics of the radiolabelled particle size distributions. Finally, we also describe optimal operating conditions to generate radiolabelled carbonaceous nanoparticles.

2. Material and methods

The generation of Technegas was first reported in 1986, as a simple process consisting of evaporating Technetium (^{99m}Tc) containing eluate in a graphite crucible at 2500 °C (Burch et al., 1986). The Technegas generator is essentially a miniature high temperature furnace (Fig. 1). It uses a combination of graphite in an argon atmosphere to chemically reduce the pertechnetate ion TcO_4^- contained in the ^{99m}Tc sodium pertechnetate solution to metallic technetium (Tc), and then produce metallic aerosol particles by vaporizing both carbon and technetium elements. The inert atmosphere is critical to produce pure carbon or metallic aerosols (Evans et al., 2003). The crucible is the source of graphite vapour which ultimately coats the technetium metal. An AC electrical current passes through two conducting substrates (electrodes and crucible) possessing relatively low vapour pressure. The metallic aerosol forms first by nucleation/condensation of the vapour, followed by agglomeration of airborne nanoparticles composed of hexagonal platelets of metallic technetium (^{99m}Tc) closely encapsulated with a thin layer of graphitic carbon. During Technegas production, particles are not equally radiolabelled. The rapid volatilization of the species involved and the surface passivation of the resulting metallic aerosol are major factors influencing particles formation and stabilization, which may proceed differently according to particle size distribution (Senden et al., 1997).

In this work, the Technegas generator (Cyclomedica Pty Ltd, Australia) was operated in its “maintenance mode”, which allows modifying its operating conditions. A pyrometer was coupled to the generator in order to control burn temperature. For aerosol production, a standard graphite crucible was previously humidified with 99% ethanol in order to increase its wetability and then filled with a 200 MBq ^{99m}Tc -sodium pertechnetate solution placed in the Technegas generator chamber. The produced aerosol was subsequently analyzed by an electrical low pressure impactor (ELPI, Dekati Ltd., Finland) (Dekati Ltd., 2007) and a gamma camera (Millenium, GE, USA), to determine the particle size distribution both by weight, number, surface area and radioactivity. The NaCl content in ^{99m}Tc -eluate was also evaluated with respect to its influence on the final particle size distribution. All experiments were performed in triplicate and statistically analyzed (unpaired *t*-test).

2.1. Aerosol generation parameters

Under standard clinical operating conditions, the aerosol production is initiated through the “*simmer*” stage, which is characterized by a modification of the generator chamber atmosphere by argon flushing and a slight heating of the crucible

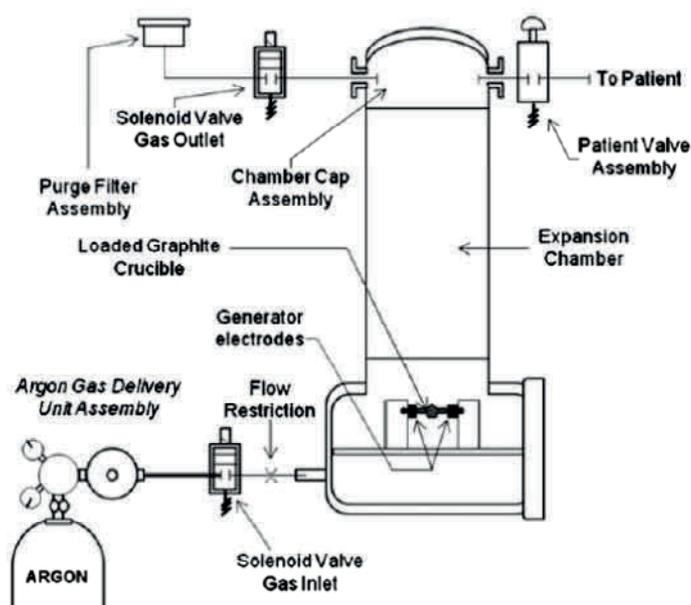


Fig. 1. Schematic diagram of the Technegas generator.

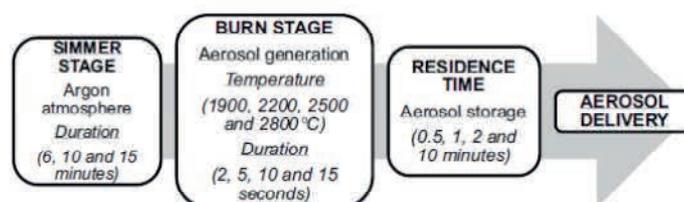


Fig. 2. Operating conditions of the Technegas generator: description of analyzed parameters.

up to 80 °C for a 6 min duration (Vita Medical Ltd., 2000). Under these conditions, the ^{99m}Tc eluate is evaporated to dryness, providing an intimate contact between the crucible and the species of ^{99m}Tc -sodium pertechnetate solution (Senden et al., 1997). Subsequently, the “burn” stage begins in which the crucible is finally heated to 2550 °C for 10 s (Vita Medical Ltd., 2000). This heating leads to technetium and carbon evaporation with subsequent condensation and aerosol formation. It is therefore reasonable to conclude that the major parameters influencing aerosol generation are the burn temperature, the duration of the simmer and the burn stages. Another important parameter is the residence time in the expansion chamber. During clinical procedures, a delay (*i.e.* a residence time in the expansion chamber) occurs between Technegas generation and its delivery to the patient. This delay is usually on the order of 2 min. During the residence time in the expansion chamber, particles are able to coagulate and agglomerate, with a significant impact on the subsequent size distribution of the radioactive aerosol delivery to the patient (Möller et al., 2006).

The standard clinical parameters for Technegas production are prescribed as 6 min of simmering, followed by 10 s of burning at 2500 °C followed by 2 min of residence time. However, in order to reduce the consumption of the generator electrodes, in this work the standard burn stage duration was reduced to 5 s instead of 10 s. The proposed change of operating conditions of the Technegas generator was based on a previous study from Möller et al. (2006). The analyses of particle size distribution were performed by varying each generation parameter: (I) simmer duration (6–15 min); (II) burn temperature (1900–2800 °C); (III) burn duration (2–15 s) and (IV) aerosol residence time (0.5–10 min). The operating conditions of the Technegas generator were summarized in Fig. 2.

2.2. Particle size distributions

Aerosol size distributions were determined using the ELPI low pressure impactor. The ELPI classifies by aerodynamic diameter, in 12 size fractions ranging from 10 μm to 7 nm (Virtanen et al., 2001; Marjamäki et al., 2000). The number concentration was converted to mass and surface area concentrations assuming the graphite crucible density (2.13 g cm^{-3}) for the particles. Differential distributions and normalized cumulative distributions are shown in accordance with the European standard EN 13544-1 for respiratory therapy equipment, which is widely employed for pharmaceutical aerosols. The cumulative distributions were normalized, *i.e.* data were expressed in % where 100% corresponds to total

radioactivity (from gamma-camera measurements) or total mass/number/surface area (from ELPI calculations) deposited on all the 12 collection plates of the cascade impactor.

2.3. Radioactivity measurements

A combination of ELPI size fractionation and gamma scintigraphy detection was used to determine the aerodynamic radioactivity size distribution. For this purpose, the aerosol was collected on cellulose substrates inserted on the collection plates of the impactor. The radioactivity of airborne particles deposited on each collection substrate was determined by gamma scintigraphy imaging during a 2 min acquisition time. The distribution of radioactivity is presented versus the ELPI stage mid-point aerodynamic diameter.

2.4. Electron microscopy observations and chemical analysis

Field Emission Gun Scanning Electron Microscopy (FEG SEM, Jeol JSM 6500F) was used to analyze the Technegas particles deposited within the ELPI stages. SEM observations coupled with image analysis also provided a mean geometric particle diameter for each size class of the ELPI.

The sodium and chloride concentrations in the Tc-eluate were obtained by ion chromatography with a Dionex apparatus composed of a GP50 pump, a CS12A column for cation analysis, a AS11HC column for anions, a CD conductometric detector and a UV-visible detector. The presence of NaCl in the airborne particles was characterized using energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) coupled with a scanning electron microscope. The EDX analytical technique was used for the elemental analysis of airborne particles (except carbon and technetium elemental detection). The sodium, chloride and technetium content of airborne particles were measured using X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). XPS is a quantitative spectroscopic technique for the elemental composition.

3. Results

3.1. Technegas aerosol under standard operating conditions

A linear correlation was found between the geometric diameter of particles calculated by image analysis from SEM images and the corresponding mid-point aerodynamic diameter of the ELPI stage (Fig. 3). Results show a particle distribution composed of a predominantly carbonaceous nature for the ultrafines particles (in the 30–300 nm size range) and the dominant NaCl content of the micron sized particles (Fig. 3). The sodium chloride content of numerous micrometer sized particles was clearly put in evidence by EDX spectroscopy during SEM observations and XPS analysis. On the ELPI stages corresponding to mid-point aerodynamic diameters higher than 1 μm , SEM images also show the presence of coagulated carbonaceous particles (data not shown but similar to Fig. 7), which precluded the correct determination of their geometric diameter, leading to slight deviations from ELPI measurements even if the overall correlation remains quite good.

The particle size distributions of the aerosol obtained under standard operating conditions used in clinical routine are first presented in terms of number, surface area, mass and radioactivity (Fig. 4). Number distributions are dominated by nanoparticles with aerodynamic diameters lower than 100 nm with a Count Median Aerodynamic Diameter (CMAD) of 40 nm (GSD of 2.9). However, radioactivity distributions indicate that radiolabelled particles are mostly distributed in the range between 100 nm and 1 μm , providing an Activity Median Aerodynamic Diameter (AMAD) of 450 nm (GSD of 3.4). Radioactivity distributions were found to be in good accordance with surface area distributions, characterized by a Surface Median Aerodynamic Diameter (SMAD) of 540 nm (GSD of 2.1). Finally, mass distributions showed particles exclusively distributed in the size range above 100 nm, leading to a Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) of 820 nm (GSD of 2.7).

The combination of aerodynamic and radioactivity measurements provides new insights into the radiolabelling process. A radiolabelling efficiency was defined as the ratio between activity (in fact radioactivity, in Bq) and mass from particles deposited on each ELPI stage. According to Fig. 5, particle radiolabelling is most efficient in the nanometer range and then decreases continuously with aerodynamic diameter.

The electric charge level of the freshly generated airborne Technegas particles was also checked by ELPI (using the ELPI with the corona charger OFF) in order to verify that the original electric charge of the particles does not affect the ELPI detection based on current measurement. Results show that the aerosol particles are weakly charged and that the charge distribution depends to the aerodynamic particle size. Particles are positively charged (13 fC) for sizes from 28 to 262 nm, negatively charged (-12 fC) in the range 262 nm to 1.6 μm , and finally neutral for sizes greater than 1.6 μm . In this case, the corona charger produces a sufficient amount of positive ions to first neutralize and then charge the particles normally up to 7500 fC, 500 times higher than the original electric charge of the particles. Furthermore, the use of cellulose substrates for particles recovery on the ELPI stages has no significant influence ($p < 0.05$) on the Technegas particle size distribution. Both methods generate aerosol with an AMAD of 445 (GSD of 3.0) and 450 nm (GSD of 2.7) respectively (Table 1).

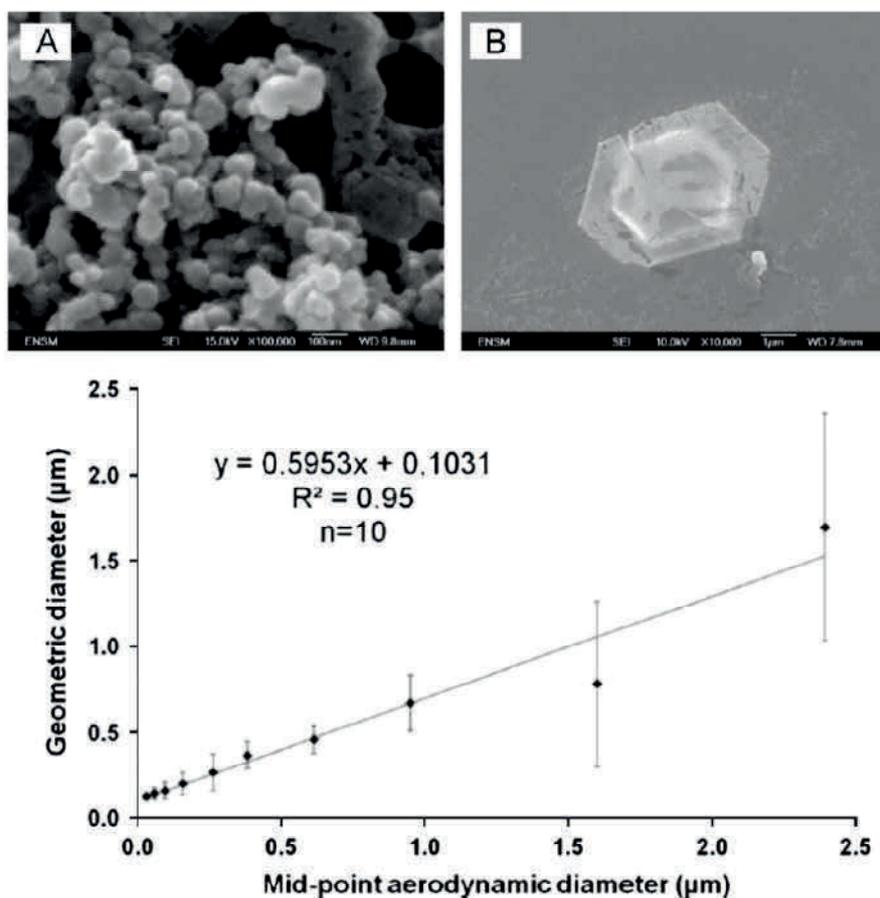


Fig. 3. EDX analysis coupled with SEM observation of ELPI stage showing carbonaceous nanoparticles (A) and NaCl crystals (B), Linear correlation between geometric diameter obtained by image analysis on SEM images and corresponding mid-point aerodynamic diameter determined by ELPI.

3.2. Technegas aerosol characteristics under modified operating conditions

We now show that the modified operating conditions significantly influence the particle size distribution (Fig. 6). Results are also summarized as mean of AMAD and GSD in Table 2. An increased simmer increases the amount of nanoparticles significantly. 15 min of simmering (instead of 6 min under standard clinical operating conditions) increase the nanoparticle population by 10%, leading to a reduction of the Technegas AMAD from 450 to 305 nm. Increasing the burn duration from 2 to 10 s also reduces the AMAD from 500 to 370 nm. However, increasing the burn duration beyond 10 s does not have a significant influence on the aerosol AMAD.

The burn temperature of the crucible, and the aerosol residence time in the expansion chamber, appear to be the main parameters affecting aerosol generation. Therefore, either an increase of burn temperature or a decrease of residence time leads to a substantial reduction of aerosol AMAD and an increased amount of radiolabelled nanoparticles. Increasing the burn temperature from 1900 °C to 2800 °C leads to a decrease of AMAD from 510 to 270 nm. A decrease of residence time from 10 min to 0.5 min gave a decrease of AMAD from 540 to 285 nm. SEM observations showed that the morphology of aerosols particles was also highly dependent on their residence time. Therefore, particle coagulation and agglomeration were visibly reduced for small aerosol residence times (30 s) but manifestly present for long residence times (10 min) (Fig. 7).

Moreover, the total amount of aerosol radioactivity, *i.e.* the number of technetium atoms fixed on carbonaceous particles, was also strongly influenced by the generation parameters, especially by the burn temperature (Fig. 8). Thus, a reduction of temperature to 1900 °C causes a significant reduction in total radioactivity, up to 4 times lower than in standard clinical operating conditions.

Finally, the radiolabelled particle size was mostly affected by the burn temperature. Thus, an optimization of the generation method is proposed based on adjustments of the burn temperature, in order to maximize the production of radiolabelled nanoparticles. This optimized method of radiolabelled aerosol production was performed by two consecutive burn stages, using both extremes of burn temperature of the generator: 5 s burn at 1900 °C followed by 5 s burn at 2800 °C. The optimized radiolabelled aerosol showed an aerodynamic particle size distribution with an AMAD of 250 nm (GSD of 2.5), about 2 times smaller than standard Technegas, but to a 15% increase of the radiolabelled nanoparticles (Fig. 9).

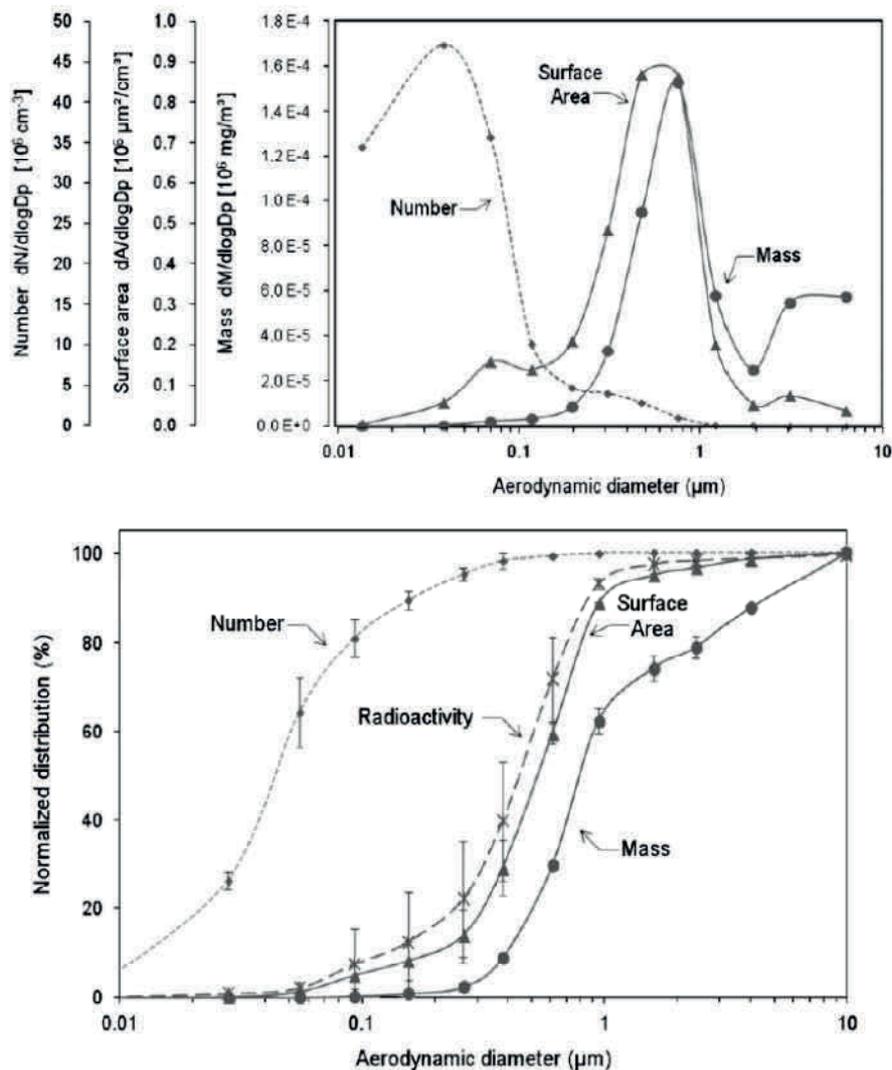


Fig. 4. Aerodynamic size distributions of aerosol generated under standard clinical operating mode: differential distributions from ELPI calculations (top) and cumulative distributions from combined ELPI and gamma-camera measurements (bottom).

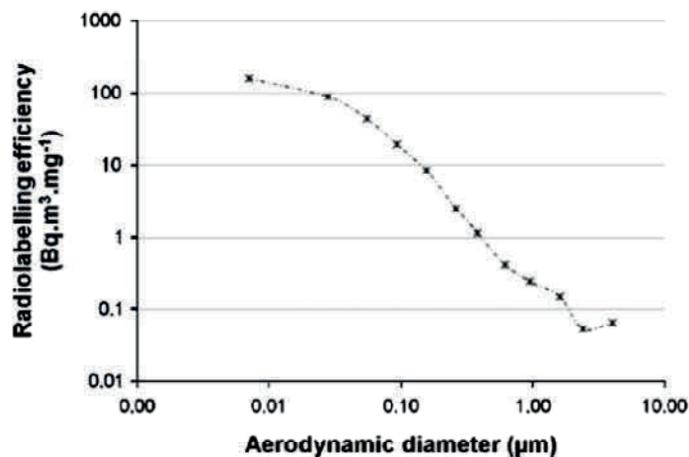


Fig. 5. Radiolabelling efficiency expressed as activity per particle mass.

Once the optimized conditions for Technegas production were determined, the influence of the NaCl content on Tc-eluate was analyzed. Ionic chromatography confirms the very low NaCl concentration (in the range 20–100 mg/L) of the NaCl free Tc-eluate, by comparison with the NaCl concentration of 9 g/L for NaCl Tc eluate. Results further

Table 1
Influence of ELPI collection substrates on aerosols particle size distributions: radioactivity median aerodynamic diameters (AMAD) and geometric standard deviation (GSD).

Generation mode	ELPI measurements	AMAD (nm)	GSD
Standard clinical operating conditions	Without collection substrates	450*	3.4
	With collection substrates	445*	3.0

* Values are not significantly different ($p < 0.05$).

prove that an initially NaCl-free eluate did not significantly modify the particle size distribution (AMAD of 200 nm) (Fig. 9).

4. Discussion

In the present study, based on a methodology combining radioactivity measurements and aerodynamic size fractionation, for the first time the Technegas size distributions are expressed in terms of size-related radioactivity, characterized by AMAD. Using ELPI based calculations, the aerosol was also characterized by its CMAD, SMAD and MMAD. These calculations are based on positive ion active surface areas measured by ELPI, and the masses of spheres with diameter equal to the midpoint aerodynamic values (D_a) of each stage. Active surface area is generally defined as the surface of a particle that is involved in interactions with the surrounding gas (Fuchs, 1963). Thus, the ELPI provides a real time size-selective (aerodynamic diameter) active surface-area concentration. In this sense the surface area measured by the ELPI is an active surface area quite relevant to describe Tc-carbone interactions. The active surface area distribution appears to be the most appropriate form to describe the radiolabelled particles distributions since a good correlation is observed between surface area and radioactivity cumulative distributions (Fig. 4). This original data demonstrates that particle radiolabelling is mostly proportional to their active surface area, rather than particle number or mass. In other words, the quantity of technetium atoms fixed on the carbonaceous particles is mainly dependent to their active surface area.

Further, the Technegas MMAD (820, GSD of 2.7) was found to be almost 20 times higher than its CMAD, which trivially indicates that Technegas nanoparticles, although abundant in number, are not significant in mass. However, activity measurements provide an AMAD (450 nm, GSD of 3.4) corresponding to the half of Technegas MMAD, which can be explained by the fact that its nanoparticles, although insignificant in mass, have a considerable radioactivity. The radiolabelling efficiency of Technegas particles, expressed by means of activity-to-mass ratio, also indicates that particle radiolabelling was more efficient on the nanometric scale (Fig. 5). This result highlights the role played by particle surface area during radiolabelling. In this sense, the higher active surface area to volume ratio of nanoparticles (compared to micrometric particles) can easily explain the continuous decrease of radioactivity to mass ratio with the increase of aerodynamic diameter. The remarkable radiolabelling efficiency of nanoparticles can also be explained by their mode of production. In previous work, Senden et al. (1997) observed that the radioactivity only leaves the crucible at the melting point for technetium (2250 ± 50 °C), which probably indicates that there is a passive mechanism of particle ejection from the crucible (i.e. the evaporation of the metal). Once in the vapor phase, technetium may condense as a metallic aerosol, being instantly passivated by condensed carbon (Senden et al., 1997).

Our data support the assumption that the generation of Technegas nanoparticles is driven by a mechanism quite similar to aerosol produced by spark discharge generators. Technegas nanoparticle generation could be therefore explained by a simultaneous ablation of technetium and graphite, caused by the striking of an alternative current arc from the thermionic plasma inside the crucible (Vita Medical Ltd., 2000). ^{99m}Tc labeled nanosized carbonaceous particles appear mainly to result from nucleation/condensation during the burning step followed by coagulation processes during the residence time in the expansion chamber. Nevertheless, these mechanisms are still not entirely proven and require further investigations.

All the operating conditions of the Technegas generator (i.e. simmer, burn duration, burn temperature and aerosol residence time) show an influence on the particle size distribution (Fig. 6). A decrease of aerosols AMAD was observed with increasing simmer and burn durations. These parameters apparently facilitate ablation and condensation phenomena and thus contribute to the AMAD reduction. Although the simmer and burn duration had some impact on the particle size distribution, stronger modifications were observed by adjusting on the residence duration in the expansion chamber and the burn temperature. Longer residence times obviously lead to coagulation and a higher AMAD (Table 2 and Fig. 7). This result confirms the relative instability of freshly radiolabelled nanoparticles over the time shown in previous studies (Lloyd et al., 1995; Möller et al., 2006). A noticeable reduction of AMAD from 510 nm (GSD of 3.0) to 270 nm (GSD of 2.7) was observed for an increase of burn temperature from 1900 °C to 2800 °C. Furthermore, burn temperature was the parameter which had the strongest influence on the total aerosol radioactivity (Fig. 8). As the burn temperature plays a major role on the output of Technegas device, an optimized method has been proposed which is based on a temperature of 1900 °C followed by 2800 °C to reduce the AMAD (Fig. 9).

Finally, we demonstrate that the absence of sodium chloride in the initial pertechnetate eluate does not significantly modify the particle size distribution (AMAD of 200 nm) compared to usual NaCl pertechnetate eluate (Fig. 9). This result

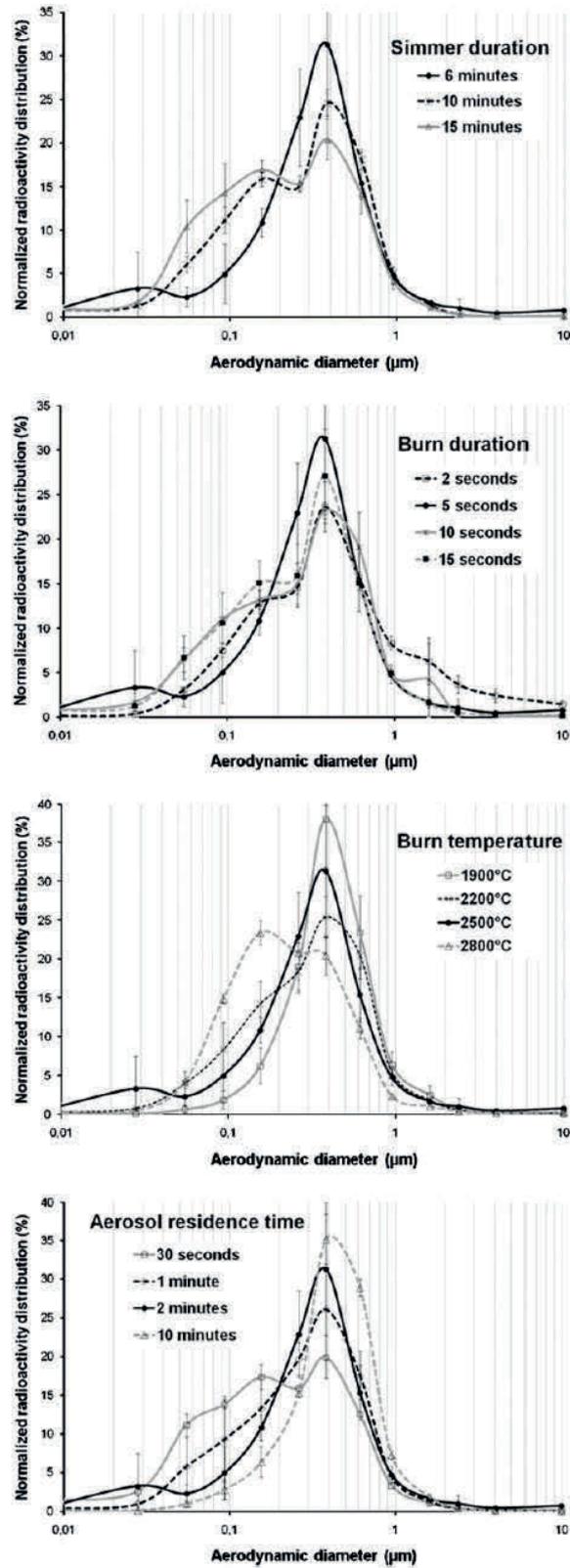


Fig. 6. Operating parameters influencing Technegas aerodynamic particle size distribution. Clinical operating conditions are used as a reference (distribution in black bold line).

Table 2

Radioactivity median aerodynamic diameters (AMAD) and geometric standard deviation (GSD) under standard clinical operating conditions, or under modified and optimized operating conditions (modified generation parameters in bold).

Analyzed parameters	Generation parameters				Particle size distribution	
	Simmer duration (min)	Burn duration (s)	Synthesis temperature (°C)	Residence time (min)	AMAD (nm)	GSD
Standard	6	5	2500	2	450	2.7
Simmer duration	10	5	2500	2	380*	2.1
	15	5	2500	2	305	2.2
Burn duration	6	2	2500	2	500	3.2
	6	10	2500	2	385*	2.5
	6	15	2500	2	370	2.9
Synthesis temperature	6	5	1900	2	510	3.0
	6	5	2200	2	420	2.5
	6	5	2800	2	270	2.7
Residence time	6	5	2500	0.5	285	2.8
	6	5	2500	1	380*	2.5
	6	5	2500	10	540	2.6
Optimized	6	10	1900 °C followed by 2800 °C		250	2.5

* Values are not significantly different ($p < 0.05$).

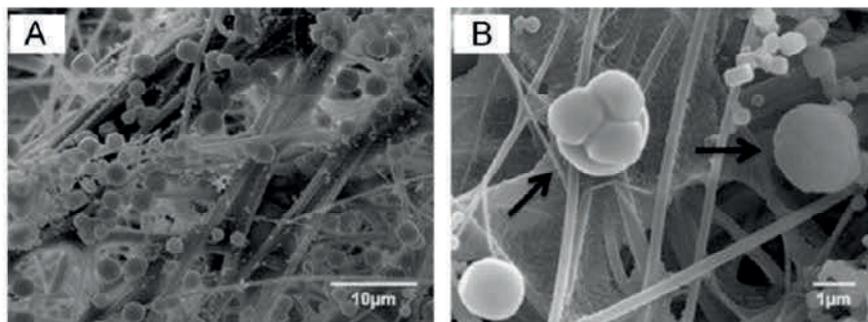


Fig. 7. SEM images of particles deposited on ELPI stage corresponding to mid-point aerodynamic diameter of 2.39 µm for residence times of (A) 30 s and (B) 10 min. Arrows indicate agglomerated particles.

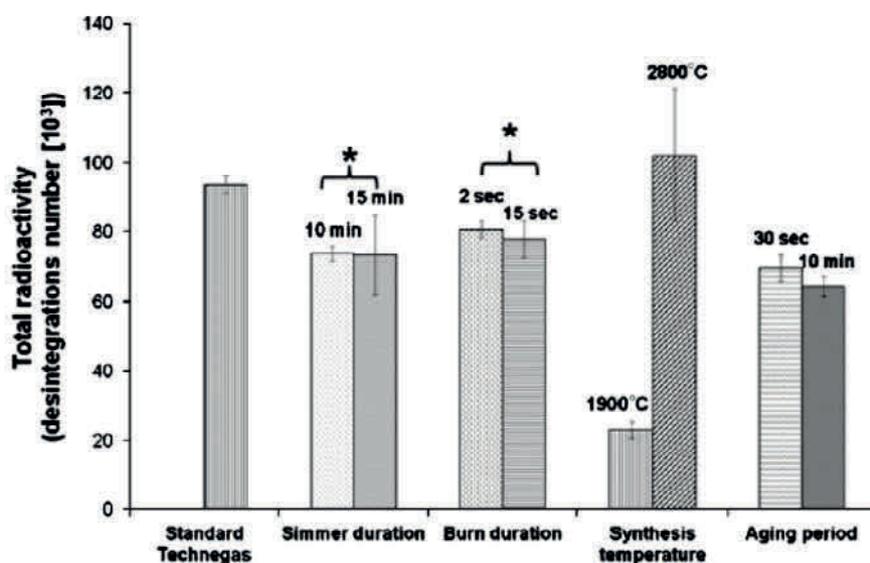


Fig. 8. Total radioactivity of evaluated radio-aerosols: influence of operating parameters (*: values are not significantly different, $p < 0.05$).

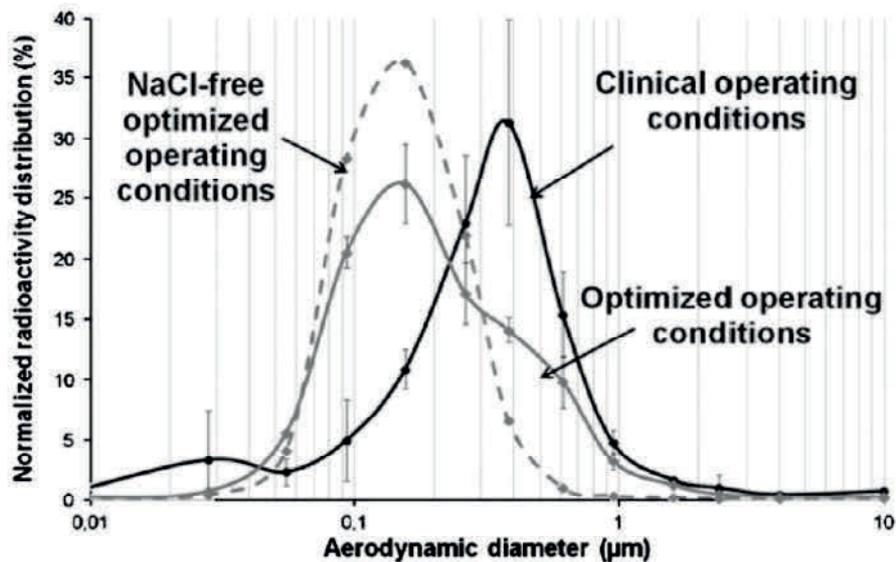


Fig. 9. Technegas aerodynamic particle size distribution: comparison between standard clinical production, optimized production and optimized production using NaCl free-eluate.

suggests that NaCl crystals generated using NaCl Tc-eluate are poorly radiolabelled compared to carbonaceous nanoparticles. Previous studies (Möller et al., 2006; Wiebert et al., 2006a, 2006b) demonstrated that the removal of NaCl from ^{99m}Tc -sodium pertechnetate also yielded low leaching rates of radiolabel from particles of below 4% within 24 h, and also guaranteed non-hygroscopic aerosol properties. The removal of NaCl from the Tc-eluate therefore seems to have several advantages.

5. Conclusion

The particle size distribution of the Technegas generator has been characterized from combined measurements of radioactivity (using a gamma camera) and aerodynamic sizing (using ELPI). Under standard clinical operating conditions, Technegas shows a radioactivity median aerodynamic diameter (AMAD) of 450 nm (GSD of 3.4). The particle size distribution and the total radioactivity of the aerosol are mostly influenced by the burn temperature. We proposed an optimized procedure to produce radiolabelled nanoparticles using the commercial Technegas generator consisting of two consecutive burns at 1900 °C and 2800 °C. Under optimized conditions, the median diameter of Technegas can thereby be reduced by half (250 nm), together with a substantial increase of its radiolabelled nanoparticle population.

Aerosols containing a greater amount of radiolabelled nanoparticles may permit better particle deposition within the respiratory tract. In this context an improvement of lung ventilation scintigraphy in nuclear medicine is conceivable. These new insights appear also valuable to assess deposition patterns of well-defined nanoparticles within the respiratory tract, in the case of inhalation toxicology and drug delivery by aerosol therapies. Finally, the proposed approach to optimize the generation of radioactive nanosized aerosol using the technegas generator can be coupled with other previous modifications such as a higher stable radiolabelling over time by removing NaCl from the Tc-eluate, or the possibility of $^{111}\text{In}/^{68}\text{GaCl}_3$ labelling, to enhance alveolar pattern deposition and provide potential clinical improvements on inhalation studies.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support of the Regional French Association for Aid to Chronic Respiratory Failure Patients (ARAIR), Saint-Etienne Métropole and the Conseil Général de la Loire, as well as the helpful conversations and experimental support of the Cyclopharma Laboratoires, France. The authors would like also to thank the editor for all corrections and helpful comments which greatly contribute to this paper. Finally, special thanks to Laurent Navarro (Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie et Santé, France) for his contribution to the image analysis and algorithm development on SEM images.

References

- Borges, J.B., Veliky, I., Langström, B., Sörensen, J., Ulin, J., Maripuu, E., Sandström, M., Widström, C., & Hedenstierna, G. (2011). Ventilation distribution studies comparing Technegas and "Gallgas" using $^{68}\text{GaCl}_3$ as the label. *Journal of Nuclear Medicine*, 52, 206–209.
- Burch, W.M., Sullivan, P.J., & McLaren, C. (1986). Technegas—a new ventilation agent for lung scanning. *Nuclear Medicine Communications*, 7, 865–871.

- Carvalho, T.C., Peters, J.I., & Williams, R.O. (2011). Influence of particle size on regional lung deposition—what evidence is there?. *International Journal of Pharmaceutics*, 406, 1–10.
- Dekati Ltd., 2007. ELPI in pharmaceutical measurements. Dekati Ltd. Application Note.
- Evans, D.E., Harrison, R.M., & Ayres, J.G. (2003). The generation and characterization of elemental carbon aerosols for human challenge studies. *Journal of Aerosol Science*, 34, 1023–1041.
- Fuchs, N. (1963). On the stationary charge distribution on aerosol particles in a bipolar ionic atmosphere. *Geofisica Pura e Applicata*, 56, 185–193.
- Jögi, J., Jonson, B., Ekberg, M., & Bajac, M. (2010). Ventilation-Perfusion SPECT with ^{99m}Tc-DTPA versus Technegas: a head-to-head study in obstructive and nonobstructive disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 51, 735–741.
- Lemb, M., Oei, T.H., Eifert, H., & Günther, B. (1993). Technegas: a study of particle structure, size and distribution. *European Journal of Nuclear Medicine*, 20, 576–579.
- Lloyd, J.J., Shields, R.A., Taylor, C.J., Lawson, R.S., James, J.M., & Testra, H.J. (1995). Technegas and Pernechnegas particle size distribution. *European Journal of Nuclear Medicine*, 22, 437–476.
- Marjamäki, M., Keskinen, J., Chen, D.R., & Pui, D.Y.H. (2000). Performance evaluation of the electrical low-pressure impactor (ELPI). *Journal of Aerosol Science*, 31, 249–261.
- Möller, W., Felten, K., Seitz, J., Sommerer, K., Takenaka, S., Wiebert, P., Philipson, K., Svartengren, M., & Kreyling, W.G. (2006). A generator for the production of radiolabelled ultrafine carbonaceous particles for deposition and clearance studies in the respiratory tract. *Journal of Aerosol Science*, 37, 631–644.
- Sanchez-Crespo, A., Klepczynska-Nyström, A., Lundin, A., Larsson, B.M., & Svartengren, M. (2011). Indium-labeled ultrafine carbon particles; a novel aerosol for pulmonary deposition and retention studies. *Inhalation Toxicology*, 23, 121–128.
- Senden, T.J., Mook, K.H., Gerald, J.F., Burch, W.M., Browitt, R.J., Ling, C.D., & Heath, G.A. (1997). The physical chemical nature of Technegas. *Journal of Nuclear Medicine*, 38, 1327–1333.
- Strong, J.C., & Agnew, J.E. (1989). The particle size distribution of Technegas and its influence on regional lung deposition. *Nuclear Medicine Communications*, 10, 425–430.
- Virtanen, A., Marjamäki, M., Ristimäki, J., & Keskinen, J. (2001). Fine particle losses in electrical low-pressure impactor. *Journal of Aerosol Science*, 32, 389–401.
- Vita Medical Ltd., 2000. Technegas Service Manual Document no. 70305, pp. 2–4.
- Wiebert, P., Sanchez-Crespo, A., Falk, R., Philipson, K., Lundin, A., & Larsson, S., et al. (2006a). No significant translocation of inhaled 35-nm carbon particles to the circulation in humans. *Inhalation Toxicology*, 18, 741–747.
- Wiebert, P., Sanchez-Crespo, A., Seitz, J., Falk, R., Philipson, K., Kreyling, W.G., Moller, W., Sommerer, K., Larsson, S., & Svartengren, M. (2006b). Negligible clearance of ultrafine particles retained in healthy and affected human lungs. *European Respiratory Journal*, 28, 286–290.

2. GENERATION DE « NANOCARRIER » LIQUIDE A FAÇON

2.1. Résumé Introductif

Les transporteurs de drogues, couramment appelés en son terme anglais *drug carriers*, sont des particules pourvues d'une configuration et de mécanismes spécifiques, capables d'améliorer la délivrance et l'efficacité des médicaments ou d'autres pharmaceutiques. Dans le domaine de l'aérosolthérapie, les vecteurs peuvent être considérés comme les particules d'un aérosol qui transportent des principes actifs. Toutefois, la cible et l'efficacité de délivrance de ces particules dépendent de leur taille. Pour un usage thérapeutique des aérosols, il est souhaitable que la drogue atteigne le niveau alvéolaire, et par conséquent, il faut que la taille de particules vectrices de l'aérosol soit préférentiellement de l'ordre du submicronique. C'est-à-dire, une meilleure efficacité thérapeutique pourrait être obtenue en utilisant des nano-vecteurs.

Les nébuliseurs pneumatiques sont largement employés dans des thérapies visant une délivrance de médicament au poumon profond. En effet, ce type de générateur est d'utilisation facile et représente un coût faible tout en étant compatible avec la plupart des médicaments. Toutefois, la taille des particules produites par des nébuliseurs pneumatiques sont normalement dans la gamme micronique (le standard est un MMAD d'environ 4 μm), ce qui résulte dans un dépôt irrégulier des particules dans les voies aériennes et par conséquent, un faible dépôt dans la région d'intérêt. Bien que les technologies récentes aient beaucoup avancé dans l'élaboration de dispositifs capables de produire des particules avec un MMAD plus petit que le standard (par exemple le Swirler® avec un MMAD de 760 nm et le Venticis-II® avec un MMAD de 660 nm), il n'existe pas encore sur le marché de nébuliseurs capables de produire des nanoparticules, i.e. nano-vecteurs, pouvant assurer un dépôt ciblé des particules dans la région alvéolaire.

Etant donnée cette problématique dans l'aérosolthérapie, un des objectifs de cette thèse est le développement d'un générateur des nano-vecteurs liquides. L'intérêt d'un tel générateur serait d'atteindre, par diffusion, les régions pulmonaires profondes et de limiter le dépôt dans la sphère ORL. En outre, un dispositif capable de produire des nanoparticules peut également permettre l'étude de la cartographie de dépôt des particules aérosolisées et amener ainsi à une meilleure connaissance du devenir des nanoparticules dans les voies respiratoires. En effet, c'est seulement

à travers la génération des nanoparticules qu'un nébuliseur peut assurer une délivrance ciblée de particules au niveau du poumon profond, c'est-à-dire, assurer un dépôt alvéolaire-spécifique.

Pour aboutir à l'objectif de cette étude, un partenariat scientifique avec la plateforme AeroDrug de l'entreprise « Diffusion Technique Française - DTF Médicale » (Saint-Etienne, France) a été établi. Grâce au vaste savoir faire de cette entreprise, il a été possible de développer 12 prototypes de nébuliseurs pneumatiques basés sur le principe de Venturi qui ont été construits en deux phases de production distingués et consécutives (Figure II.1). Néanmoins, dû au processus de brevet en cours, les détails techniques du développement de ces nébuliseurs ne peuvent pas être présentés dans cette thèse.



Figure II.1. Exemple de un des nébuliseurs pneumatiques développés pour la production de nano-vecteurs liquides. AeroDrug – DTF Medical.

Trois nébuliseurs commerciaux (Atomisor NL11® de DTF ; Swirler® de AMICI ; et Venticis-II® de CISBIO) ont été utilisés comme référence. La méthodologie normative NE 13544 a été employée pour la détermination de la taille des particules des aérosols nébulisés (Cf. Matériel et Méthodes 2.1). Les résultats obtenus montrent que l'objectif final de cette étude a été atteint et qu'il est possible de produire des nano-vecteurs grâce à des techniques de nébulisation.

2.2. Résultats et discussions

2.2.1. La granulométrie des aérosols

La Figure II.2 montre les distributions normalisées obtenues pour la première série de prototypes (F1-F7) et leur comparaison à des nébuliseurs commerciaux : le nébuliseur pneumatique classique « standard » - ATOMISOR NL11® (DTF) et les nébuliseurs «Precisaly Alveolar» - Swirler® (AMICI) et Venticis II® (CISBIO).

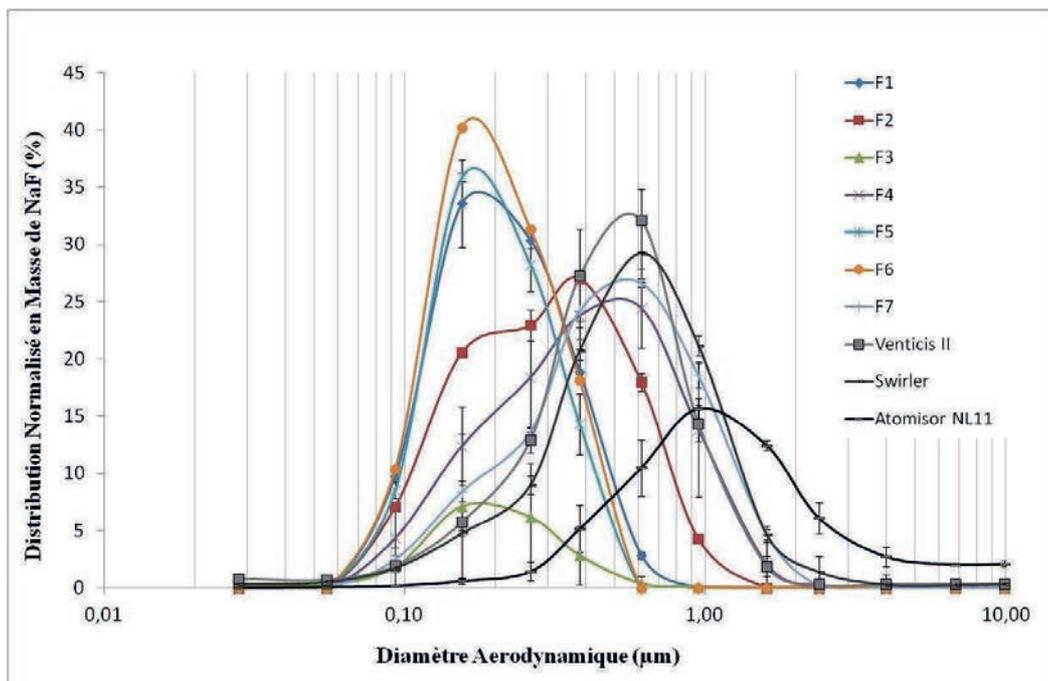


Figure II.2. Distribution massique normalisé – comparaison entre les prototypes de nébuliseurs nanométriques et les nébuliseurs commerciaux : Atomisor NL11, Swirler et Venticis II.

Les distributions normalisées obtenues pour les prototypes de la deuxième série (F8, F9, F10, F11 et F0) sont montrées dans la Figure II.3.

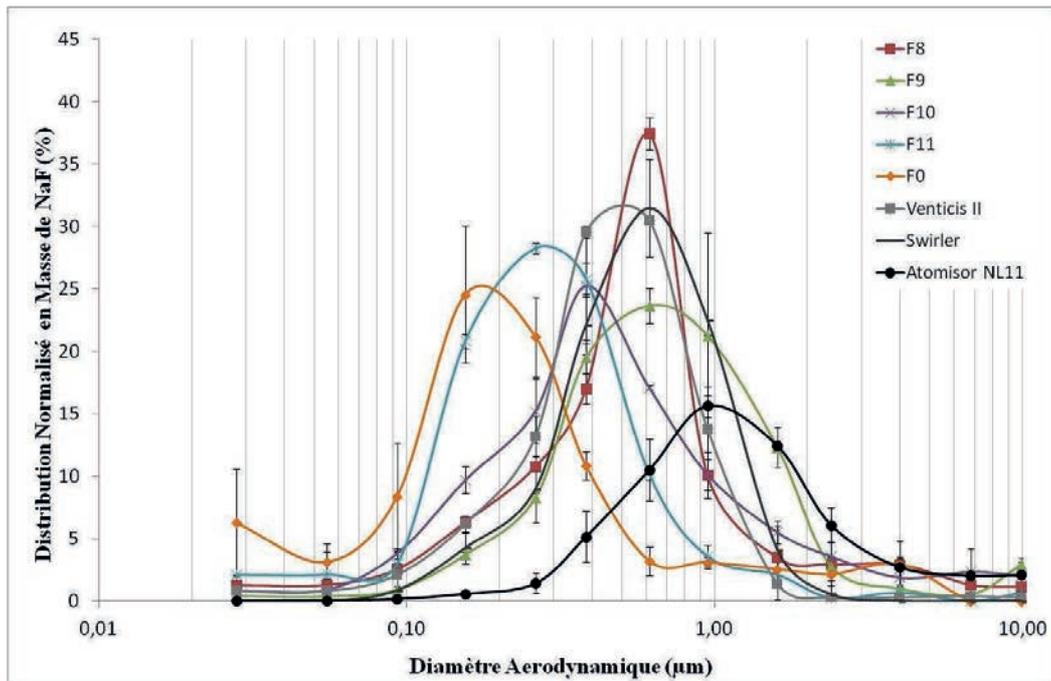


Figure II.3. Distribution massique normalisée : comparaison entre les prototypes de nébuleuses nanométriques de la deuxième série de fabrication (du F8 au F0) et les nébuleuses commerciales (Atomisor NL11, Swirler et Venticis II).

Le diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) des aérosols générés par les prototypes est indiqué dans le Tableau II.1. Ainsi, il est possible de distinguer 3 familles de MMAD différents parmi les prototypes:

- I. Une première famille de nébuleuse, générant les particules les plus nanométriques (260-310 nm), est formée par les prototypes F1, F5, F6 et F0.
- II. Une deuxième famille, intermédiaire (360-380 nm), est constituée par le prototype F2 et F11.
- III. Une troisième famille, de MMAD plus élevé (560-870 nm), est formée par les prototypes F4, F7, F8, F9 et F10.

Le prototype F3 n'est pas sur le Tableau 1 car leur résultats ne sont pas interprétables : une très faible aérosolisation a été obtenue, biaisant les mesures. La cause de ce faible débit d'aérosol semble être liée au design de ce nébuleuse, qui ne présente pas la «jupe dentelée» normalement

présente sur les autres prototypes. L'absence de ce dispositif provoque donc l'entrée du liquide de nébulisation dans la sortie du nébuliseur, formant un obstacle à l'aérosolisation (Figure II.4).

Tableau II.1. Diamètres aérodynamiques médian en masse (MMAD) et écart-type géométrique (GSD) des aérosols produits par des prototypes : réunis en différentes familles en fonction de la taille des particules.

Famille	Prototype	MMAD (nm)	GSD
I	F6	260	1,58
	F1	290	1,76
	F5	290	1,99
	F0	310	1,65
II	F11	360	1,91
	F2	380	1,94
	F10	560	3,14
III	F4	580	1,93
	F7	630	2,00
	F8	710	2,01
	F9	850	2,34



Figure II.4. Erreur dans la nébulisation en utilisant le prototype F3 : entrée du liquide dans la partie supérieure du nébuliseur (indiqué par la flèche rouge).

Les granulométries des nébuliseurs commerciaux utilisés comme référence sont montrées dans la Figure II.5.

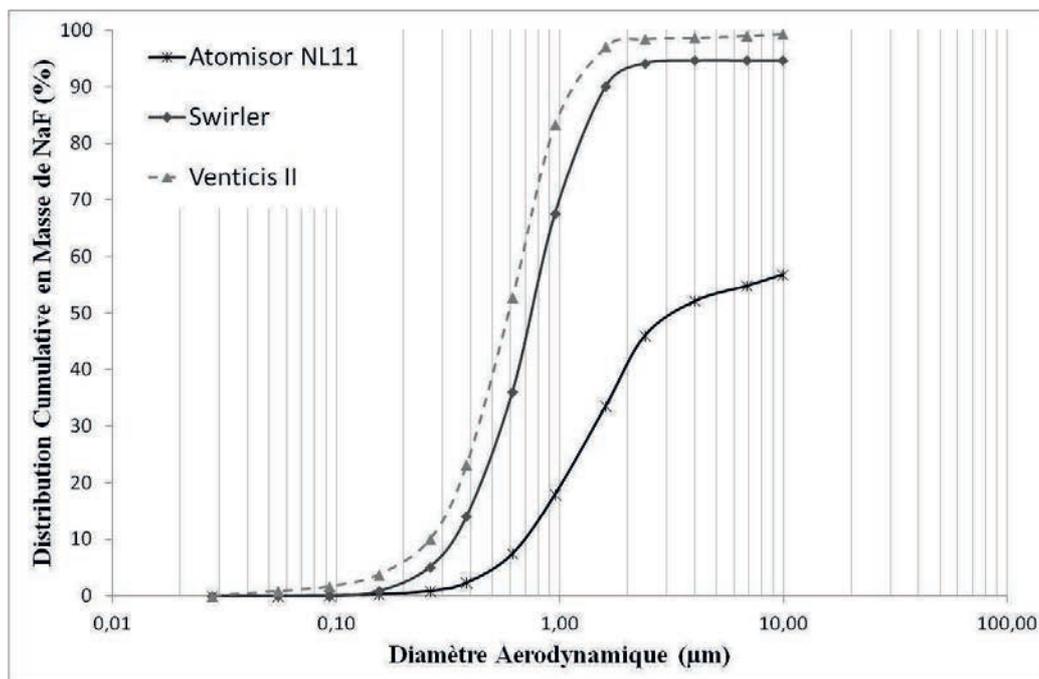


Figure II.5. Distribution massique cumulative pour le calcul du diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD) des aérosols commerciaux : Atomisor NL11 (3,45 µm), Venticis II (590 nm) et Swirler (760 nm). Note : l'Atomisor NL11 présente un grand dépôt massique sur la trachée, faisant que la distribution massique n'atteint pas 100%.

En général, les résultats obtenus dans cette étude granulométrique montrent que l'ensemble des prototypes, excepté le F3, produisent des aérosols avec des MMAD très inférieurs au nébuliseur classique ATOMISOR NL11® (MMAD = 3,45 µm ; GSD = 3,10). De plus, quelques prototypes, notamment le F0, F1, F2, F5, F6, F10 et F11 produisent des aérosols encore plus nanométriques que les nébuliseurs actuellement commercialisés comme « alvéolaire spécifique », i.e. le Venticis II (MMAD = 590nm ; GSD = 1,72) et le SWIRLER® (MMAD = 760nm ; GSD = 1,97).

2.2.2. Les fractions aérosolisées

Il est possible d'estimer la fraction aérosolisée par chaque nébuliseur à travers les résultats granulométriques obtenus dans les manipulations avec l'ELPI. Ainsi, la fraction aérosolisée a été calculée comme étant la somme totale de la masse, en mg de NaF, déposée sur chaque étage de l'impacteur y compris la trachée. Les résultats montrent que les fractions aérosolisées par les prototypes sont environ dix fois plus faibles que le débit d'un nébuliseur conventionnel Atomisor NL11 (Figure II.6). En effet, cette fraction varie entre 1 et 11% de la fraction aérosolisée par l'ATOMISOR. Néanmoins, les fractions aérosolisées par les prototypes F7 et F4 sont en accord avec celles du nébuliseur « alvéolaire spécifique » Swirler (Figure II.7). Il apparaît donc, que le débit est proportionnel à la taille des particules. Les fractions aérosolisées élevées sont observées pour les aérosols présentant un MMAD important.

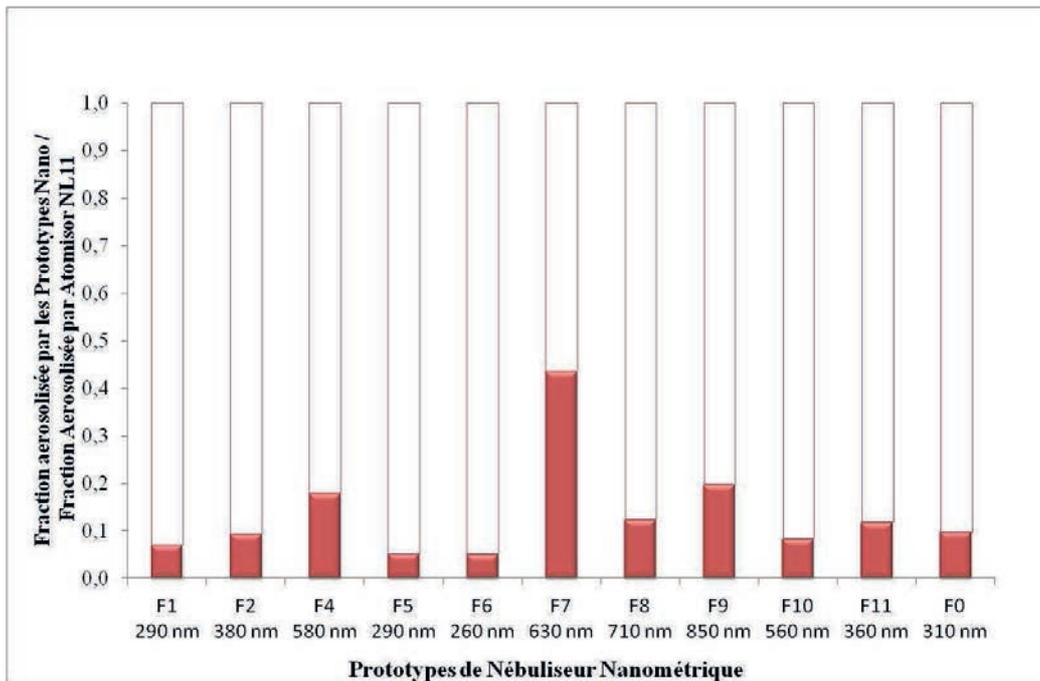


Figure II.6. Comparaison entre le débit massique des particules aérosolisées par les prototypes en utilisant comme référence le nébuliseur commercial Atomisor NL11® (i.e. 100% sur le graphique correspond au débit calculé pour le Atomisor NL11®).

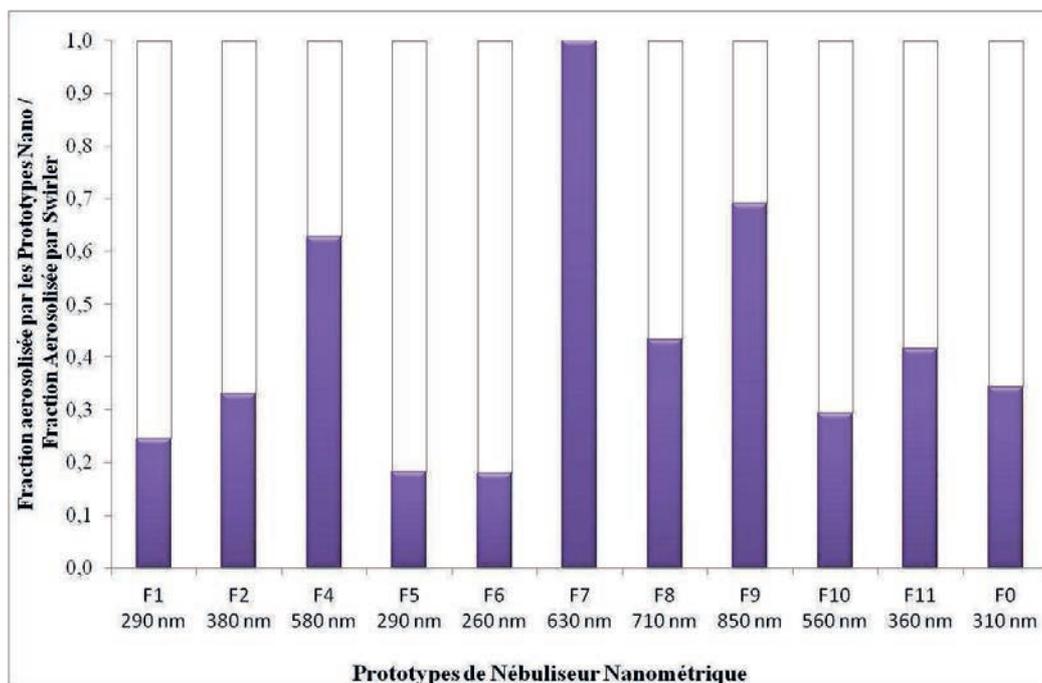


Figure II.7. Comparaison entre le débit massique des particules aérosolisées par les prototypes en utilisant comme référence le nébuliseur commercial Swirler® (i.e. 100% sur le graphique correspond au débit calculé pour le Swirler®).

2.2.3. La génération de nanoparticules

La technologie de nébulisation des prototypes élaborés est basée sur le nébuliseur standard Atomisor NL11 de DTF Médical (Saint Etienne). Par conséquent, deux mécanismes peuvent expliquer les différences de génération de nanoparticules par les prototypes « nano » par rapport à son modèle de base, l'Atomisor : un phénomène plus important de génération des nanoparticules liquides et/ou un phénomène de sélection des particules de MMAD plus important.

La première série de prototypes (F1 au F7) montre un phénomène de génération de nanoparticules associé à un phénomène de sélection pour tous les nébuliseurs. Le phénomène de génération est clairement observé pour les tailles nanométriques (entre 7 nm et 400 nm), car le nombre de particules générées par les prototypes « nano » est beaucoup plus important que pour l'Atomisor (Figure II.8). En effet, le phénomène de sélection peut être mis en évidence grâce à une diminution importante du nombre de particules à partir de 400 nm par rapport au nébuliseur classique.

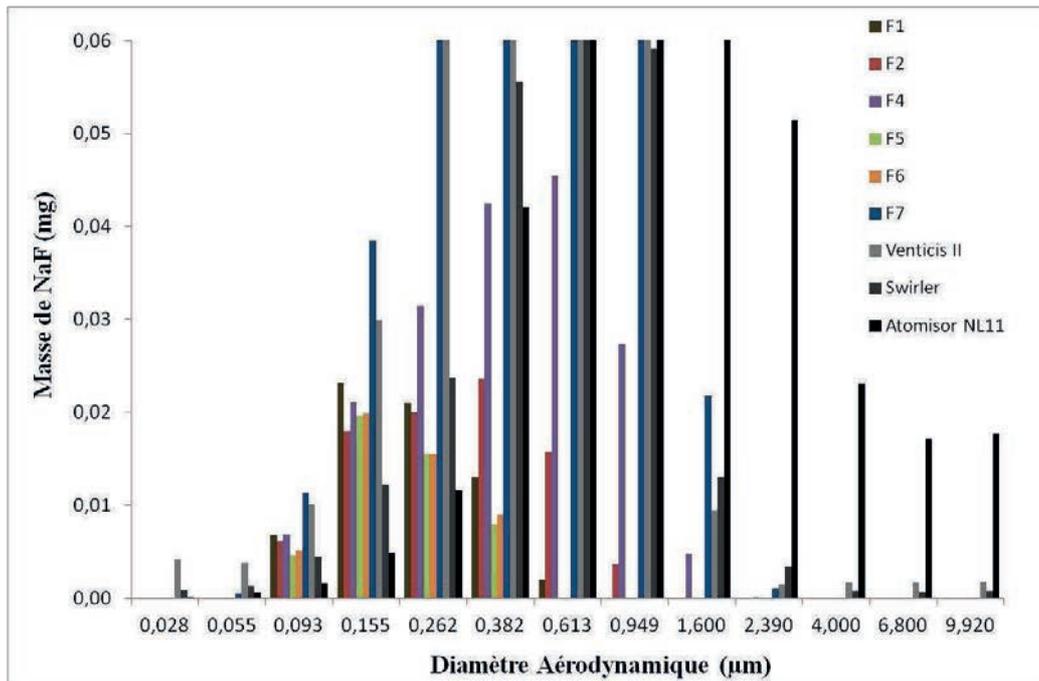


Figure II.8. Distribution non-normalisée de la masse de NaF déposée sur les plateaux de l'impacteur : observation de phénomènes de sélection et/ou génération de nanoparticules par les nébuliseurs développés dans la première série de production et comparaison avec les nébuliseurs commerciaux.

Toutefois, quand les prototypes « nano » sont comparés aux nébuliseurs « nanométriques » commerciaux, un phénomène de génération de nanoparticule plus important est observé uniquement pour le prototype F7 (Figure II.8). En effet, pour les tailles nanométriques, le nombre de particules générées par le prototype F7 est beaucoup plus important que pour le Swirler®.

Pour la deuxième série de prototypes, une génération de nanoparticules est légèrement observée pour le F11, car seulement ce nébuliseur montre une masse de F⁻ plus importante que celle produite par l'Atomisor dans les étages « nano » (100 - 400 nm) (Figure II.9). Néanmoins, le phénomène de sélection de grosses particules est observé pour l'ensemble des prototypes, une fois qu'ils présentent une faible concentration massique dans les étages correspondant à des diamètres aérodynamiques importants (1- 10µm) (Figure II.9).

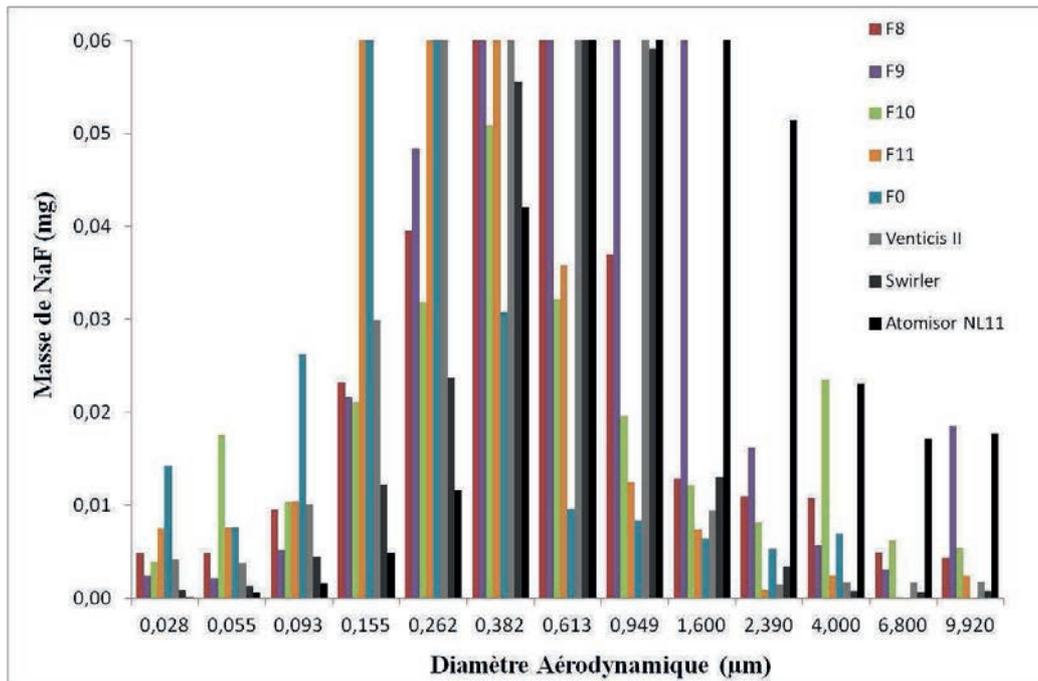


Figure II.9. Distribution non-normalisé de la masse de NaF déposé sur les plateaux de l'impacteur : observation de phénomènes de sélection et/ou génération de nanoparticules par les nébuliseurs développés dans la deuxième série de production et son comparaison avec les nébuliseurs commerciaux.

2.2.4. Granulométrie d'aérosols radioactifs

Une fois que tous les prototypes ont été analysés selon la norme européenne de granulométrie d'aérosols (NF EN 13544-1), les deux prototypes le plus intéressants sur le plan de la granulométrie ont été choisis pour effectuer des essais de nébulisation radioactive avec du ^{99m}Tc -DTPA. Pour cela, les prototypes F0 et F7 ont été choisis. Les raisons du choix de ces deux nébuliseurs demeurent dans les faits que le prototype F0 a montré un des plus faibles MMAD, tout en maintenant une fraction aérosolisée acceptable ; et que le prototype F7 a présenté le plus important phénomène de génération de nanoparticules ainsi que la plus grande fraction aérosolisée.

L'analyse granulométrique des prototypes en utilisant un radiotracteur a été réalisée dans le but de déterminer la distribution en taille des particules des aérosols résultantes et par conséquent la

détermination du générateur le plus adéquat pour l'étude de cartographie de dépôt. En effet, l'utilisation d'aérosols radioactifs semble être la façon la plus précise de déterminer le dépôt des nanoparticules dans les voies respiratoires.

La granulométrie des aérosols radioactifs produite par les prototypes F0 et F7 a été analysée à l'aide de l'ELPI couplé d'une détection avec une gamma caméra (Cf Matériel et Méthodes 2.2). Les nébuliseurs commerciaux Atomisor NL11 (DTF) et Swirler (AMICI) ont été utilisés comme références.

Les résultats métrologiques montrent un changement de la distribution en taille des particules dû à l'utilisation du ^{99m}Tc -DTPA (Figure II.10). Cela peut être expliqué parce que dans ce type d'analyse les particules de l'aérosol sont classifiées selon leur activité radioactive et dans la métrologie normative précédente la classification des particules est réalisée par rapport à leur masse. En plus, l'analyse d'une distribution en taille des particules d'un aérosol radioactif est caractérisée par le diamètre aérodynamique moyen en activité de leurs particules, i.e. l'AMAD de l'aérosol (*Activity Median Aerodynamic Diameter*).

Le Tableau II.2 montre les AMADs obtenus en utilisant le ^{99m}Tc -DTPA comme solution de nébulisation avec les prototypes F0 et F7 ainsi que les nébuliseurs commerciaux. Cela démontre que la caractérisation de particules aérosolisées selon leur activité résulte dans des AMADs avec des valeurs significativement plus faibles que leurs MMAD correspondants. En plus, les résultats montrent clairement que les particules actives générées sont majoritairement dans l'ordre du submicronique, surtout pour le prototype F0 qui montre une efficace production des nanoparticules radioactives (Figure II.10).

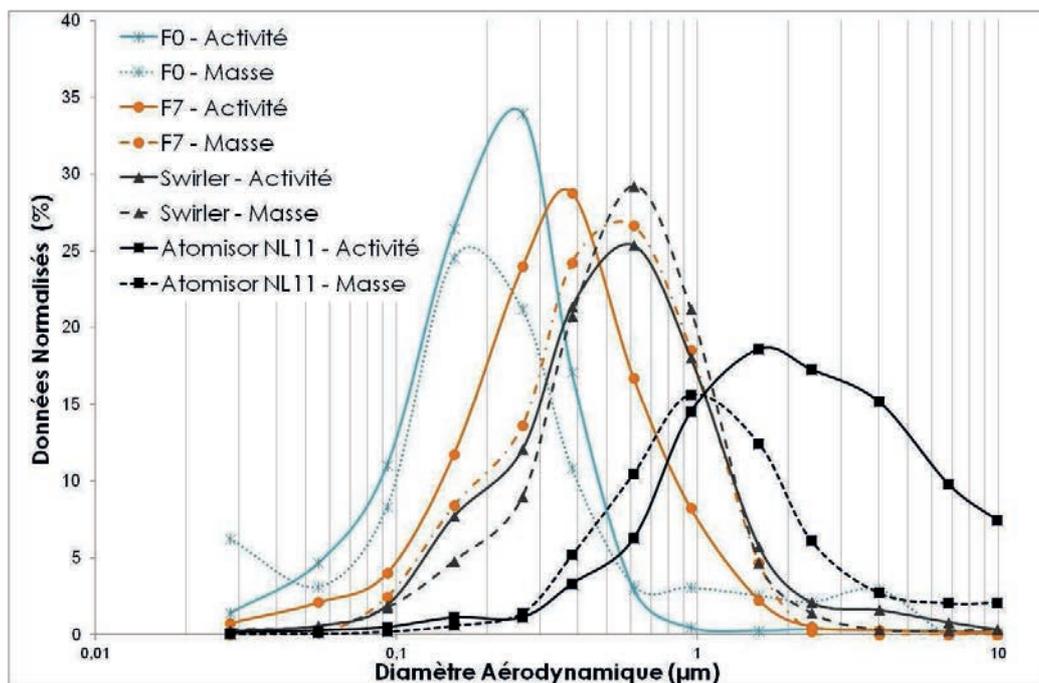


Figure II.10. Distributions normalisées en taille de particules : classification par rapport à l'activité des particules (lignes continues – nébulisation avec $^{99m}\text{Tc-DTPA}$) et classification par rapport à la masse des particules (lignes pointillées – nébulisation avec NaF)

Tableau II.2. Comparaison entre les valeurs de Diamètre Aérodynamique moyen en Activité (AMAD) et en Masse (MMAD) des nébuliseurs commerciaux et les prototypes F0 et F7.

Prototype	AMAD	MMAD
F0	230 nm	310 nm
F7	440 nm	630 nm
Swirler	690 nm	760 nm
Atomisor NL11	2.8 µm	3.45 µm

L'analyse globale des résultats met en évidence l'efficacité du prototype F0 en générant des nanoparticules liquides marquées $^{99m}\text{Tc-DTPA}$. Ainsi, ce nébuliseur peut être considéré comme un générateur de nano-vecteurs liquides et par conséquent, un potentiel dispositif pour performer des études de cartographie de dépôt de nanoparticules aérosolisées.

2.3. Conclusions

- I. Excepté le prototype F3, tous les prototypes de nébuliseur développés produisent des aérosols dont le MMAD est significativement plus faible comparé au nébuliseur micrométrique conventionnel (Atomisor NL11®).
- II. Les prototypes F7 et F4 possèdent une granulométrie similaire à celle du nébuliseur actuellement commercialisé comme « alvéolaire-spécifique », le Swirler®
- III. Les prototypes F1, F5 et F6 présentent un MMAD d'environ 280 nm, soit deux fois inférieure à celui obtenu par le Swirler. Néanmoins le débit produit pour ces prototypes correspond à seulement 20% du débit produit par le nébuliseur commercial.
- IV. Tous les prototypes peuvent être classés dans trois familles de MMAD distinctes : une première, d'environ 280 nm (F1, F5, F6 et F0) ; une deuxième, de MMAD moyen de 430 nm (F2, F10 et F11) et une troisième, d'environ 720 nm (F4, F7, F7', F8, F9).
- V. Les prototypes F7 présente la plus importante fraction aérosolisée, suivi par le F9 et le F4.
- VI. Le phénomène de génération de nanoparticules le plus important est observé pour le prototype F7, montrant une génération supérieure à celle observée pour le Swirler®.
- VII. Les prototypes F0 et F7 semblent être les nébuliseurs le plus intéressants pour performer des essais de cartographie de dépôt : le F0 par son petit MMAD accompagné d'une acceptable fraction aérosolisée et le F7 par sa génération supérieure de nanoparticules couplée à une excellente fraction aérosolisée.

VIII. Indépendamment des MMADs des prototypes F0 et F7, le paramètre de choix pour le nébuliseur en vue de l'étude de la cartographie du dépôt est le AMAD. En effet le radiomarquage des particules est essentiel pour l'identification du dépôt. Ainsi, les résultats indiquent que le F0 est le dispositif le plus adéquat pour performer la nébulisation des nano-vecteurs radioactifs, présentant un AMAD de 230 nm.

3. CARTOGRAPHIE DE DEPOT DE NANO-AEROSOL

3.1. Résumé Introductif

La détermination de leur site de dépôt des nanoparticules inhalées est un des principaux paramètres permettant d'évaluer l'efficacité du ciblage (comme des agents thérapeutiques), les mécanismes de clairance pulmonaire impliqués, ainsi que leurs potentiels effets néfastes pour la santé.

La majorité des études *in vivo* sur le dépôt des nanoparticules inhalées portent sur la mesure granulométrique des particules inhalées versus les particules exhalées. Par conséquent, le dépôt est calculé par rapport à la différence inhalation/exhalation. Toutefois, ce type d'étude ne permet pas d'aboutir à une cartographie spécifique du dépôt. Ainsi, la détermination de la régionalisation du dépôt des particules inhalées est normalement obtenue à l'aide des logiciels comme le LUDEP, conçu par l'ICRP (International Commission on Radiological Protection).

Une véritable cartographie de dépôt avec la spécification du dépôt de particules inhalées peut être atteinte à travers des techniques d'imagerie en Médecine Nucléaire. Pour cela, il nécessite l'utilisation de particules radiomarquées avec détection à l'aide d'une gamma-camera. Il faut aussi considérer que la plupart des particules inhalées proviennent d'une source aérosol : soit un aérosol naturellement présent dans l'environnement, comme la pollution atmosphérique, soit un aérosol directement administré au patient, comme dans l'aérosolthérapie. De ce fait, l'utilisation de particules aérosolisées se montre comme une méthode intéressante pour la cartographie de dépôt. Plus particulièrement, l'utilisation des aérosols nanométriques dans une telle étude peut permettre d'améliorer la compréhension de l'avenir des nanoparticules dans les voies aériennes ainsi que la différenciation du dépôt selon la taille des particules.

Bien que plusieurs études *in vivo* de toxicologie et de détermination du dépôt des nanoparticules inhalées aient été réalisées chez l'homme, les études de dépôt chez l'enfant restent très rares. En outre, des essais chez l'humain restent toujours comme l'option ultime, dû aux sérieux questionnements éthiques. Ainsi, les études *in vivo* de cartographie de dépôt effectués dans cette thèse ont été réalisées chez le modèle primate non-humain (*Papio papio*), qui possèdent une

anatomie respiratoire très proche de l'humain, plus précisément des paramètres respiratoires de l'enfant.

Après considération de tous les points précédemment évoqués, une méthode optimisée pour la cartographie de dépôt des particules inhalées a été mise en place. Pour cela, trois générateurs d'aérosol ont été choisis afin de fabriquer des nébulisations de particules radiomarquées de différentes tailles : (I) un aérosol nanométrique, grâce au développement d'un nébuliseur nano-spécifique (Cf Résultats et Discussion 2.2) ; (II) un aérosol standard, contenant des particules micrométriques ; (III) un aérosol de taille intermédiaire. Ces aérosols radiomarqués ont été administrés chez les babouins et la cartographie du dépôt a été déterminée grâce à l'imagerie scintigraphique. Les détails des manipulations ainsi que les résultats et discussions finales sont présentes en détail dans l'article ci-après, soumis à la revue *Aerosol Science and Technology*.

3.2. Article soumis en Aerosol Science and Technology

PARTICLES DEPOSITION IN A CHILD RESPIRATORY MODEL: IN VIVO REGIONAL DEPOSITION OF FINE AND ULTRAFINE AEROSOL IN BABOONS

Iolanda Albuquerque-Silva^{a,b,c}, Laurent Vecellio^{d,e}, Marc Durand^{a,c,f}, John Avet^{a,c,g,h,i}, Déborah Le Penne^e, Michèle de Monte^d, Jérôme Montharu^d, Patrice Diot^{d,j}, Michèle Cottier^{1 a,c,g,h,i}, Francis Dubois^{a,c,g,h,l} and Jérémie Pourchez^{a,b,c}

^aLINA, EA 4624, F-42023, Saint-Etienne, France

^bEcole Nationale Supérieure des Mines, CIS-EMSE, LINA EA 4624, F-42023 Saint-Etienne, France

^cSFR IFRESIS, F-42023, Saint-Etienne, France

^dEA6305, CEPR, Faculté de médecine, Université François Rabelais F-37032 Tours, France

^eDTF-Aerodrug, Faculté de médecine, F-37032 Tours, France.

^fCentre Hospitalier Emile Roux, F-43012, Le Puy en Velay, France

^gUniversité Jean Monnet, Faculté de Médecine, F-42023, Saint-Etienne, France

^hCHU de Saint-Etienne, F-42055, Saint-Etienne, France

ⁱUniversité de Lyon, F-42023, Saint-Etienne, France

^jService de Pneumologie, CHRU de Tours, F-37044 Tours, France.

Running Head: Particles deposition in a child respiratory model

Address correspondence to Jérémie Pourchez, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Centre Ingénierie et Santé, 158 Cours Fauriel 42023, France. Telephone: + 33 4 77 42 01 80; Fax: +33 4 77 49 96 94; E-mail: pourchez@emse.fr

ABSTRACT

To relate exposure to adverse health effects, the knowledge of where particles in the submicron range deposit in the respiratory tract is necessary. The possibly higher vulnerability of children requires designing specific inhalation studies. However radio-aerosol deposition experiments in children are rare because of ethical restrictions related to radiation exposure. Thus, an *in vivo* study was conducted using 3 baboons, *i.e.* a child respiratory model, in order to assess regional deposition patterns (thoracic [TH] region vs. extrathoracic region [ET]) of radioactive polydisperse aerosols (230 nm, 550 nm, 2.8 μm). Results clearly demonstrated that aerosol deposition within the TH and ET regions varied substantially according to particle size. A high deposition in the ET region was observed for the 2.8 μm activity median aerodynamic diameter (AMAD) aerosol ($72 \pm 17\%$). The 230 nm AMAD aerosol was associated almost exclusively with TH deposition ($84 \pm 4\%$). Airborne particles of 550 nm AMAD showed an intermediate deposition pattern with $49 \pm 8\%$ in the ET region and $51 \pm 8\%$ in the TH region. Lastly, comparison of baboon and human inhalation experiments for the 2.8 μm AMAD aerosol showed similar regional deposition, leading to the conclusion that regional deposition is species independent for this airborne particle size.

KEYWORDS

airborne particles, deposition pattern, respiratory tract, child, baboon, scintigraphy

INTRODUCTION

The likelihood of the presence of primary nano-objects in the air seems to be low. Indeed, there are indications that the lifetime of primary nano-sized aerosols will be limited by coagulation processes, so larger airborne aggregates or agglomerates will be formed (Brouwer 2010). Some authors proposed that the major coagulation process was the attachment of the nanoparticles to larger-sized background particles, although a second mechanism was the mutual coagulation or agglomeration of the nano-sized aerosols, (Seipenbusch *et al.* 2008; Kasper *et al.* 2008). Exposure to nano-sized aerosol might be mimicked by aerosol generation with bimodal-size distributions around 200–600 nm and 2000–3000 nm. This might implicate for exposure assessment to airborne nanoparticles that the aerosol submicron-size fractions might be of greater importance as the nano-size range.

To relate exposure to adverse health effects, it is crucial to assess the deposition pattern of inhaled particles in the respiratory tract. The identification of deposition sites is a major determinant of particle biopersistence, clearance from the respiratory tract, the dose pattern to tissues, and the resultant biological effects. Indeed spaces like the extrathoracic airways show mucociliary fast clearance with residence time in the range of hours up to one day. Thus the deposition of submicron-sized nanoparticle agglomerates in this region may have less toxicological impact compared to alveolar deposition with long clearance times in the range of days and month for badly soluble particles. However, a high alveolar deposition enables a possible systemic translocation of primary nanoparticles since these submicron-sized structures will de-agglomerate in body fluids after uptake.

As a result, it would be relevant for risk assessment to know what size of submicron-sized nanoparticles agglomerates in the 200-600 nm range are preferentially deposited in the pulmonary alveolar spaces. The region of the respiratory tract affected by particle deposition largely depends on particle properties (e.g., micrometer-sized vs. submicron-sized particles) but also on anatomic and physiologic properties (e.g., adult vs. child respiratory model) (Geiser *et al.* 2010; Schuepp *et al.* 2005). Despite behavioral and physiological differences between adults and children, investigations of the regional pattern deposition of inhaled particles within the respiratory tract have mainly focused on adults, with children typically addressed by extrapolation or by application of an uncertainty factor. However there may be significant variation of host-specific particle deposition factors with age (Ginsberg *et al.* 2007; Golshahi *et al.* 2011). Thus children may receive a greater internal dose of submicron nanoparticle agglomerates than adults due to different airway architecture and greater ventilation rate per body weight or lung surface area. Moreover, metabolic differences may result in different tissue burdens. This can lead to child–adult differences in submicron-sized nanoparticle agglomerate doses, elimination, and toxicity.

This possibly higher vulnerability of children requires designing specific inhalation studies. In this context, baboons are generally considered to be the best animal model for extrapolating aerosol deposition in human airways (Kelly *et al.* 2005; Martonen *et al.* 2001; Patra *et al.* 1986a and 1986b). The main objective of this article was to assess doses of inhaled submicron-sized aerosol in baboons (i.e., an animal model of the human child respiratory tract). Therefore, an *in vivo* study was conducted using 3 baboons in order to assess regional deposition patterns (thoracic [TH] region vs. extrathoracic region [ET]) of radioactive polydisperse aerosols at 230

nm, 550 nm, and 2.8 μm , which are quite well-representative of nanoparticles agglomerates observed in the case of airborne nanoparticle exposure.

METHODS

Aerosol Generation and Characterization

Commercial jet medical nebulizers were used to generate micrometric and submicrometric aerosols: an Atomisor NL11 (DTF Medical, France), a modified Sidestream (Philips Respironics, Ref 12NEB400, England), and a Nanoneb (DTF Medical, France). Nebulizers were loaded with 2 mL of diethylene-triamine penta-acetic acid (DTPA) solution (Pentacis®, CIS Bio International, France) containing 74 MBq technetium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$). Aerosols were generated by using an air tank (Air Liquide, France) with an 8 L/min flow rate. Particle size distributions of the analyzed radioactive aerosols were determined using gamma-camera detection (Ecam, Siemens) coupled to a specific Electrical Low Pressure Impactor (ELPI, Dekati, Finland). The ELPI was specifically devoted to airborne nanoparticles. Within this device, operated at an air flow rate of 10 L/min, particles are impacted depending on their inertia-related aerodynamic diameter in 1 of the 12 size fraction stages of the impactor ranging from 10 μm to 7 nm. Prior to each measurement, the 12 ELPI impaction stages were cleaned. The corona charger was turned off during experiments to avoid the artifact effect of particles charging and electrical detection. Consequently, the particle distribution was characterized using the ELPI with the particles not being electrically charged. During aerosol measurements each nebulizer was directly connected with the ELPI impactor system. The aerosol produced was then collected and sampled since the aerosolized particles are impacted at different stages according to their inertia related to their aerodynamic diameter. At the end of nebulization defined as 1 min after the beginning of the

sputtering, the radioactivity from aerosol particles deposited in each size-specific stage was quantified by scintigraphy imaging. Thus, the ELPI device allowed direct measurement of the activity by median aerodynamic size, but at the same time, it also permitted quantifying the total amount of radioactivity delivered by the nebulizer in order to calculate the aerosol output (sum of the activity at the 12 stages and the throat model). In short, the aerosol output, the particle size distribution, the activity median aerodynamic diameter (AMAD with geometric standard deviation [GSD]), the fine particle fraction (FPs, including all particles with an aerodynamic diameter $<2.5 \mu\text{m}$), and the ultrafine particle fraction (UFPs, including all particles with an aerodynamic diameter $<0.1 \mu\text{m}$) were calculated from radioactivity deposited at each ELPI stage. Cascade impactors are notorious for having particle size changes occur within them when measuring nebulized aerosols. The aerosol consists of droplets which can be evaporate and thereby change their size. As a result, we previously verify that the particle size characterization is in good accordance with manufacturers data of the various devices which are mostly based on Anderson impactor measurements.

Animals and housing conditions

In vivo experiments were done with three healthy baboons (*Papio anubis*) weighing 10 to 14 kg. Animals were obtained from an official supplier (Station de primatologie de Rousset, Marseille, France). Animal accommodations are in accordance with the last European legislation (Directive 2010/63/UE). Baboons were housed as a social group in 3 stainless-steel mesh cages (2x2x2m) which are maintained in relation by open doors. Temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and relative humidity (in the range 30-70% RH) of the room were measured, controlled and recorded daily. An artificial lighting cycle of 12 hours (from 8:00 to 20:00) was maintained. Each day, the animals were offered expanded commercial primate diet (808000 – SDS, St Gratien, France). They were

also supplemented with fresh fruits. Main drinking water was available *ad libitum* from automatic dispensers.

In vivo experimental design and image acquisition

The experimental protocol was conducted according to NIH guidelines for the care and use of laboratory animals, and under the approval of an ethics local board which is recorded by the French national committee of ethical reflexion on animal experiments. Baboons were placed on a special chair under anesthesia induced via intramuscular injection of xylazine (1 mg/kg) and ketamine (5 mg/kg). The animals were sedated but they were kept awake while aerosol was administered through a tight-fitting face mask (Ref 93815028, Temsega, France), specifically designed for baboons. Each baboon inhaled an aerosol twice for each of the three different types of nebulizer selected for this study, resulting in six inhalations per nebulizer. The order of the nebulizers tested was randomized for each baboon. The nebulizer charge was controlled by counting the radioactivity in the syringe using a gamma counter (Capintec®, France) before and after charging. The nebulizer was then connected to the face mask and to an expiratory filter to avoid air contamination. It was operated until 1 min after the aerosol began to sputter. Immediately after aerosol delivery, the animals and the circuit components were scanned using a gamma camera (Ecam, Siemens). A 120-s posterior static view was acquired on a 128×128 matrix. The amount of ^{99m}Tc -DTPA deposited in the lungs was determined from the digitized images. This *in vivo* study was conducted under the approval of the Ethics Board from the Medicine University of Tours in France (file number 2010/20).

Table 1. Breathing parameters of the three studied baboons (mean \pm standard deviation).

Breathing rate (breaths/min)	35 ± 7
Tidal volume (mL)	54 ± 9
Inspiratory to expiratory time (I:E)	0.41 ± 0.09:0.59 ± 0.09
Inspired air (L/min)	1.8 ± 0.15
Weight (kg)	12.3 ± 1.2

Image Analysis

The strategy to assess regional deposited dose in the extrathoracic and the thoracic region is a first step to discriminate the respiratory tract into different regions. The scintigraphic images of aerosol deposition in baboons were post-treated with a 9-point convolution mask filter in order to reduce background noise without loss of image information. The regions of interest (ROIs) were determined manually, delimiting two main regions: the thoracic (TH) and the extrathoracic (ET) (36). Background noise was subtracted to measured counts of radioactivity within ROIs. All images presented a good count-rate performance, giving the data a relative accuracy of 3%. Furthermore, corrections for physical decay of ^{99m}Tc were made on all measurements. Tissue attenuation coefficients were also taken into account. Lung tissue attenuation correction factors were determined from lung perfusion imaging of each baboon using pertechnetate-macroaggregated albumin. Stomach tissue attenuation correction factors were determined from administration of 5 mL of ^{99m}Tc -DTPA via a catheter directly into the stomach of each baboon. Head tissue attenuation correction factors were determined by placing a tube containing 5 mL of ^{99m}Tc -DTPA in the mouth of each baboon. All images were recorded from the anterior view of the baboon.

Statistical analysis

Statistics were performed using Graphpad® Prism Software version 5. A Bonferroni's multiple comparison test was used to compare the data generated ($p < 0.05$ was considered statistically significant).

RESULTS

Particle Size Distribution

Particle size distributions of the three polydisperse aerosols are shown in Figure 1 and summarized in Table 2. AMAD of 2.8 μm (GSD of 3.2), 550 nm (GSD of 2.1), and 230 nm (GSD of 1.6) were obtained respectively. Almost all particles produced by the 230 nm AMAD aerosol (98.6%) and the 550 nm AMAD aerosol (98.3%) were smaller than 2.5 μm , which corresponded to the FPs that are likely to be deposited in the lungs (Löndahl *et al.* 2007; Schuepp *et al.* 2005). In contrast, less than a half of the 2.8 μm AMAD aerosol (47%) were considered FPs. All things considered, the 230 nm AMAD aerosol produced the larger amount of UFPs $<0.1 \mu\text{m}$ (7.3%), almost four times higher than the 550 nm AMAD aerosol and 20 times higher than the 2.8 μm AMAD aerosol (Table 2). Furthermore, raw current charges of airborne particles were also analyzed. Although all studied aerosols were exclusively composed of positively charged particles, the 2.8 μm AMAD aerosol presented higher raw current values.

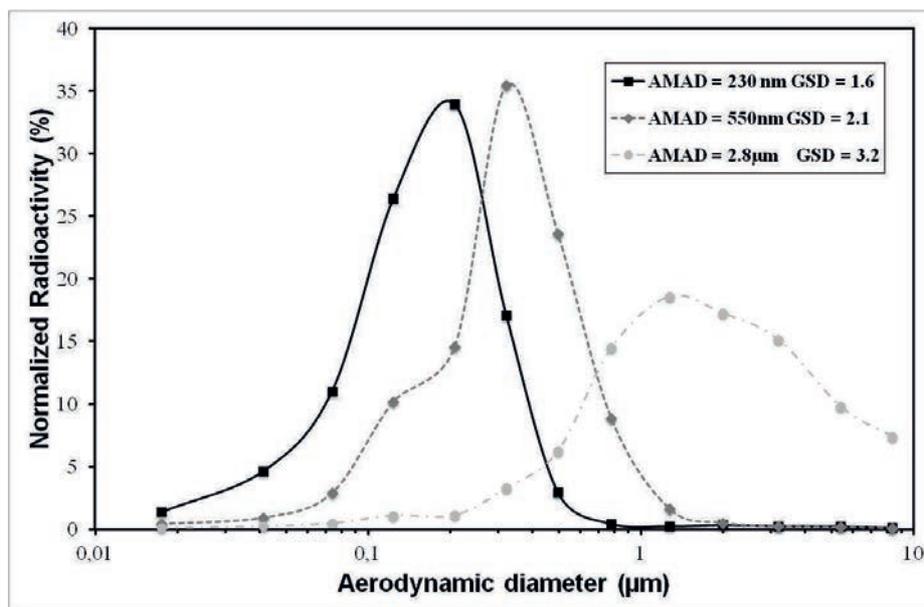


Figure 1. Activity size distributions of the studied aerosols measured using gamma-camera detection coupled to the ELPI cascade impactor.

Table 2. Features of the aerosols inhaled by the baboons to assess the impact of particle size on the *in vivo* regional distribution.

AMAD	GSD	Particles <2.5 µm (FPs)	Particles <1 µm	Particles <0.5 µm	Particles <0.1 µm (UFPs)
2.80 µm	3.2	47.0 ± 4.3%	13.6 ± 1.6%	4.7 ± 0.6%	0.4 ± 0.05%
550 nm	2.1	98.6 ± 0.2%	89.2 ± 2%	47.9 ± 4.4%	1.7 ± 0.2%
230 nm	1.6	98.3 ± 0.4%	97.5 ± 0.5%	86.6 ± 1.8 %	7.3 ± 1.2 %

In vivo regional deposition: ET/TH deposition balance

In the submicron-size range studied, results demonstrated that the total lung deposition decreases as particle sizes increase (Figure 2). A huge deposition in the ET region was found for

the 2.8 μm AMAD aerosol ($72 \pm 17\%$ of the total aerosol fraction deposited), whereas the 230 nm AMAD aerosol showed the smallest ET deposition (only $16 \pm 4\%$ of the total aerosol fraction deposited). As a result, aerosols with smaller AMAD (i.e., 230 nm) were associated almost exclusively with thoracic deposition ($84 \pm 4\%$ of the total aerosol fraction deposited). Finally, airborne particles with an AMAD of 550 nm showed intermediate behavior, with $49 \pm 8\%$ of the total aerosol deposition in the ET region and $51 \pm 8\%$ in the TH region. Statistical analysis, summarized in Table 3, confirmed that particle size is the main factor influencing aerosol deposition in the ET and TH regions. Indeed, results exhibited three different patterns of aerosol deposition (i.e., three different ET to TH deposition balance) for the particle sizes studied (i.e., 2.8 μm , 550 nm, and 230 nm).

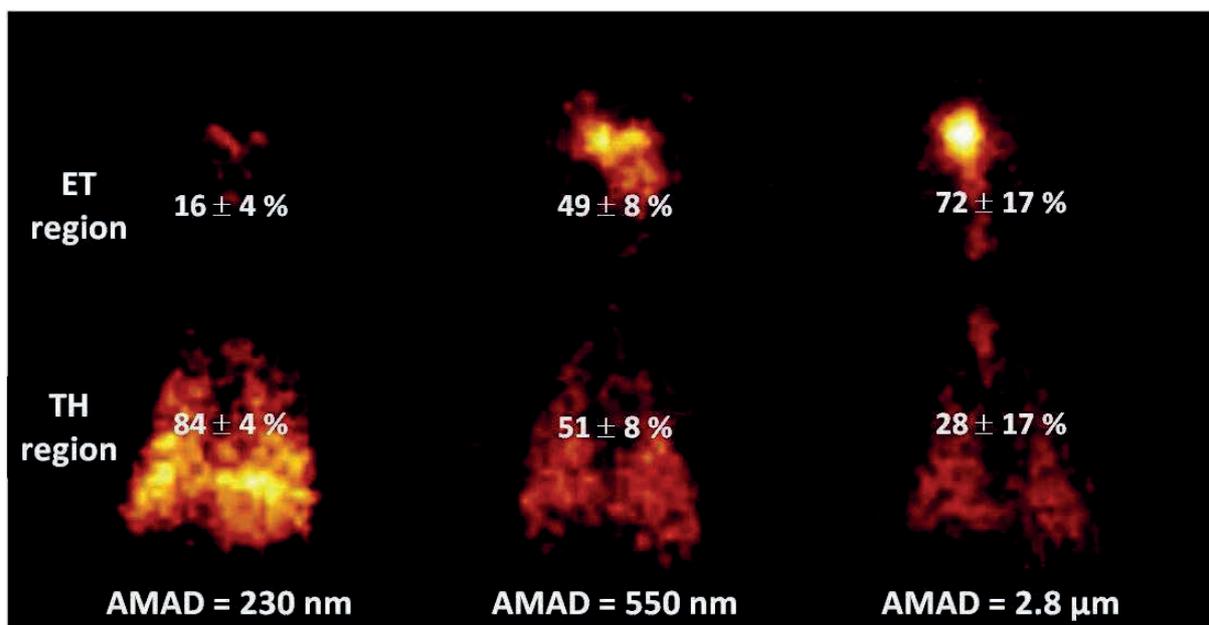


Figure 2. *in vivo* inhalation experiments using baboons: representative scintigraphic images obtained for the three studied aerosol sizes (2.80 μm , 550 nm, and 230 nm). All images are from the same baboon.

Table 3. Statistical analysis: impact of the particle size on the experimental ET and TH regional deposition (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Bonferroni's multiple comparison test)

	2.80 μm versus 550nm	2.80 μm versus 230nm	550 nm versus 230nm
ET deposition	***	***	***
TH deposition	***	***	***

In Vivo Regional Distribution: Dosimetry Regarding Aerosol Exposure

Although the ET/TH deposition balance led to interesting data, it was also very useful to determine the amount of particles deposited as a function of the total aerosol output (i.e., the amount of particles delivered by the nebulizer in the atmosphere during the aerosol exposure). In this context, the nebulizer could be viewed as an air pollution source, and the set-up used for inhalation experiments with baboons as an inhalation chamber. For the 2.8 μm aerosol, we observed a fivefold higher output fraction ($44.5 \pm 1.5\%$ vs. $9.3 \pm 3\%$) compared with the 550 nm aerosol and a 10-fold higher output fraction compared with the 230 nm aerosol ($44.5 \pm 1.5\%$ vs. $4.2 \pm 1\%$). Thus, results for the deposited fractions can be expressed in terms of the percentage of the total aerosol output delivered by each nebulizer during the inhalation experiment (Figure 3). Results show a great impact of the particle size on the relative deposition efficiency. In fact, a higher total deposition fraction was obtained for the 550 nm aerosol, with 1.6-fold and 1.35-fold higher total deposition fraction than the 230 nm and 2.8 μm aerosols, respectively

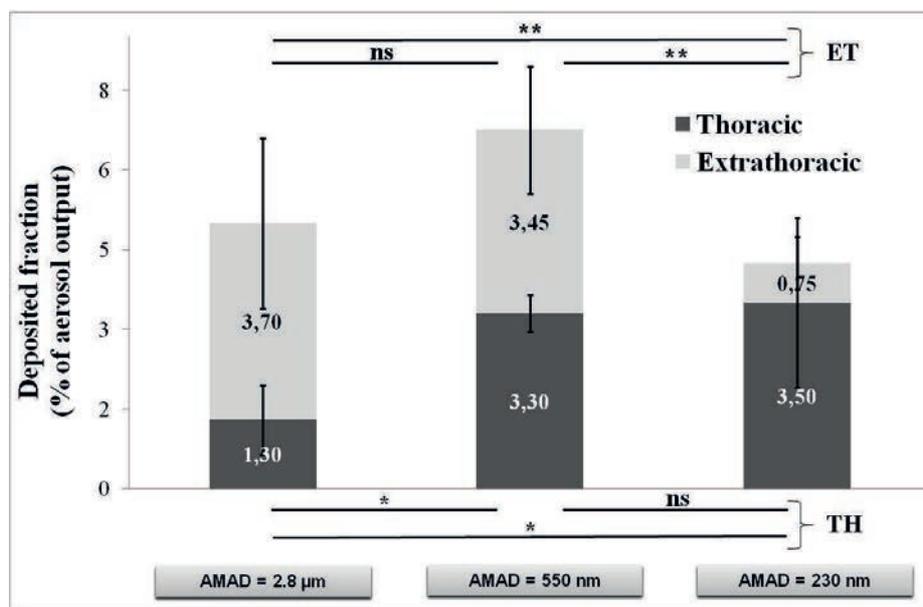


Figure 3. *In vivo* results of aerosol deposition within the ET and TH regions in terms of the output fraction deposited (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Bonferroni's multiple comparison test).

The same behavior for the ET/TH balance deposition was again observed. We demonstrated that the fraction deposited in the ET region was statistically constant for 2.8 μm or 550 nm AMAD aerosols ($3.7 \pm 1.6\%$ and $3.5 \pm 1.2\%$, respectively), while it significantly decreased for the 230 nm AMAD aerosol ($0.75 \pm 0.5\%$). As a result, the higher regional deposition fraction in the ET region was observed for the 2.8 μm and 550 nm aerosols, with fivefold higher deposition than the 230 nm aerosol. Moreover, the fraction deposited in the TH region was relatively low for the 2.8 μm particles ($1.3 \pm 0.65\%$), while it significantly rose for the 550 nm and 230 nm aerosols ($3.3 \pm 0.35\%$ and $3.5 \pm 1.6\%$, respectively). Therefore, the higher regional deposition fraction in the TH region was observed for the 230 nm and 550 nm aerosols with a 2.5-fold higher deposition than the 2.8 μm aerosol.

DISCUSSION

Impact of Airborne Particle Size on the ET/TH Deposition Balance in Terms of the Total Aerosol Fraction Deposited

Patterns of regional deposition of particles within airways remain a key experimental issue for successfully predicting where pathological changes may occur or to estimate the possibility of translocation through the air-blood barrier. Although regional deposition data in humans were developed as a function of particle size as early as the 1960s, most experimental aerosol deposition experiments in humans and laboratory animals have focused on the total deposited fraction (Daigle *et al.* 2003; Kuehl *et al.* 2012; Newman *et al.* 2011; Löndahl *et al.* 2007, 2008, 2009). Total deposition can be measured by comparing particle concentrations in the inhaled and exhaled air, but regional involvement cannot be distinguished. Additionally, studies are generally devoted to the deposition pattern within adult respiratory models and focus on micrometer particle size range. *In vivo* studies on the regional deposition of submicron-sized particles in the respiratory tract are still scarce, and aerosol deposition studies in infants and children are even more rare, with only four experimental studies related to children being found in the literature (Asgharian *et al.* 2006). However, deposition is generally assessed by using inhalation of radiolabelled aerosols and gamma scintigraphy imaging, and this radiation exposure places ethical restrictions on performing such studies in children.

In this context, one of the main results obtained is to demonstrate that regional aerosol deposition in a child-respiratory model varies substantially according to the polydisperse aerosol features in the submicrometer particle size range (Figure 2). We showed that the smallest AMAD aerosol (i.e., 230 nm) led to targeted deposition in the TH region. The high proportion of small

particles contained in the 230 nm airborne particles ($86.6 \pm 1.8\%$ of particles $<0.5 \mu\text{m}$; Table 2) may mostly explain the targeted thoracic deposition and the low intersubject variability observed for the 230 nm aerosol (Figure 2). The fraction of particles $<0.5 \mu\text{m}$ appeared to be correlated with aerosol deposition in the TH region. The 230 nm aerosol showed a 1.8-fold higher amount of particles $<0.5 \mu\text{m}$ compared with the 530 nm aerosol ($86.6 \pm 1.8\%$ vs. $47.9 \pm 4.4\%$, Table 2) and a 1.8-fold higher deposition in the TH region ($84 \pm 4\%$ vs. $51 \pm 8\%$, Figure 2). Nevertheless this correlation was nonlinear and not easily extrapolated to the $2.8 \mu\text{m}$ aerosol (only $4.7 \pm 0.6\%$ of particles $<0.5 \mu\text{m}$ but significant deposition in the TH deposition at $28 \pm 17\%$). Additionally, particle deposition in the upper airways was mostly observed for particles with a median diameter of $2.8 \mu\text{m}$ ($72 \pm 17\%$). We can explain the enhanced ET deposition for the $2.8 \mu\text{m}$ aerosol due to the high amount of particles $>5 \mu\text{m}$ (Figure 1), which induced inertial impaction phenomenon during the passage through the trachea and the oropharynx. This experimental evidence was also supported by an *in vivo* study on pattern aerosol deposition (Laube 1996).

Nevertheless, the airborne particles delivered by nebulizers could present a high *size polydispersity*, and thus the different mechanism of deposition (impaction, sedimentation, diffusion) could occur simultaneously for a polydisperse aerosol. As an example, even if the AMAD of the atomizer nebulizer is $2.8 \mu\text{m}$, a significant amount of FPs and UFPs are also present (Figure 1, Table 2). Indeed, the $2.8 \mu\text{m}$ AMAD aerosol has a GSD of 3.2, which is very broad, and has many large particles that show high ET deposition. However, since most environmental liquid droplets are in this size range, this is the most relevant particle size; however, it would be interesting to perform inhalation experiments with airborne particles within a narrower range of sizes (*i.e.*, a low GSD).

Impact of Airborne Particle Size on the Deposition Pattern in Terms of Output Fraction Deposited in the ET and TH Regions

The level of injury produced by inhaled toxicants depends upon the dose received by the lungs and internal organs. Consequently, we also quantified the particle doses reaching the ET and TH regions with regard to the baboons' inhalation exposure. In this sense, we calculated the output fraction deposited in the ET and TH regions, knowing the dose deposited in each region of the respiratory tract and the aerosol output delivered by each nebulizer. We showed that the inhalation exposure to 550 nm or 230 nm radioactive aerosol led to the same output fraction deposited in the TH region. However, the inhalation exposure to 2.8 μm or 550 nm radioactive aerosol led to the same output fraction deposited in the ET region (Figure 3).

Baboon–Human Comparison of In Vivo Experimental Pattern Deposition for the 2.8 μm Airborne Particles

Much information concerning inhalation toxicology has been collected from laboratory animals as human surrogates in aerosol inhalation studies. The comparative regional deposition in these laboratory animals can be considered helpful for interpreting, from a dosimetric viewpoint, the possible implications of animal toxicological results for humans. The *in vivo* experiments were conducted with baboons, considered a representative child respiratory model. Some studies have indicated that baboons are the most predictive primate species for extrapolating aerosol deposition in humans (Lerondel *et al.* 2001). Indeed total inhaled aerosol deposition probability versus particle-size is qualitatively similar for various mammals of similar body mass, despite airway anatomy differences, even if more species variation can be seen in regional particle deposition curves (Phalen *et al.* 2008). But as anatomy and physiology of the respiratory system can significantly differ between species (specifically between baboons and children), several parameters must be taken into account to evaluate the usefulness of the baboon as an animal

model of aerosol delivery in children. For example, it is necessary to compare the morphometry of baboon airways with the respiratory tract geometry of children. These correlations are critical for subsequent extrapolation of aerosol deposition findings in baboons to children. However, limited information is available on the geometry of children's lungs, with the exception of the large database proposed for developing realistic age-dependent models of the human lung from infancy to young adulthood (Ménache *et al.* 2008). A morphometric comparison of the nasopharyngeal airway of a 3-year-old child and a 10-year-old baboon suggests a functional interspecific relationship between the nasal structure, cross-sectional area, and tracheobronchial region (Patra *et al.* 1986a and 1986b). Finally, the breathing parameters (such as the tidal volume) measured in the three studied baboons (Table 1) accorded well with those of a 1- to 2-year-old child (Rusconi *et al.* 1994). All things considered, the baboon appears to be a quite satisfactory *in vivo* respiratory model for a 2-year-old child.

Generally, the amount of aerosol particles that reach the pulmonary region in children is lower than in adults (Schuepp *et al.* 2005). Thanks to a previous healthy volunteer scintigraphy study using the atomizer NL11 nebulizer, a baboon–adult comparison of *in vivo* experimental pattern deposition for the 2.8 μm airborne particles can be proposed (Durand *et al.* 2012; Vecellio *et al.* 2011). A similar inhalation protocol was used to study the human and baboon deposition patterns (such as exposure route, delivery technique employed, and definitions of specific respiratory tract regions). The human study included seven healthy men aged 21 to 36 years with a mean height of 181 ± 3 cm and a mean weight of 77 ± 10 kg, inhaling only by the nose (37).

The human study showed $73 \pm 10\%$ of aerosol deposited in airways was in the ET region and $27 \pm 10\%$ was in the TH region. Thus, we observed excellent correlation for the *in vivo*

regional distribution in terms of total aerosol fraction deposited in human and baboon airways (ET region: $73 \pm 10\%$ in humans vs. $72 \pm 17\%$ in baboons; TH region: $27 \pm 10\%$ in humans vs. $28 \pm 17\%$ in baboons). This result led to the conclusion that differences in airway architecture or ventilation rate between adult and child respiratory models did not have a significant impact on the regional distribution of a $2.8 \mu\text{m}$ aerosol in terms of total aerosol fraction deposited in the airways for inhalation by the nasal route. This result is in good accordance with the comparing deposition across different age groups obtained in infants in adults (Golshahi *et al.* 2011).

Nevertheless, the interspecies differences had a strong impact on the output fraction deposited in the ET and TH regions. Based on the healthy volunteer scintigraphy study, if we calculate the output fraction deposited (knowing the aerosol output for the NL11 nebulizer and the deposition fraction expressed as a percentage of the nebulizer charge), we find an output fraction of $25.2 \pm 7\%$ deposited in the ET region and an output fraction of $8.3 \pm 3.8\%$ deposited in the TH region. Comparing these results to the baboon data (Figure 3), we observed a sixfold higher value of output fraction deposited in both the ET and TH regions in humans (ET region: $25.2 \pm 7\%$ in humans vs. $3.7 \pm 1.6\%$ in baboons; TH region: $8.3 \pm 3.8\%$ in humans vs. $1.3 \pm 0.65\%$ in baboons). We support the conclusion that this significant interspecies difference in terms of output fraction deposited is due to differences in breathing parameters (Brain *et al.* 2003; McMahon *et al.* 1977). We measured the volume of inspired air at $1.8 \pm 0.15 \text{ L/min}$ in baboons (Table 1). Since it is commonly accepted that the *volume of air* that can be *inspired* is around 9 L/min in human (ICRP 1994), we find that the volume of inspired air is fivefold higher in humans than in baboons (i.e., 9 L vs. 1.8 L). Consequently, this result led us to think that the sixfold higher output fraction deposited in both ET and TH regions in humans compared to baboons was mainly due to differences in inspired air volume. Thus, our results confirm that for

some sizes of airborne particles, regional deposition in humans and baboons are quite similar and appear to be species independent. However, even if these different species are exposed to identical particles at an identical concentration, they will not receive the same particle mass per unit exposure time because of their differences in tidal volume and breathing rate.

CONCLUSION

Dose and persistence evaluation of inhaled aerosol particles is needed in children and there are even lacks of data for the adult respiratory tract, in specific for the submicron particle range. Knowledge of the regional distribution of inhaled submicron-sized particles in the respiratory tract can help predict the sites of pathological changes due to airborne nanoparticles agglomerates exposure. Therefore this study may add new data on this issue using the baboon animal model as a valuable strategy to assess such data.

The size-dependent regionalization of fine and ultrafine aerosol deposition *in vivo* within the baboon respiratory model gives an innovative aspect to this work, mostly because previous studies generally focused on determining globally or regionally deposited aerosol fractions in adult respiratory models. Results clearly demonstrated that aerosol deposition within the TH and ET regions varied substantially according to particle size. A high deposition in the ET region was observed for the 2.8 μm aerosol ($72 \pm 17\%$), whereas the 230 nm aerosol was almost exclusively associated with TH deposition ($84 \pm 4\%$). Airborne particles of 550 nm showed an intermediate deposition pattern with $49 \pm 8\%$ of deposition in the ET region and $51 \pm 8\%$ of deposition in the TH region.

We established that a diminution of the intersubject variability and a targeted deposition in the thoracic region can be achieved by reducing the median activity diameter (AMAD) of airborne particles and by enhancing the amount of particles $<0.5 \mu\text{m}$. For toxicology issues, these results indicate the capacity of 200-300 nm airborne particles to preferentially access the lower airways, which may possibly be associated with a systemic translocation through the air-blood barrier of primary nanoparticles since these submicron-sized structures should be de-agglomerated in body fluids. These data were not only be of value for risk assessment but also for inhalation therapy strategy evaluation and dosing.

1. ETHIC APPROVAL

This study was approved by the ethics local board of Tours University (file number 2010/20) which is recorded by the French national committee of ethical reflexion on animal experiments (CNREEA, under N° CEEAVdL-19).

GRANTS

The authors would like to acknowledge the financial support of the Regional French Association for Aid to Chronic Respiratory Failure Patients (ARAIR – Association Régionale d’Aide aux Insuffisants Respiratoires de la région centre), Saint-Etienne Métropole and the Conseil Général de la Loire.

2. CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

L. Vecellio is an employee of Diffusion Technique Française (DTF Medical, Saint Etienne, France).

REFERENCES

Asgharian, B., Hofmann, W., and Hiller, F.C. (2006). Dosimetry of particles in humans, from children to adults, In *Toxicology of the Lung 4th ed.* Gardner, D. Ed. CRC-Press, Taylor and Francis, London, UK.

Brain, J.D., and Mensah, G.A. (1983). Comparative toxicology of the respiratory tract. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128:S87–S90.

Brouwer, D. (2010). Exposure to manufactured nanoparticles in different workplaces. *Toxicology.* 269:120-127.

Daigle, C.C., Chalupa, D.C., Gibb, F.R., Morrow, P.E., Oberdörster, G., Utell, M.J. and Frampton, M.W. (2003). Ultrafine particle deposition in humans during rest and exercise. *Inhal. Toxicol.* 15:539–552.

Durand, M., Le Guellec, S., Pourchez, J. et al. (2012). Sonic aerosol therapy to target maxillary sinuses. *Eur. Ann. Oto-Rhino-Laryngol. Head Neck Dis.* In press.

Geiser, M., and Kreyling, W.G. (2010). Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* 7:1–17.

Ginsberg, G.L., Asgharian, B., Kimbell, J.S., Ultman, J.S. and Jarabek, A.M. (2007). Modeling approaches for estimating the dosimetry of inhaled toxicants in children. *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*, 71:3,166–195.

Golshahi, L., Noga, M.L., Thompson, R.B. and Finlay, W.H. (2011). In vitro deposition measurement of inhaled micrometer-sized particles in extrathoracic airways of children and adolescents during nose breathing. *J. Aerosol Sci.* 42:474–488.

ICRP. (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. ICRP publication 66. International Commission on Radiological Protection. Elsevier Science, Oxford.

Kasper, G., (2008). The life cycle of airborne nano-particles and its implications for personal protection device. In: Presented at NANOSAFE2009, Grenoble, November 2008.

Kelly, J.T., Asgharian, B., and Wong, B.A. (2005). Inertial particle deposition in a monkey nasal mold compared with that in human nasal replicas. *Inhal Toxicol.* 17:823–830.

Kuehl, P.J., Anderson, T.L., Candelaria, G., Gershman, B. et al. (2012). Regional particle size dependent deposition of inhaled aerosols in rats and mice. *Inhal. Toxicol.* 24:27–35.

Laube, B.L. (1996). In vivo measurements of aerosol dose and distribution: clinical relevance. *J. Aerosol Med.* 9:77–91.

Lerondel, S., Le Pape, A., Sene, C., Faure, L., Bernard, S., Diot, P., Nicolis, E., Mehtali, M., Lusky, M., Cabrini, G. and Pavirini, A. (2001). Radioisotopic imaging allows optimization of adenovirus lung deposition for cystic fibrosis gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 12:1–11.

Löndahl, J., Massling, A., Pagels, J., Swietlicki, E., Vaclavik, E. and Loft, S. (2007). Size-resolved respiratory-tract deposition of fine and ultrafine hydrophobic and hygroscopic aerosol particles during rest and exercise. *Inhal. Toxicol.* 19:109–116.

Löndahl, J., Pagels, J., Boman, C., Swietlicki, E., Massling, A., Rissler, J., Blomberg, A., Bohgard, M., and Sandström, T. (2008). Deposition of biomass combustion aerosol particles in the human respiratory tract., *Inhal. Toxicol.* 20:923–933.

Löndahl, J., Pagels, J., Swietlicki, E., Zhou, J., Ketzler, M., Massling, A., and Bohgard, M. (2006). A set-up for field studies of respiratory tract deposition of fine and ultrafine particles in humans. *Aerosol Sci.* 37:1152–1163.

Martonen, T.B., Katz, I.M. and Musante, C.J. (2001). A nonhuman primate aerosol deposition model for toxicological and pharmaceutical studies. *Inhal. Toxicol.* 13:307–324.

McMahon, T.A., Brain, J.D., and Lemott, S. (1977). Species differences in aerosol deposition, in *Inhaled Particles IV: Proceedings of an International Symposium, Part 1*; September 1975; Edinburgh, United Kingdom, W. H. Walton and B. McGovern, eds, Pergamon Press, Oxford, 23–33.

Ménache, M.G., Hofmann, W., Ashgarian, B., and Miller, F.J. (2008). Airway geometry models of children's lungs for the use in dosimetry modeling, *Inhal. Toxicol.* 20:101–126.

Newman, S., and Fleming, J. (2011). Challenges in assessing regional distribution of inhaled drug in the human lungs. *Expert Opin. Drug Deliv.* 8:841–855.

Patra, A.L. (1986a). Comparative anatomy of mammalian respiratory tracts: the nasopharyngeal region and the tracheobronchial region., *J. Toxicol. Environ. Health.* 17:163–174.

Patra, A.L., Gooya, A. and Ménache, M.G. (1986b). A morphometric comparison of the nasopharyngeal airway of laboratory animals and humans. *Anat. Rec.* 215:42–50.

Phalen, R.F., Oldham, M.J., Wolff, R.K. (2008). The relevance of animal models for aerosol studies. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 21:113-24.

Rusconi, F. et al. (1994). Reference values for respiratory rate in the first 3 years of life. *Pediatrics* 94:350–355.

Schuepp, K.G., Jauernig, J., Janssens, H.M., Tiddens, H.A.W.M., Straub, D.A., Stangl, R., Keller, M. and Wildhaber, J.H. (2005). In vitro determination of the optimal particle size for nebulized aerosol delivery to infants. *J. Aerosol Med.* 18:225–235.

Seipenbusch, M., Binder, A., Kasper, G., (2008). Temporal evaluation of nanoparticle

aerosols in workplace exposure. *Ann. Occup. Hyg.* 52, 707–716,

Vecellio, L., De Gersem, R., Le Guellec, S. et al. (2011). Deposition of aerosols delivered by nasal route with jet and mesh nebulizers. *Int. J. Pharmaceutics.* 407:87–94.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Activity size distributions of the studied aerosols measured using gamma-camera detection coupled to the ELPI cascade impactor.

FIG. 2. *in vivo* inhalation experiments using baboons: representative scintigraphic images obtained for the three studied aerosol sizes (2.80 μm , 550 nm, and 230 nm). All images are from the same baboon.

FIG. 3. *In vivo* results of aerosol deposition within the ET and TH regions in terms of the output fraction deposited ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ by Bonferroni's multiple comparison test).

IV. CONCLUSIONS

Les résultats obtenus dans cette étude ont démontré qu'il est possible de générer efficacement des aérosols submicroniques et nanométriques soit solides soit liquides. En effet, des aérosols contenant une plus grande quantité de nanoparticules peuvent permettre une meilleure diffusion de l'aérosol dans les voies respiratoires, et par conséquent, contribuer à l'avancement pour l'administration de médicaments par aérosolthérapies ainsi que pour des études toxicologiques. Des aérosols submicroniques solides ont été obtenus grâce à un procédé optimisé en utilisant le dispositif commercial *Technegas Generator*. A son tour, des aérosols submicroniques liquides ont été produits à travers des nébuliseurs pneumatiques de design novateur, spécialement conçus en partenariat avec la société DTF Medical (Saint-Etienne). Enfin, la cartographie du dépôt des aérosols submicroniques a été déterminée *in vivo* chez le modèle primate non-humain.

L'étude de la génération d'aérosols nanométriques solides dans le *Technegas Generator* a montré que tant les distributions en tailles des particules que la radioactivité totale des aérosols produits ont été principalement influencé par leur température de synthèse. La méthode de génération de nano-aérosol proposée consiste dans l'utilisation de deux étapes de synthèses (*burn*) consécutives : à 1900 ° C et 2800 ° C. Dans ces conditions optimisées, le diamètre médian de *Technegas* peut être réduit par moitié (250 nm), grâce à une augmentation de la population de nanoparticules radiomarquées dans l'aérosol

L'étude de la génération d'aérosols nanométriques liquides par nébulisation a résulté du développement de 12 prototypes de nébuliseurs pneumatiques. Majoritairement, les prototypes développés ont produit des aérosols avec un MMAD significativement plus faible comparativement au nébuliseur micrométrique conventionnel (Atomisor NL11®). En outre, les résultats granulométriques ont montré que ces prototypes peuvent être classés en trois familles de MMAD distinctes : une première, d'environ 280 nm (F1, F5, F6 et F0) ; une deuxième, de MMAD moyen de 430 nm (F2, F10 et F11) et une troisième, d'environ 720 nm (F4, F7, F7', F8, F9). Ensuite, des essais radioactifs, en utilisant le marqueur ^{99m}Tc-DTPA comme solution de remplissage des nébuliseurs, ont été mis en œuvre afin de déterminer le prototype le plus adéquat pour les études de la cartographie de dépôt, car la radiomarquage des particules est un paramètre

essentiel à l'identification du dépôt. Parmi l'ensemble de prototypes évalués, le F0 est celui qui apparaît le plus approprié pour performer la nébulisation de nano-vecteurs radioactifs, présentant un AMAD de 230 nm.

Finalement, les études de cartographie de dépôt ont clairement démontré que le dépôt des aérosols dans les régions thoracique (TH) et extrathoracique (ET) varie considérablement en fonction de la taille des particules. Un dépôt élevé dans la région ET a été observée pour l'aérosol produit par le nébuliseur classique (Atomisor NL11®), d'un AMAD de 2,8 μm ($72 \pm 17\%$). Contrairement, l'aérosol produit par le prototype F0, d'un AMAD de 230 nm, a été presque exclusivement associée à un dépôt TH ($84 \pm 4\%$). A son tour, des aérosols contenant des particules en suspension de taille intermédiaire (AMAD de 550 nm) produits par le nébuliseur Sidestream® a également montré un dépôt intermédiaire avec $49 \pm 8\%$ des dépôts dans la région ET et $51 \pm 8\%$ des dépôts dans la région TH.

Les études de cartographie de dépôt ont également établi qu'un dépôt ciblé dans la région thoracique et une diminution de la variabilité interindividuelle peut être obtenue en réduisant le diamètre moyen en activité (AMAD) des particules en suspension et en augmentant la quantité de particules inférieures à 0,5 μm . En ce qui concerne les questions toxicologiques, ces résultats indiquent la capacité des particules de taille submicronique à accéder préférentiellement aux voies respiratoires inférieures, ce qui peut éventuellement être associé à un potentiel risque toxicologique ainsi que à une translocation systémique.

Finalement, ce travail démontre l'intérêt de la génération d'aérosols nanométriques à visée pulmonaire afin de contribuer à l'implémentation de techniques d'aérosolthérapie ainsi que pour des fins toxicologiques. La cartographie de dépôt de ces aérosols chez l'homme reste encore à être définie. Dans l'avenir, l'utilisation d'autres techniques d'administration d'aérosols, comme la croissance par condensation, peuvent être considérées afin d'assurer le dépôt de la totalité des nanoparticules dans les voies aériennes.

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ali R., Jain G.K., Iqbal Z., Talegaonkar S., Pandit P., Sule S., Malhotra G., Khar R.K., Bhatnagar A., Ahmad F.J. Development and clinical trial of nano-atropine sulfate dry powder inhaler as a novel organophosphorous poisoning antidote, *Nanomedicine* 5, 55–63, 2009.

Amorij JP, Hinrichs WLJ, Frijlink HW, Wilschut JC, Huckriede A. Needle-free influenza vaccination. *The Lancet Infectious Diseases*,10 (10) 699-711, 2010.

Anjilvel S, Asgharian B. A multiple-path model of particle deposition in the rat lung. *Fundam. Appl. Toxicol.* 28, 41-50, 1995.

Azarmi S, Roa WH, Löbenberg R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60 (8) 863-875, 2008.

Borgstrom L, Olsson B, Thorsson L. Degree of throat deposition can explain the variability in lung deposition of inhaled drugs. *Journal of Aerosol Medicine*, 19, 473–483, 2006.

Borm, P.J., Kreyling, W. Toxicological hazards of inhaled nanoparticles—potential implications for drug delivery. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4, 521–531, 2004.

Bricard, J., 1977. Physique des aérosols. Rapport R-4831. Commissaria à l'Energie Atomique.

Burch WM, Sullivan PJ, McLaren C. Technegas – a new ventilation agent for lung scanning. *Nucl Med Comm.*7:865-871, 1986.

Byron PR. Drug delivery devices: Issues in drug development. Proceedings of the American Thoracic Society, 1 pp. 321–328, 2004.

Card J. Pulmonary applications and toxicity of engineered nanoparticles. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295: L400–L411, 2008.

Carvalho, T.C.; Peters, J.I.; Williams III, R.O. Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there?, International Journal of Pharmaceutics, 406 (1–2)pp 1-10, 2011.

Chantrel, G. (2006). Aerosol transfer device for medical aerosol generators or medical aerosol generator . Brevet. US Patent Application No: 2006/0137.685

Cheng, H-S.; Cheng, Y-S.; Yeh, H-C.; Guilmette, R.A.; Simpson,S.Q.; Yang,Y-S.; Swift, D. L. In vivo measurements of nasal airway dimensions and ultrafine aerosol deposition in the human nasal and oral airways, Journal of Aerosol Science, 27 (5) pp 785-801, 1996.

Cheng YS, Fu CS, Yazzie D, Zhou Y. Respiratory deposition patterns of salbutamol pMDI with CFC and HFA-134a formulations in a human airway replica. Journal of Aerosol Medicine, 14 (2) pp. 255–266, 2001.

Dailey L.A., Kleemann E., Wittmar M., Gessler T., Schmehl T., Roberts C., Seeger W., Kissel T. Surfactant-free, biodegradable nanoparticles for aerosol therapy based on the branched polyesters. DEAPA-PVAL-g-PLGA, Pharm. Res. 20 (12) 2011–2020, 2003.

Dalby RN, Tiano SL, Hickey AJ. Chapitre 14 Medical Devices for the Delivery of Therapeutic Aerosols to the Lungs, dans Inhalation Aerosols - Physical and Biological Basis for Therapy. Edité par Hickey AJ. 1996.

Dautzenberg B, Becquemin MH, Chaumuzeau JP, Diot P. Good practice for aerosol therapy by nebulisation. *Rev Mal Respir*; 24:751-757, 2007.

Davis SN. The role of inhaled insulin in the treatment of type 2 diabetes *Journal of Diabetes and its Complications*, Volume 22, Issue 6, Pages 420-429, 2008.

Dekati (2008). ELPI™ User Manual. Copyright ©.

Dessanges J.F. *Petit guide de la nébulisation*. Éditions Alinéa Boehringer, 1993.

Dick EJ. Beyond 'lognormal versus gamma': discrimination among error distributions for generalized linear models. *Fish Res*. 70:351-366, 2004.

Dunbar CA, Hickey, AJ. Evaluation of probability density functions to approximate particle size distributions of representative pharmaceutical aerosols. *J. Aerosol Sci*. 31(7) 813-831, 2000.

Durand M, Pourchez J, Aubert G, Le Guellec S, Navarro L, Forest V, Rusch P, Cottier M. Impact of acoustic airflow nebulization on intrasinus drug deposition of a human plastinated nasal cast: New insights into the mechanisms involved. *International Journal of Pharmaceutics* 421, 63–71, 2011.

Durand M, Pourchez J, Louis B, Pouget JF, Isabey D, Coste A, Prades JM, Rusch P, Cottier M. Plastinated nasal model: a new concept of anatomically realistic cast - *Rhinology* 49(1)30-36, (2011b).

Durand, M. *Elaboration, caractérisation et utilisation de modèles anatomiques plastinés pour l'étude du dépôt d'aérosols soniques dans les sinus maxillaires*. (2008). Thèse doctorale.

El-Gendy N, Gorman EM, Munson EJ, Berkland C. Budesonide nanoparticle agglomerates as dry powder aerosols with rapid dissolution. *J Pharm Sci.* 98:2731–2746, 2009.

Ely L, Roa W, Finlay WH, Löbenberg R. Effervescent dry powder for respiratory drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (3) 346–353, (2007).

Faurisson F.. La physique des aérosols est un jeu d'enfant, dans Dautzenberg B. L'aérosolthérapie par nébulisation en pneumologie. (1996) Editions Margaux Orange.

Gay N, Cabrera M, Diot P, Dubus J.-C., Sauvaget E., Montharu J., Rosseau G. Méthodologies et générations d'aérosol innovants appliqués à la vectorisation pulmonaire en pédiatrie. IRBM, Article in Press, 2012.

Gill S, Lobenberg R, Ku T, Azarmi S, Roa W, Prenner EJ. Nanoparticles: characteristics, mechanisms of action, and toxicity in pulmonary drug delivery — a review, *J. Biomed. Nanotechnol.* 3 107–119, 2007.

Golshahi L, Noga ML, Thompson RB, Finlay WH. In vitro deposition measurement of inhaled micrometer-sized particles in extrathoracic airways of children and adolescents during nose breathing. *Journal of Aerosol Science*, 42, 474–488, 2011.

Gonda, I. Systemic delivery of drugs to humans via inhalation, *J. Aerosol Med.* 19 (2006) 47–53.

Grenha A, Seijo B, Remuñán-López C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 25 (4–5) 427–437, 2005.

Hervé-Bazin B. Les nanoparticules: Un enjeu majeur pour la santé au travail ? ISBN 978-2-86883-995-4. (2007) EDP Sciences, Paris, France.

Hickey AJ, Evans RM.. Chapitre 13 Aerosol generation from propellant-driven metered dose inhalers, dans *Inhalation Aerosols - Physical and Biological Basis for Therapy*. (1996) Edité par Hickey AJ.

Hinds WC.. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. (1999) John Wiley and Sons, New York.

ICRP (International Commission on Radiological Protection, Task Group of Committee 2). 1994. *Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection*, Publication 66. Pergamon Press, New York, NY.

Jaques PA, Kim CS. Measurement of total lung deposition of inhaled ultrafine particles in healthy men and women *Inhalation Toxicology*, 12 (8) 715–731, 2000.

Jögi J, Jonson B, Ekberg M, Bajac M. Ventilation-Perfusion SPECT with ^{99m}Tc -DTPA versus Technegas: A head-to-head study in obstructive and nonobstructive disease. *J Nucl Med*. 51:735-741, 2010.

Kawashima Y, Serigano T, Hino T, Yamamoto H, Takeuchi H. A new powder design method to improve inhalation efficiency of pranlukast hydrate dry powder aerosols by surface modification with hydroxypropylmethylcellulose phthalate nanospheres, *Pharm. Res.* 15 (11) 1748–1752, (1998).

Keller M, Jauernig J, Lintz FC, Knoch M. Nebulizer nanosuspensions: important device and formulation interactions, *Respiratory Drug Delivery*, 197–206, 2002.

Kelly, J. T., Asgharian, B., and Wong, B. A. Inertial particle deposition in a monkey nasal mold compared with that in human nasal replicas. *Inhal Toxicol*. 17:823–830, 2005.

Kim CS, Jaques PA. Analysis of Total Respiratory Deposition of Inhaled Ultrafine Particles in Adult Subjects at Various Breathing Patterns, *Aerosol Science and Technology*, 38:6, 525-540, (2004).

Kotian R, Peart J, Bryner J, Byron PR. Calibration of the Modified Electrical Low-Pressure Impactor (ELPI) for Use with Pressurized Pharmaceutical. *Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery*, 22 (1), 55-65, 2009.

Leach CL, Davidson PJ, Bouhuys A. Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone. *European Respiratory Journal*, 12, pp. 1346–1353, 1998.

Lloyd JJ, Shields RA, Taylor CJ, Lawson RS, James JM, Testra HJ. Technegas and Pertechnegas particle size distribution. *Eur J Nucl Med*. 22:437-476, 1995.

Longest PW, McLeskey Jr JT, Hindle M. Characterization of Nanoaerosol Size Change During Enhanced Condensational Growth, *Aerosol Science and Technology*, 44:6, 473-483, 2010.

Longest, P. W.; Hindle, M. CFD simulations of enhanced condensational growth (ECG) applied to respiratory drug delivery with comparisons to in vitro data, *Journal of Aerosol Science*, 41 (8), 805-820, 2010.

Longest PW, Spence BM, Holbrook LT, Mossi KM, Son YJ, Hindle M. Production of inhalable submicrometer aerosols from conventional mesh nebulizers for improved respiratory drug delivery, *Journal of Aerosol Science*, 51, 66-80, 2012.

Luangkhot N., Jauernig J., Balcke A., Lintz F.-C., Liening-Ewert R., Stangl R., Keller M.. Characterisation of salbutamol solution compared to budesonide suspensions consisting of

submicron and micrometer particles in the PARI LC STAR® and a new PARI electronic nebuliser (e-flow), *Drug Delivery to the Lungs* 12, 14–17, 2000.

Magnant J., Vecellio, L., De Monte, M., Grimbert, D., Valat, C., Boissinot, E., Guilloteau, D., Lemarié, E., Diot, P. Comparative Analysis of Different Scintigraphic Approaches to Assess Pulmonary Ventilation. *Journal of Aerosol Medicine*, Vol 19:2, 2006.

Majoral, C. Métrologie des aérosols dans des conditions physiologiques pour la prédiction de leur dépôt dans les voies respiratoires. Thèse de Doctorat de Sciences de la Vie et de la Santé, INSERM 618 - Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Tours, France. 2007.

Mansour HM, Rhee YS, Wu X. Nanomedicine in pulmonary delivery, *Int. J. Nanomedicine* 4 299–319, 2009.

Martonen TB. *Medical Applications of Computer Modeling: Respiratory System*. WIT Press, Southampton, UK., 2001.

Möller, W., Felten, K., Seitz, J., Sommerer, K., Takenaka, S., Wiebert, P., Philipson, K., Svartengren, M., Kreyling, W.G. (2006). A generator for the production of radiolabelled ultrafine carbonaceous particles for deposition and clearance studies in the respiratory tract. *Journal of Aerosol Science*, 37, 631-644.

Martonen TB. Mathematical model for the selective deposition of inhaled pharmaceuticals. *J Pharm Sci.* 82:1191-1199, 1993.

Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311, 622, 2006.

Oberdörster G, Elder A, Rinderknecht A. Nanoparticles and the brain: Cause for concern? *J Nanosci Nanotechnol* 8:4996–5007, 2009.

Oberdörster G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: Concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* 267:89–105, 2010.

Oberdorster, G., Oberdorster, E., and Oberdorster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113:823–839, 2005.

Pandey R., Khuller G.K.. Solid lipid particle-based inhalable sustained drug delivery system against experimental tuberculosis, *Tuberculosis* 85 (4) 227–234, 2005.

Pandey R., Sharma A., Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K., Prasad B. Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticle-based inhalable sustained drug delivery system for experimental tuberculosis, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (6) 981–986, 2003.

Park CW, Yoon KY, Kim YD, Park JH, Hwang J. Effects of condensational growth on culturability of airborne bacteria: Implications for sampling and control of bioaerosols. *Journal of Aerosol Science*, 42, (4) 213-223, 2011.

Patra AL. 1986a. Comparative anatomy of mammalian respiratory tracts: the nasopharyngeal region and the tracheobronchial region., *J. Toxicol. Environ. Health.* 17:163–174.

Patra AL, Gooya A and Ménache M G. 1986b. A morphometric comparison of the nasopharyngeal airway of laboratory animals and humans. *Anat. Rec.* 215:42–50.

Powell, M.C., Kanarek, M.S. Nanomaterial health effects. Part 1. Background and current knowledge. *WMJ* 105, 16–20, 2006a.

Powell, M.C., Kanarek, M.S. Nanomaterial health effects. Part 2. Uncertainties and recommendations for the future. *WMJ* 105, 18–23, 2006b.

Rau JL. The inhalation of drugs: advantages and problems. *Respir care.* 50:367-382, 2005.

Sanvicens NM, Pilar M. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in Biotechnology* 26(8) 425-433, 2008.

Senden TJ, Moock KH, Gerald JF et al. The physical chemical nature of Technegas. *J. Nucl Med.*; 38;8:1327-1333, 1997.

Sham JOH, Zhang Y, Finlay WH, Roa WH, Loebenberg R. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung, *Int. J. Pharm.* 269 (2) 457–467, 2004.

Smith JE, Jordan ML. Mathematical and graphical interpretation of the lognormal law for particle size distribution analysis. *J Colloid Sci.* 19:549-559, 1964.

Tian, G.; Longest, P.W.; Su, G.; Walenga, R.L.; Hindle, M. Development of a stochastic individual path (SIP) model for predicting the tracheobronchial deposition of pharmaceutical aerosols: Effects of transient inhalation and sampling the airways, *Journal of Aerosol Science*, 42 (11), 781-799, 2011.

Vanden Burgt J, Busse WW, Martin RJ, Szefer SJ, Donnell D. Efficacy and safety overview of a new inhaled corticosteroid, QVAR (hydrofluoroalkane beclomethasone extra fine inhalation aerosol) in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 106:1209-1224, 2000.

Vecellio L. Fiche Technique: Systèmes de nébulisation : savoir lire la nouvelle norme. INFO RESPIRATION SPLF N° 60 (2004).

Vecellio None L., Lemarié E., Diot P., Aérosolthérapie. EMC-Médecine 2 56–65, 2005.

Vietze A, Koch F, Laskowskib U, Linder A, Hosten N. Measurement of ventilation- and perfusion-mediated cooling during laser ablation in ex vivo human lung tumors. *European Journal of Radiology* 80, 569–572, 2011.

Wanert F, Vidal S. Maladies, parasites et agents infectieux des Primates non humains. *Sci Tech Anim Lab*, 2006.

Wiedmann T.S., DeCastro L., Wood R.W. Nebulization of NanoCrystals™: production of a respirable solid-in-liquid-in-air colloidal dispersion, *Pharm. Res.* 14 112–116, 1997.

Xi J, Longest PW. Effects of oral airway geometry characteristics on the diffusional deposition of inhaled nanoparticles. *ASME Journal of Biomechanical Engineering*, 130, 2008a.

Xi J, Longest PW. Evaluation of a novel drift flux model for simulating submicrometer aerosol dynamics in human upper tracheobronchial airways. *Annals of Biomedical Engineering*, 36 (10) 1714–1734, 2008b.

Xi J, Longest PW. Transport and deposition of micro-aerosols in realistic and simplified models of the oral airway. *Annals of Biomedical Engineering*, 35 (4) pp. 560–581, 2007.

Xie Q, Yuan H, Song L, Zhang Y. Experimental studies on time-dependent size distributions of smoke particles of standard test fires. *Build Environ.* 42:640-646, 2007.

Yamamoto H., Kuno Y., Sugimoto S., Takeuchi H., Kawashima Y. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions, *J. Control. Release* 102 (2) 373–381, 2005.

Yang W, Johnston KP, Williams III RO. Comparison of bioavailability of amorphous versus crystalline itraconazole nanoparticles via pulmonary administration in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 33–41, 2010.

Zhang Y, Gilbertson K, Finlay WH. In vivo–in vitro comparison of deposition in three mouth–throat models with Qvar and Turbuhaler inhalers. *Journal of Aerosol Medicine*, 20 (3) 227–235 2007.

ANNEXES

ANNEXE 1: METROLOGIE DES AEROSOLS - NORMATIVE EUROPEENNE (NF EN 13544-1)

Le Diamètre Aérodynamique de Masse Moyenne (DAMM) des aérosols nébuliseurs est défini par des normes européennes (NF EN 13544-1) en utilisant un Impacteur Electrique à Basse Pression (ELPI).

Les paramètres de nébulisation ainsi que les procédures utilisées sont décrites ci-dessous :

Paramètres de nébulisation	
Volume de remplissage dans le nébuliseur	4mL de fluorure de sodium (NaF 1%)
Temps de nébulisation	5 minutes
Débit d'air	8L/min

PROCEDURE

1- Calibration de l'impacteur ELPI

Allumer l'ordinateur

Vérifier que la colonne est bien fixée

Allumer l'ELPI (bouton vert à l'arrière de l'appareil)

Sur l'ordinateur, lancer le programme ELPIVI 4.0

→ Démarrer/programmes/ELPIVI 4.0

Cliquer sur START MEASURING

Entrer le nom de la manipulation *nomdemanip.dat*

Dans l'onglet ELPI unit info : - brancher la pompe

- cliquer sur

→ Vérifier que la pression est de 100mbar.

- cliquer sur



→ vérifier que $4,5kV \leq \text{valeur} \leq 5,2kV$

- cliquer sur **FLUSH**

/!\ Fenêtre rouge = disfonctionnement. Il faut nettoyer chaque plateau.

- cliquer sur **ZERO**

→ Refaire le zéro jusqu'à stabilisation ± 10 .

L'appareil est prêt à fonctionner.

2- Calibration de l'ionomètre

Preparer une solution mère de NaF 1.000 mg/L (Pour 500 mL)

→ 0.5g de NaF dans fiole jugé de 500mL et compléter avec l'eau MiliQV

Réaliser des dilutions à partir de la Solution Mère NaF 1000 mg/L

SOLUTIONS (MG/L)	VOL. SOLUTION MERE (ML)	FIOLE JUGE (ML)
1000	100	100
100	10	100
10	1	100
1	0.1 = 100 μL	100
0.1	0.025 = 25 μL	250
0.01	0,01 = 10 μl	1000

/!\ Avant toutes les lectures à l'électrode, il est important d'ajouter 5% en volume de TISAB à la solution destinée à dosage de F-

- 1) Vérifier le bon état de l'électrode (voir annexe Manutention Electrode)
- 2) Etablir le « range » d'étalonnage : la calibration se fait avec le maximum de 5]]s
- 4) Nettoyer à l'eau distillée et sécher avec du papier de verre l'extrémité de l'électrode ;

- 3) Mettre 5ml de chaque solution dans des bechers de 10ml, puis ajouter 250 μ l de TISAB;
- 3) Tremper l'électrode dans la solution étalon la moins concentrée;
- 4) Appuyer sur CAL
- 5) Attendre que la valeur se stabilise ;
- 6) Appuyer sur la touche READ ;
- 7) Rincer la solution à l'eau pure et la sécher;
- 8) Répéter les étapes 3-7 jusqu'à la concentration la plus élevée ;
- 9) Appuyer sur END puis SAVE

L'ionomètre est prêt à fonctionner.

3- Charger le nébuliseur avec 4mL de NaF en solution à 2.5 %.

4- Connecter le nébuliseur à l'impacteur.

5- Connecter l'entrée d'air au nébuliseur.

6- Allumer le débit d'air et sauvegarder les données à l'aide de L'ELPI.

7- Une fois les 5 minutes écoulées, éteindre la pompe d'air puis débrancher la pompe.

8- Démonter l'appareillage afin d'en extraire les plateaux de la colonne.

9- Etablir la quantification du dépôt de fluor sur les plateaux.

Quantification du fluor

- ①- Recueillir le fluorure de Sodium dans le premier plateau en le nettoyant avec 5 mL d'eau distillée (2 x 2,5 mL).
- ②- A l'aide de l'ionomètre calibré, mesurer la concentration de fluor du mélange (eau pure + NaF) recueilli en oubliant pas d'ajouter le stabilisateur TISAB à 5 % du volume (soit 250 μ L).

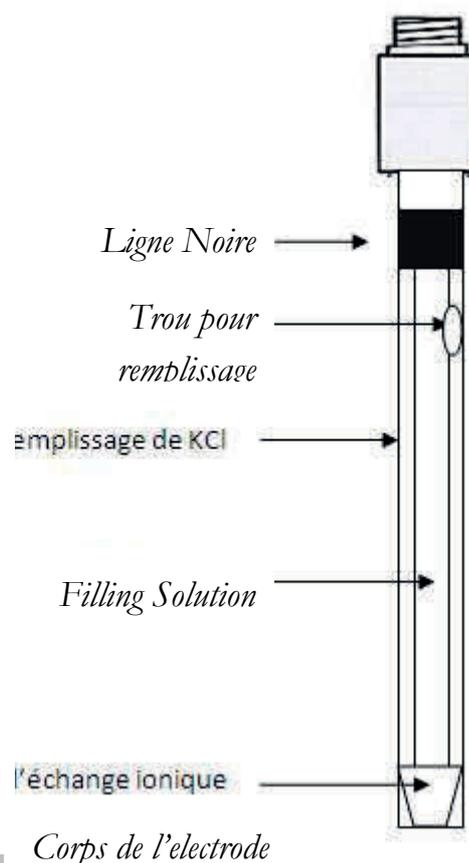


- 3- Refaire la manipulation ① et ② pour chaque plateau.
- 4- Procéder au traitement des données pour calculer le DAMM de l'aérosol nébuliseur (NF EN 13544-1).

ANNEXE 2: MANUTENTION DE L'ELECTRODE DE L'IONOMETRE

Ionometre Meter Toledo – Seven GO

- 1) Bien vérifier s'il y a une ligne noire en haut dans l'électrode
- 2) Dans l'absence de la *ligne Noire*, remplir l'électrode (à l'aide d'une pipette) avec la solution « *Electrolyte A Reference Filling Solution – Metler Toledo* » et en suite tourner l'électrode à l'inverse (jusqu'au complet remplissage/formation) d'une ligne noire
- 3) Procéder avec la calibration de l'ionometre (protocole ci-dessus)
- 4) Au fin de leur utilisation, veiller de bien fermer l'orifice de l'électrode avec du « *Laboratory Film* »



Les électrodes doivent être submergées dans solution de KCL 4 M (30% KCl et 70% H₂O) → cela correspond à une solution KCl

KCL 3 mol/L = 55.91 g de KCl dans 250 mL de l'eau distillé (fiolle jugé)

/!\ Astuce du fabricant : ajouter un peu (30%) de la solution (donc NaF 0.001 mg/L)

Membrane d'échange ionique

MESURES AU IONOMETRE

- 1) Nettoyer l'électrode à l'eau distillée et sécher avec du papier de verre l'extrémité de l'électrode ;

- 2) Tremper l'électrode dans la solution à mesurer (ajouté du TISAB à 5% vol.) et appuyer sur « READ »
- 3) Attendre la stabilisation automatique de l'électrode

ANNEXE 3 : METROLOGIE DES AEROSOLS RADIOACTIFS

Au contraire des aérosols non-radioactifs que sont caractérisés par leur masse (DAMM), les aérosols radioactifs sont caractérisés par leur activité, donc il est cruciale la détermination de leur Diamètre Aérodynamique Moyenne en Activité (DAMA). Le DAMA d'un aérosol peut être déterminé grâce à la quantification de la radioactivité déposé sur les différents étages granulométriques d'un impacteur en cascade. L'impacteur en cascade de référence pour cette manipulation est l'Impacteur Electrique à Basse Pression (ELPI - Dekati).

Les paramètres de nébulisation ainsi que les procédures utilisées sont décrites ci-dessous :

Paramètres de nébulisation	
Volume de remplissage dans le nébuliseur	4 mL dont : 1 mL solution ^{99m} Tc-DTPA 3 mL solution physiologique (NaCl 0,9%)
Temps de nébulisation	5 minutes
Débit d'air	8L/min

PROCEDURE

1- Ajustement de l'ELPI dans sa configuration *Filter*

→ Ajout de l'étage de filtre au dessous de l'impacteur

2- Ajouter des membranes de collection sur chaque plateau de l'ELPI

→ Ajouter 1 membrane (filtres en acétate de cellulose - Whatman®) entre chaque plateau et son anneau supérieur

3- Calibration de l'impacteur ELPI

Allumer l'ordinateur

Vérifier que la colonne est bien fixée

Allumer l'ELPI (bouton vert à l'arrière de l'appareil)

Sur l'ordinateur, lancer le programme ELPIVI 4.0 *Démarrer/programmes/ELPIVI 4.0*

Cliquer sur START MEASURING

Entrer le nom de la manipulation *nomdemanip.dat*

Dans l'onglet ELPI unit info : - brancher la pompe

- cliquer sur

→ Vérifier que la pression est de 100mbar.

- cliquer sur

→ Vérifier que $4,5\text{kV} \leq \text{valeur} \leq 5,2\text{kV}$

- cliquer sur

/!\ Fenêtre rouge = disfonctionnement. Il faut nettoyer chaque plateau.

- cliquer sur

→ Refaire le zéro jusqu'à stabilisation ± 10 .

L'appareil est prêt à fonctionner.

3- Charger le nébuliseur avec la solution radioactive de ^{99m}Tc -DTPA

4- Connecter le nébuliseur à l'impacteur.

5- Connecter l'entrée d'air au nébuliseur.

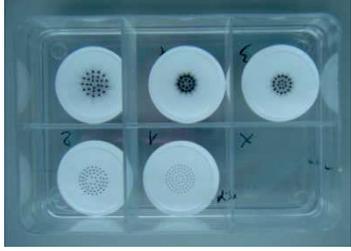
6- Allumer le débit d'air et sauvegarder les données à l'aide de L'ELPI.

7- Une fois les 5 minutes écoulées, éteindre la pompe d'air puis débrancher la pompe.

8- Démonter l'appareillage afin d'en extraire les plateaux de la colonne.

9- Etablir la quantification de l'activité du dépôt de ^{99m}Tc -DTPA sur les plateaux.

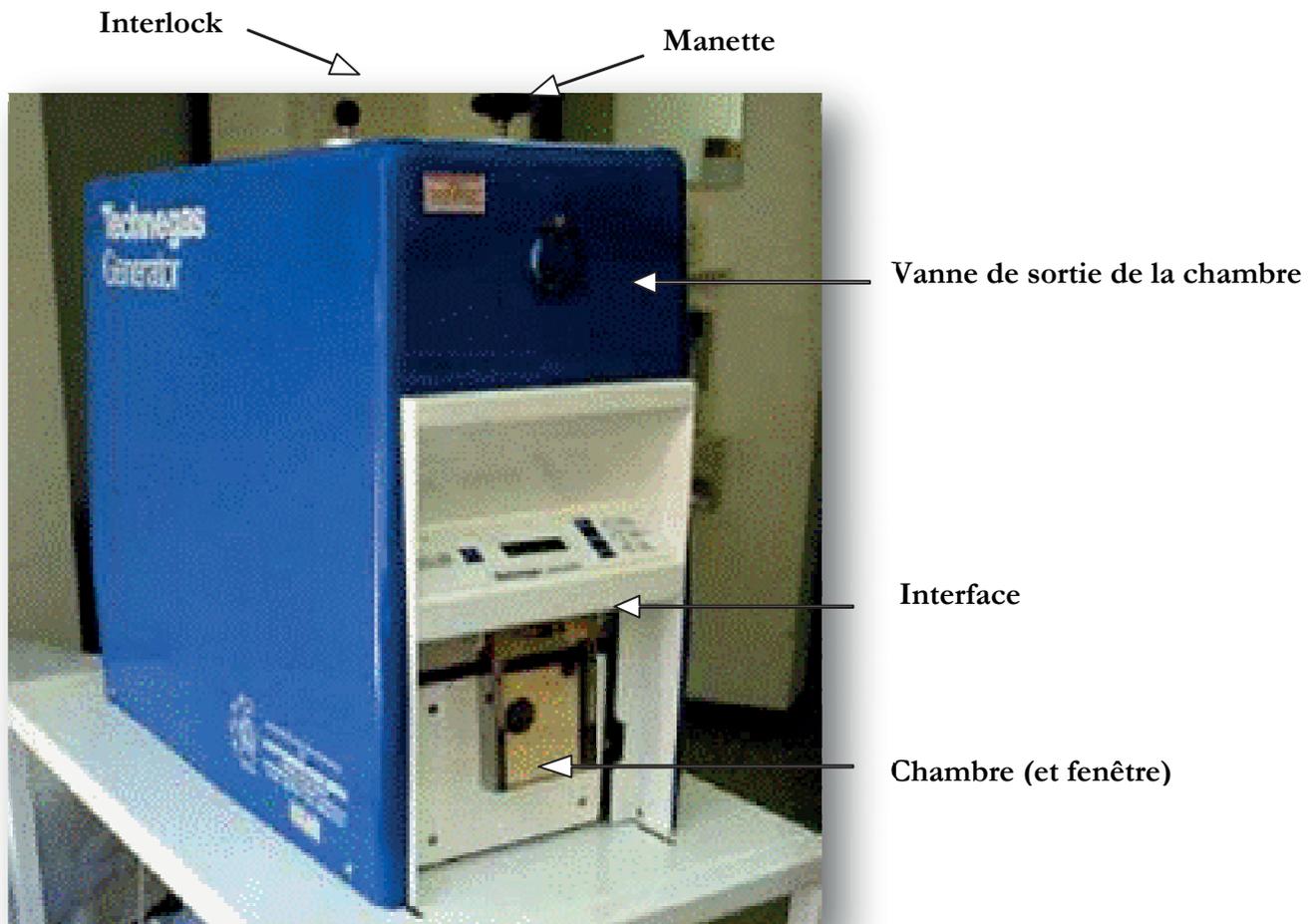
Quantification de la Radioactivité

<p>1 – Recueillir soigneusement les membranes de collection de chaque plateau (pour des raisons de sécurité il est préféré de les ordonnés dans des boites plastiques) →</p>	
<p>2- Placer les membranes sur le gamma-camera, et compter l'activité résultante pendant 2 minutes. L'image scintigraphique obtenue sera proche de celle-ci →</p>	
<p>3- Procéder avec le traitement d'image pour quantifier l'activité déposé sur chaque plateau de l'impacteur (en coups/s). Chaque membrane correspond à 1 ROI (région d'intérêt)</p>	

/!\ La granulométrie des aérosols produits par le *Technegas Generator* est réalisé de cette même façon. La seule différence est que au lieu de connecter un nébuliseur dans ELPI il faut donc connecter un tuyau reliant le *Technegas Generator* au ELPI.

ANNEXE 4 : UTILISATION DU GENERATEUR DE TECHNEGAS MODIFIE – OPERATION DES PARAMETRES DE GENERATION D'AEROSOL

Structure du *Technegas Generator* - Cyclopharma



/!\ Précautions

Changer les électrodes et le filtre Technegas toutes les 50 utilisations.

S'assurer que l'ELPI est calibré.

PROTOCOLE D'UTILISATION EXPERIMENTALE

MODE MAINTENANCE :

- 1) Brancher la bouteille d'argon à l'appareil et ouvrir la vanne.
- 2) Allumer la machine à l'aide du bouton ON/OFF situé à l'arrière de la machine Technegas.

Arrière du générateur Technegas



Photo : cliché personnel

- 3) Si nécessaire, ôter la carcasse de l'appareil et mettre le DIP SWITCH 1 sur la droite pour fixer le mode maintenance (le DIP SWITCH est un boîtier rouge situé sur la plaque électrique).
- 4) Appuyer sur OPEN pour ouvrir la chambre et resserrer les écrous.
- 5) Insérer le creuset mouillé à l'alcool et rempli de TcO_4^- .



- 6) Pivoter légèrement le creuset de droite à gauche pour un bon contact avec les électrodes.
- 7) Appuyer sur CLOSE et sur l'interlock simultanément pour refermer la chambre (Appui long).
- 8) Régler le potentiomètre sur l'unité correspondant à la température voulue.

POTENTIOMETRE

Standard: 9 (2500°C)

Minimum: 0 (1900°C)

Medium: 7 (2200°C)

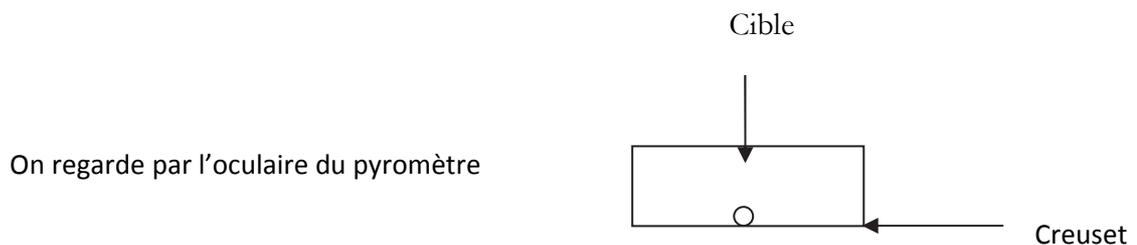
Maximum: 10 (2800°C)

- 9) Appuyer sur START 3 x jusqu'à *Test évaporation*.
- 10) Effectuer ce test en appuyant sur OPEN.
- 11) CLOSE pour arrêter le *test d'évaporation* après la durée voulue (standard : 6 min).
- 12) Appuyer sur START 2 x jusqu'à *Test 2500°C*.
- 13) Effectuer ce test en appuyant sur OPEN pendant le temps désiré (durée de chauffe : standard : 5 s)

- 14) Attendre pendant la durée de stockage voulue (standard : 2min).
- 15) Relier l'orifice de sortie du Technegas à l'orifice d'entrée d'ELPI.
- 16) Appuyer sur la manette pour libérer l'aérosol pendant 2-3 min.
- 17) Pour finir, appuyer sur CANCEL 2 x .

Etalonnage du potentiomètre

- 1) Placer le pyromètre à 42 cm du creuset, soit 30 cm de la fenêtre de la chambre.
- 2) Allumer le pyromètre en appuyant simultanément sur la gâchette et sur POWER.
- 3) En mode maintenance, suivre le protocole jusqu'à arriver sur TEST 2500°C
- 4) Centrer la cible du pyromètre sur le **centre** du creuset



- 5) Fixer l'unité 0 sur le potentiomètre situé sur la carcasse du Technegas.
 - 6) Appuyer sur OPEN pendant 2-3 secondes puis relever la température du creuset.
 - 7) Simultanément, mesurer la tension à l'aide d'un multimètre entre les deux électrodes par l'intermédiaire de la plaque (⚠ Courant alternatif)

➤ Rmq : la plaque est accessible uniquement si on ôte la carcasse.

- 8) Recommencer l'opération 5) 6) 7) pour chaque unité du potentiomètre.

On obtient alors les résultats dans un tableau :

Étalonnage du potentiomètre

Potentiomètre (u.a)	Température (°C)	Tension (V)
0		
1		
2		

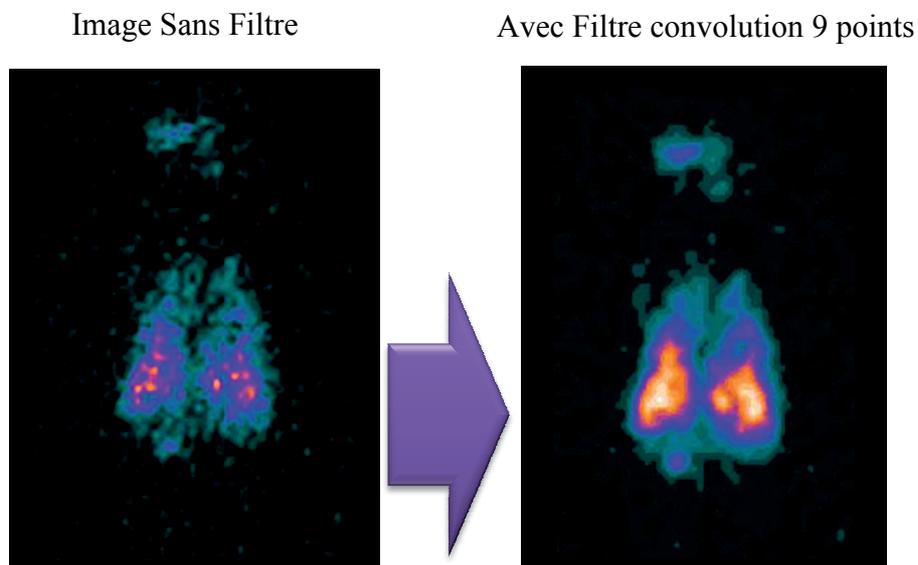
→ *Tracer la courbe d'étalonnage : tension en fonction de température.*

ANNEXE 5 : CARTOGRAPHIE DE DEPOT DES AEROSOLS – METHODES DE TRAITEMENT D'IMAGE

Toutes les images acquises avec les manipulations *in vivo* ont été post-traitées dans le software d'imagerie médicale SIEMENS selon les étapes suivantes :

1) FILTRAGE DES IMAGES

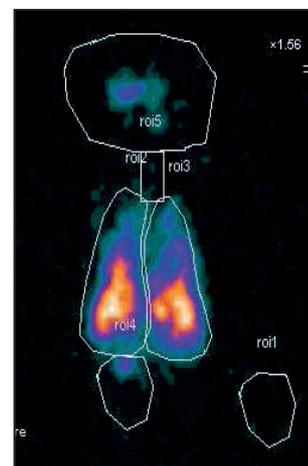
☛ **Filtre Linéaire - Masque de convolution de 9 points** : réduction du bruit de fond sans perte d'informations



2) DETERMINATION MANUELLE DES ROIS

☛ Détermination de 6 ROIs par image divisées en 3 groupes :

- **Région Thoracique (TH)** : poumon droit, poumon gauche, trachée
- **Région Extrathoracique (ET)** : region ORL, estomac
- **Bruit de fond**



Exemple détermination ROIs

3) ATTENUATION

⇒ Détermination expérimentale des coefficients d'atténuation des tissus (μ) :

$$N = N_0 \int_0^d \exp^{-\mu(l)} dl$$

La probabilité d'interaction μ intervient dans la loi qui régit l'atténuation d'un faisceau de N_0 photons incidents sur un matériau d'épaisseur d .

- **μ pulmonaire:** obtenue par imagerie de perfusion (en utilisant des macroagrégats d'albumine marquées au ^{99m}Tc).
- **μ estomac:** administration de 5 ml de ^{99m}Tc -DTPA par cathéter directement dans l'estomac de chaque babouin
- **μ tête:** tube contenant 5 mL de ^{99m}Tc -DTPA dans la bouche de chaque babouin

4) SOUSTRAIT DU BRUIT DE FOND

⇒ Le nombre de coups acquis dans chaque ROI image a été est ensuite corrigé par rapport au bruit de fond de l'image:

$$\text{ROI}_{\text{net}} = \text{ROI}_{\text{total}} - \text{ROI}_{\text{background}}$$

5) DECROISSANCE RADIOACTIVE

⇒ Finalement, le nombre de coups acquis dans chaque ROI image a été est ensuite corrigé par rapport à la décroissance radioactive du ^{99m}Tc :

$$\text{ROI}_{\text{net}} = \text{ROI}_{\text{net}} \times e^{\lambda T}$$

Avec $\lambda = \ln 2 / T$

$T = 6\text{h}$

École Nationale Supérieure des Mines
de Saint-Étienne

NNT : 2013 EMSE 0684

Iolanda M. D. ALBUQUERQUE SILVA

MEDICAL NANOSIZED AEROSOLS: GENERATION,
CHARACTERIZATION AND DEPOSITION

Speciality : Process Engineering

Keywords : nanometric aerosols, aerosol deposition, Technegas, ELPI, baboon model

Abstract :

Medical and socio-economic issues of respiratory diseases have a major importance in world medicine. Among the conventional minimally invasive procedures in the treatment of respiratory diseases, the aerosoltherapy distinguishes itself by its ability to deliver medication directly into the respiratory tract, such as the sinuses or the tracheal-bronchial tree. In this context, the use of nanoparticles to target the lungs is object of great advances in aerosoltherapy as nanometric aerosols have the ability to overcome obstacles in the upper airways and deposit in the deep lung, increasing the therapeutic and diagnostic performance of these aerosols. In order to contribute with the advance of aerosoltherapy treatments this thesis is directed towards the development of new techniques of generation of nanometric and submicronic aerosols, able to target specific regions of the respiratory system of a patient. The major problem within this context is the adjustment of the aerosol's particle size in order to promote a targeted deposition in a patient. Therefore, it is firstly necessary to have a wide range of aerosols sizes, from micronic to nanometric, and then it is needed to determine the relationship between particle size and deposition site in the respiratory tract. As a result, the main objectives of this thesis are the metrological characterization of nanometric aerosols and the evaluation of its performance in terms of its deposition in the respiratory tract. The achieved results have demonstrated that is possible to efficiently generate submicronic and nanometric aerosols, either with solid or liquid particles. Aerosols containing a higher amount of nanoparticles showed a larger deposit in the lungs that may contribute to the advancement of aerosoltherapy techniques as well as for toxicological studies.

École Nationale Supérieure des Mines
de Saint-Étienne

NNT : 2013 EMSE 0684

Iolanda M. D. ALBUQUERQUE SILVA

AEROSOLS NANOMÉTRIQUES MEDICAUX: DÉVELOPPEMENT,
CARACTERISATION ET CARTOGRAPHIE DE DÉPÔT

Spécialité: Génie des Procédés

Mots clefs : aérosols nanométriques, cartographie de dépôt, Technegas, ELPI, modèle primate non-humain

Résumé :

Les enjeux médicaux et le contexte socio-économique des maladies respiratoires ont une importance majeure à l'échelle mondiale. Parmi les procédures mini-invasives classiques de traitement des maladies respiratoires, l'aérosolthérapie se distingue par sa capacité d'administrer des médicaments pour les pathologies locales, directement dans les voies respiratoires, comme les sinus ou l'arbre trachéaux-bronchique. Dans ce contexte, l'utilisation de nanoparticules à visée pulmonaire est objet de grandes avancées en aérosolthérapie car les aérosols nanométriques ont la capacité de contourner les obstacles dans les voies aériennes supérieures et se déposer dans le poumon profond, renforçant ainsi la performance thérapeutique et diagnostique de ces aérosols. Afin de contribuer à l'évolution des traitements par aérosolthérapie cette thèse s'est orientée vers le développement des nouvelles techniques de génération d'aérosols nanométriques et submicroniques, capables de cibler des régions spécifiques de l'appareil respiratoire d'un patient. La problématique majeure à être confrontée dans ce contexte est donc l'adaptation de la taille des particules de l'aérosol afin de promouvoir un dépôt ciblé chez le patient. Pour cela il est d'abord nécessaire d'avoir une large gamme de tailles d'aérosols, de micronique à nanométrique, puis déterminer la relation entre la taille des particules et leur site de dépôt dans les voies respiratoires. De ce fait, les objectifs principaux de cette thèse sont la caractérisation métrologique et l'évaluation des performances des aérosols nanométriques en termes de cartographie de dépôt. Les résultats obtenus ont démontré qu'il est possible de générer efficacement des aérosols submicroniques et nanométriques soit solides soit liquides. Les aérosols contenant une plus grande quantité de nanoparticules ont montré un dépôt plus important dans les poumons, ce qui contribue au développement des techniques d'administration de médicaments par aérosolthérapies ainsi que pour des études toxicologiques.