



HAL
open science

Développement de systèmes d'administration originaux destinés à la prévention de la contamination par le VIH chez la femme

Armelle Adjoua Sandrine Aka

► **To cite this version:**

Armelle Adjoua Sandrine Aka. Développement de systèmes d'administration originaux destinés à la prévention de la contamination par le VIH chez la femme. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI; Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire; 1995-2012), 2012. Français. NNT: 2012PA114819 . tel-01015614

HAL Id: tel-01015614

<https://theses.hal.science/tel-01015614>

Submitted on 26 Jun 2014

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.

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD
UNIVERSITÉ DE COCODY**

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1168

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 14/06/2012

par

Armelle Adjoua Sandrine AKA épouse ANY-GRAH

DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES D'ADMINISTRATION ORIGINAUX DESTINES A LA
PREVENTION DE LA CONTAMINATION PAR LE VIH CHEZ LA FEMME

Directeur de thèse : Gilles PONCHEL Professeur des universités (Université Paris Sud-Châtenay-malabry)
Co-directeurs de thèse : Kla Anglade MALAN Professeur titulaire (UFR SPB-Université de Cocody-Abidjan)
Kawthar BOUCHEMAL Maître de conférences (Université Paris sud- Châtenay-malabry)

Composition du jury :

Florence AGNELY	Professeur des universités (Châtenay-malabry)	Président du jury
Guido VANHAM	Directeur de recherche (ITMA-Anvers-Belgique)	Rapporteur
Christine CHARRUEAU	Maître de conférences (Université Paris Descartes)	Rapporteur
Gilles PONCHEL	Professeur des universités (Châtenay-malabry)	Directeur de thèse
Kla Anglade MALAN	Professeur titulaire (UFR SPB-Université de Cocody-Abidjan)	Co-Directeur de thèse
Kawthar BOUCHEMAL	Maître de conférences (Université Paris-Sud - Châtenay-malabry)	Co-Directeur de thèse
Armand KOFFI	Maître-assistant (UFR SPB-Université de Cocody-Abidjan)	Examineur

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD
UNIVERSITÉ DE COCODY**

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ
PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

DISCIPLINE :

PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

ANNÉE 2011 - 2012

SÉRIE DOCTORAT N° 1168

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 14/06/2012

par

Armelle Adjoua Sandrine AKA épouse ANY-GRAH

DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES D'ADMINISTRATION ORIGINAUX DESTINES A LA
PREVENTION DE LA CONTAMINATION PAR LE VIH CHEZ LA FEMME

Directeur de thèse : Gilles PONCHEL Professeur des universités (Université Paris Sud-Châtenay-malabry)
Co-directeurs de thèse : Kla Anglade MALAN Professeur titulaire (UFR SPB-Université de Cocody-Abidjan)
Kawthar BOUCHEMAL Maître de conférences (Université Paris sud- Châtenay-malabry)

Composition du jury :

Florence AGNELY	Professeur des universités (Châtenay-malabry)	Président du jury
Guido VANHAM	Directeur de recherche (ITMA-Anvers-Belgique)	Rapporteur
Christine CHARRUEAU	Maître de conférences (Université Paris Descartes)	Rapporteur
Gilles PONCHEL	Professeur des universités (Châtenay-malabry)	Directeur de thèse
Kla Anglade MALAN	Professeur titulaire (UFR SPB-Université de Cocody-Abidjan)	Co-Directeur de thèse
Kawthar BOUCHEMAL	Maître de conférences (Université Paris-Sud - Châtenay-malabry)	Co-Directeur de thèse
Armand KOFFI	Maître-assistant (UFR SPB-Université de Cocody-Abidjan)	Examineur

DEDICACE

**« A TOUS CEUX ET TOUTES CELLES QUI VIVENT AVEC LE VIH ET QUI LUTTENT
AU QUOTIDIEN POUR QUE LA FLAMME DE L'ESPOIR NE S'ETEIGNE PAS »**

IN MEMORIAM

2012 EST L'ANNEE DE L'ACCOMPLISSEMENT DE MES TRAVAUX DE THESE.

2012 EST L'ANNEE DE L'ACCOMPLISSEMENT DE VOTRE VIE SI FRUCTUEUSE.

JE DESIRE PAR CE TRAVAIL RENDRE UN HOMMAGE PARTICULIER AU PROFESSEUR

KONE MOUSSA

EX-DOYEN DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE COCODY-ABIDJAN.

VOUS AVEZ ETE CELUI QUI M'A PRISE PAR LE BRAS POUR ME FAIRE ENTRER DANS LA VIE

PROFESSIONNELLE EN ENCADRANT MA THESE D'EXERCICE.

PUIS VOUS M'AVEZ PRISE SUR VOS EPAULES POUR ME FAIRE ENTRER DANS LA FAMILLE DES
ENSEIGNANTS DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE COCODY EN SIGNANT MA PRISE DE SERVICE.

ENFIN VOUS M'AVEZ PROPULSEE VERS L'ACCOMPLISSEMENT DE CETTE THESE EN FACILITANT MES
DEMARCHES ACADEMIQUES MALGRE VOTRE ETAT DE SANTE ET LES CONDITIONS DIFFICILES DE

TRAVAIL LIEES A L'APRES GUERRE.

QUE VOTRE ŒUVRE NE PERISSE JAMAIS.

ET QUE LE TOUT PUISSANT QUE VOUS AVEZ SI FIDELEMENT SERVI VOUS ACCUEILLE DANS SON
PARADIS CELESTE.

PREFACE

Je tiens avant toute chose à remercier tous ceux qui m'ont soutenue durant ces années de thèse.

Au Professeur Gilles Ponchel que je remercie de m'avoir acceptée au sein de son équipe. Vous m'avez beaucoup appris aussi bien au sens humain que professionnel. Grâce à votre accueil, votre disponibilité et vos conseils avisés j'ai pu progresser durant ces années de thèse. Vous avez réussi à me communiquer votre passion pour la recherche et m'avez aidée à puiser en moi les ressources dont j'avais besoin pour mener à bien ce projet.

Au Professeur Malan Kla Anglade qui a accepté de codiriger cette thèse. Je vous serais toujours reconnaissante de m'avoir octroyé votre confiance. Merci d'avoir pris de votre temps si précieux pour me guider et m'orienter. Votre bonne humeur et votre enthousiasme m'ont aidée à surmonter les difficultés. Merci pour votre soutien sans faille.

Au Professeur Kablan Brou Jérôme mon supérieur hiérarchique et cher maître. Vous vous êtes toujours rendu disponible pour moi et n'avez jamais manqué de me faire bénéficier de vos sages conseils. Vous avez toujours su lire en moi et trouver les mots justes pour m'aider à prendre mes repères. Daignez accepter mes remerciements sincères et filiaux.

Au Professeur Elias Fattal qui m'a accueillie tout d'abord dans son master et m'a encouragée à faire cette thèse. Je ne saurais assez vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je n'oublierai jamais votre aide décisive pour la fin de ma thèse alors qu'une guerre d'une inimaginable violence venait de secouer mon pays menaçant de me faire périr avec les miens. Ainsi j'ai pu trouver grâce à votre soutien la force de m'expatrier à nouveau pour achever cette belle œuvre déjà bien entamée.

A vous Dr Armand Koffi je veux exprimer toute ma reconnaissance. C'est vous qui êtes à l'origine de ma carrière professionnelle à la Faculté de Pharmacie d'Abidjan. En effet vous m'avez donné l'opportunité de poursuivre ma formation depuis mon M2 à Châtenay-Malabry jusqu'à cette thèse, n'hésitant pas souvent à assumer mes charges académiques. Vous êtes pour moi un mentor et un modèle. J'espère vous rendre hommage par mon travail durant toute ma carrière universitaire.

Au Docteur Kawthar Bouchemal avec qui j'ai appris au quotidien l'amour du travail bien fait. Je voudrais ici vous exprimer mon admiration devant autant de rigueur au travail, de courage et d'abnégation. Vous n'avez ménagé aucun effort ni aucun sacrifice pour que cette thèse se déroule dans de bonnes conditions. J'espère avoir été à la hauteur de la confiance que vous m'avez octroyée et vous souhaite une riche et heureuse carrière professionnelle ainsi qu'une vie familiale épanouie.

A tous mes amis et collègues de la Faculté de Pharmacie d'Abidjan et de Châtenay-Malabry qui m'ont si bien entourée de leur affection et de leur aide. Je me suis sentie avec vous comme en famille. Je ne vous oublierai pas dans mes prières afin que vous receviez le centuple de ce que vous m'avez accordé. Plus particulièrement aux Docteurs José Lia, Amari Serges Antoine, Ismael Dally, N'Guessan Alain du Laboratoire de Pharmacie galénique d'Abidjan. Merci également à Dr Bony Nicaise, Dr Bosson-Vangah Henriette, Dr Fofié Yvette, Dr Konaté Abibatou, Dr Cablan Arsher. A toute l'équipe VI UMR CNRS 8612 : Bénédicte Pradines, Laura De Miguel, Olivier Cauchois, Sylvia Mazzaferro sans oublier Christelle, Magalie, Godefroy, Narimane et Ludovica. A tous les membres de l'équipe III et de l'équipe V plus particulièrement Amélie, Nadège, Rym et Nicolas.

A mes supérieurs hiérarchiques du Ministère de la Santé: Monsieur Loukou Dia (DRH de la Santé), Pr Oulaï Soumahoro (Directeur de la DFR) , Pr Aké Michelle, Pr Yapi Désiré, Dr Mahama

Ouattara, Dr Amin Yolande. Merci à vous et à vos collaborateurs. Je n'oublie pas tous mes amis, collègues et collaborateurs de la Direction de la Pharmacie et du Médicament d'Abidjan. C'est aussi grâce à vous tous que j'ai pu concrétiser mon projet.

Merci à tous les experts qui ont contribué à la valeur scientifique de ce travail, notamment à :

Florence AGNELY Université Paris-Sud 11, UMR CNRS 8612 « Physicochimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie », Faculté de Pharmacie- Châtenay-Malabry pour son aide précieuse et sa disponibilité lors des études de rhéologie

Loïc MARTIN CEA et ses collaborateurs, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Gif sur Yvette, pour leur appui scientifique et logistique

Valérie NICOLAS, Université Paris-Sud, Plate-forme d'Imagerie Cellulaire de l'IFR 141-IPSIT, Faculté de Pharmacie-Châtenay-Malabry, pour son accueil chaleureux et ses conseils lors des travaux de vidéomicroscopie.

Christian POÛS, Biochimie et Biologie Cellulaire – JE2493, Université Paris Sud, IFR 141, Faculté de Pharmacie-Châtenay-Malabry, pour son aide providentielle dans l'analyse des résultats de vidéomicroscopie.

Vanessa Lievin-Le Moal, Université Paris-Sud, CNRS UMR 8076 « Biomolécules : Conception, Isolement, Synthèse Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire », Faculté de Pharmacie-Châtenay-Malabry, pour avoir gentiment accepté de mener les études de culture cellulaire.

Madeleine DJABOUROV, Laboratoire de Physique Thermique, ESPCI pour sa très fructueuse collaboration.

Merci à mes rapporteurs : Dr Guido Vanham et Dr Christine Charrueau pour avoir gentiment accepté de juger cette thèse.

Merci à tous mes amis en Côte d'Ivoire, en France, au USA et au Canada pour votre disponibilité et votre soutien. Merci pour les bons moments passés ensemble, pour les coups de fil et les messages. Vous m'avez apporté beaucoup de réconfort et de joie durant ces années de dur labeur et de sacrifices.

Merci également au Curé de la Paroisse de Saint-Brice-sous-Forêt, le Père Victor Djelou et à ses paroissiens pour tous les bienfaits dont ma famille et moi avons bénéficié durant notre séjour lors de cette dernière année de thèse.

Enfin je ne saurais terminer sans saluer les miens :

Merci à mon père et à ma mère : Assaffoua et Virginie, de m'avoir appris à être courageuse et à persévérer dans la vie malgré les difficultés. Merci pour vos encouragements et vos prières. Merci à mes frères et sœurs Pierre, Linda, Stéphane et Marie-Christelle avec qui j'ai partagé au quotidien mes joies et mes difficultés. Merci à tous pour vos encouragements et vos prières. Merci à mes cousins et cousines notamment Paul Ahiba et sa femme Marie-Laure. Merci à mes oncles et tantes. Merci également à mes beaux-parents, belles-sœurs et beaux-frères. Merci pour votre amour et votre soutien sans lesquels je n'aurais pu tenter cette palpitante et enrichissante aventure. Dr Aka Olivier, mon grand frère par adoption merci également à toi que Dieu vous bénisse toi et ta petite famille.

Merci à Christian Hector Théodule, mon très tendre époux pour sa patience et ses sacrifices. Tu n'a jamais essayé de m'empêcher de réaliser cette œuvre, au contraire tu m'as encouragée et soutenue malgré les longs mois passés seul avec nos enfants Marie-Camille et Franck-Owen. Merci à vous, merci à toi pour cette incommensurable preuve d'amour.

*QUE LE TOUT PUISSANT VOUS BENISSE ET VOUS RENDE AU CENTUPLE CE
QUE VOUS AVEZ FAIT POUR MOI*

RESUME

Pour être pleinement efficace, une formulation microbicide topique doit empêcher l'interaction du virus avec les cellules cibles. Pour cela, notre stratégie a été d'imaginer une formulation capable de constituer simultanément une barrière physique et pharmacologique, opposée à l'entrée des particules virales dans l'organisme. Dans ce cadre, nous avons sélectionné des hydrogels thermosensibles et muco-adhésifs à base de pluronics et nous les avons associés à un peptide anti-VIH, le M48U1 développé par le CEA (Equipe Dr Loïc Martin). Ce peptide est un mime du récepteur CD4 porté par certaines cellules immunitaires, connu pour interagir avec la protéine d'enveloppe gp120 du VIH

Deux formulations thermogélifiantes et mucoadhésives fondées sur l'emploi de copolymères à bloc d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, associés à de l'hydroxypropyl méthylcellulose ont été sélectionnées, respectivement constituées de F127/HPMC (20/1)% m/m et de F127/F68/HPMC (22,5/2,5/1) % m/m.

Dans un premier temps, nous avons déterminé les propriétés rhéologiques et mucoadhésives de ces formulations par des techniques de caractérisation rhéologique et des mesures extensométriques de l'adhésion sur muqueuse vaginale de porc. Ce premier travail a permis de prendre en compte certaines exigences spécifiques de la voie vaginale. En effet, la cavité vaginale est caractérisée par son pH physiologique acide (4,5-5,5) et par la présence d'un fluide physiologique. Il est donc important que la formulation des hydrogels tienne compte de l'influence de ce fluide au moment de l'administration dans la cavité vaginale, afin de contrer d'éventuelles pertes de viscosité et d'adhésivité en raison même de la dilution locale. Nous avons ainsi pu vérifier que nos formulations résistaient de façon satisfaisante à la dilution par le fluide vaginal simulé. De ce point de vue, la formulation constituée d'un mélange de pluronics F127/F68/HPMC

(22,5/2,5/1)% m/m a présenté des propriétés élastiques et mucoadhésives meilleures que celle à base de F127/HPMC (20/1)% m/m. Ceci pourrait s'expliquer par sa concentration plus élevée en pluronics. Afin de mieux expliquer les résultats observés, la structure des hydrogels formulés a été analysée par diffraction (diffusion) des rayons X aux petits angles et des études en micro-DSC ont été menées.

Pour démontrer la capacité de ces hydrogels ainsi formulés à constituer une barrière physique vis-à-vis de l'infection par le virus, nous avons utilisé une technique originale consistant à évaluer la diffusivité de particules modèles des particules virales dans ces hydrogels. Dans ce but, pour d'évidentes raisons de sécurité, des nanoparticules de polystyrène carboxylées fluorescentes ont été choisies en raison de leur taille avoisinant celle des particules du VIH-1 mature. La mobilité de ces particules dans nos hydrogels a été observée par vidéomicroscopie (Plateforme d'imagerie de l'IPSIT). Ces travaux ont montré un important effet de ralentissement de la diffusion des particules comparativement à plusieurs contrôles, dont notamment un hydrogel d'hydroxyéthyl cellulose (HEC à 1,5% m/m), classiquement utilisé dans plusieurs formulations microbicides topiques anti-VIH testées dans divers essais cliniques. Par ailleurs, la diffusibilité des particules modèles dans le mucus cervico-vaginal non ovulatoire de *Cynomolgus macaque*, a également été évaluée.

Ainsi, la diffusivité effective des nanoparticules était respectivement 1320 et 590 fois plus lente dans les deux hydrogels F127/HPMC (20/1)% m/m et F127/F68/HPMC (22,5/2,5/1)% m/m en comparaison avec l'hydroxyéthylcellulose (HEC) 1,5% m/m. Par rapport au mucus cervico-vaginal de macaque, elle était respectivement 3 et 1,4 fois plus lente. Il est à noter que le mucus étant un milieu très hétérogène, les particules y ont présenté deux types de mobilité. Tandis que certaines particules étaient quasiment immobiles, d'autres présentaient un mouvement quasi-brownien. En ce qui concerne les différences entre formulations, il est très vraisemblable que

l'effet barrière de ces formulations dépende étroitement de la structure fine du gel. Ainsi, les travaux de caractérisation menés en micro-DSC ont montré que le F68 désorganisait les micelles de F127, ce qui pourrait expliquer la plus grande mobilité des particules de COOH-PS dans l'hydrogel à base de mélange de pluronics F127 et F68 comparativement à ceux à base de pluronic F127 uniquement. Les formulations mises au point constituent clairement une barrière physique vis-à-vis des particules modèles. Malgré les évidentes difficultés techniques, ces résultats encourageants mériteraient d'être confortés lorsque les hydrogels sont confrontés aux particules virales elles-mêmes.

En parallèle de ces travaux, une étude de cytotoxicité *in vitro* sur deux lignées cellulaires a également été menée. Il s'agit de la lignée HeLa provenant d'un adénocarcinome du col de l'utérus humain et de la lignée Caco-2/TC7 provenant d'un adénocarcinome colique humain. La viabilité cellulaire était supérieure à 80% sur les deux lignées étudiées et la cytotoxicité des hydrogels n'était pas significativement différente de celle du gel témoin HEC ni du témoin (PBS).

Pour conférer simultanément à ces formulations un effet de « barrière pharmacologique », un peptide anti-VIH : le M48U1 développé par le CEA (Equipe Dr Loïc Martin), capable de bloquer l'entrée du virus au niveau des cellules immunitaires a été associé à la formulation. La disponibilité du minipeptide dans les hydrogels a été évaluée par la technique de diffusion en cellule de Franz. La stabilité du peptide au sein ceux-ci, sa quantité libérée et sa perméation *ex vivo* à travers la muqueuse cervico-vaginale de *Cynomolgus macaque* ont été évalués grâce à la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) (Biacore ® T100). Des études de perméation *ex vivo* ont été menées grâce à la technique de diffusion en chambre de Ussing.

Il est apparu que les hydrogels formulés libéraient le peptide M48U1 de façon contrôlée et que celui-ci ne traversait pas la muqueuse vaginale de macaque. En effet, après 24h, une quantité suffisante de peptide demeurait dans nos hydrogels de sorte à pouvoir éventuellement interagir

avec le virus s'il était présent. Par ailleurs, l'étude de perméation menée *ex-vivo* en chambre de Ussing au travers de la muqueuse cervico-vaginale de *Cynomolgus macaque* nous a permis de confirmer qu'il n'y aurait pas de passage systémique du peptide M48U1.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus sont prometteurs en ce sens qu'ils suggèrent la possibilité de créer des formulations microbicides capables, une fois administrées, de former simultanément une barrière physique contre le VIH et une « barrière pharmacologique », par la présence d'une molécule active, disponible et capable de bloquer l'entrée cellulaire du VIH. Ces travaux méritent donc d'être poursuivis afin d'évaluer cette fois, les performances des formulations proposées en présence du VIH.

Mots-clés : Systèmes thermogélifiants, hydrogels, Pluronic, VIH-1, vidéo-microscopie, suivi de particules, diffusivité, microbicides, cytotoxicité, M48U1, profils de libération, mucoadhésion.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	16
INTRODUCTION GENERALE	19
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	27
1. Introduction	28
2. La voie vaginale. Physiologie et exigences	31
3. Mécanisme de transmission du VIH-1 par voie sexuelle	33
4. Prévention de l'infection par le VIH : travaux antérieurs et perspectives	38
4.1. Principales substances microbicides anti-VIH	39
4.2. Comment formuler efficacement un microbicide pour la voie vaginale ?	48
4.2.1. Gels pharmaceutiques couramment utilisés	51
4.2.2. Hydrogels à base de polymères mucoadhésifs	53
4.2.3. Hydrogels à base de polymères thermogélifiants	58
5. Le développement préclinique d'un candidat microbicide destiné à la voie vaginale	65
5.1. Modèles in vitro et ex vivo d'évaluation de candidats microbicides	69
5.2. Modèles in vivo d'évaluation des candidats microbicides	70
6. Développement clinique des microbicides : état des lieux et perspectives	73
7. Conclusion	78
8. Références	80
CHAPITRE II: FORMULATION OF MUCOADHESIVE VAGINAL HYDROGELS INSENSITIVE TO DILUTION WITH VAGINAL FLUIDS	107
1. Introduction	109
2. Experimental section	110
2.1. Materials	110

2.2. Methods	111
2.2.1. Preparation of citrate buffer	111
2.2.2. Preparation of simulated vaginal fluid (SVF)	111
2.2.3. Preparation of hydrogels	111
2.2.4. Preparation of diluted hydrogels	112
2.2.5. Rheological evaluation of hydrogels	113
2.2.6. Micro-DSC	114
2.2.7. Mucoadhesion experiments	115
a. Animals	115
b. Mucoadhesion experimental procedure	116
2.2.8. Statistical analysis	117
3. Results and discussion	117
3.1. Effect of dilution of hydrogels with SVF on gelling temperature and re-formulation of hydrogels	117
3.2. Effect of dilution with SVF on viscoelastic properties of hydrogels	123
3.3. Effect of dilution on hydrogels' mucoadhesion	126
4. Conclusions	131
5. Acknowledgements	132
6. References	133
CHAPITRE III: FORMULATION OF THERMOSENSITIVE AND MUCOADHESIVE VAGINAL HYDROGELS CONTAINING THE CD4 MINIPROTEIN M48U1 AS A NOVEL ANTI-HIV-1 MICROBICIDE	138
1. Introduction and objectives of the work	140
2. Materials and methods	142
2.1. Materials	142
2.2. Formulations of gels and controls	143

2.3. Evaluation of the toxicity of HEC and pluronic hydrogels	144
2.4. Determination of the concentration of M48U1	145
2.5. Stability of M48U1 in formulations	146
2.6. Release experiments	146
2.7. Permeation of the peptide through macaque vaginal mucosa	147
3. Results and discussion	148
4. Conclusions	152
5. References	153

**CHAPITRE IV: SYNTHETIC NANOPARTICLES WERE BETTER IMMOBILIZED INTO
THERMOSENSITIVE PLURONIC HYDROGELS THAN IN MACAQUE CERVICO-
VAGINAL MUCUS**

1. Introduction	158
2. Materials	161
3. Methods	161
3.1. Preparation of citrate buffer	161
3.2. Preparation of hydrogels	162
3.3. Observation in glass vial system	162
3.4. Videomicroscopy and multiple particles tracking	163
4. Results	164
4.1. Macroscopic observations of the diffusivity of fluorescent dye into the hydrogels	164
4.2. Multiple particles tracking using videomicroscopy	165
5. Discussion	168
6. Conclusion	173
7. References	174
DISCUSSION GENERALE	178
1. Introduction	178

2. Formulation et caractérisation physico-chimique et rhéologique des hydrogels insensibles à la dilution par le fluide vaginal simulé	181
3. Evaluation de la capacité des formulations thermosensibles et mucoadhésives à immobiliser des particules de taille 170 nm en comparaison avec du mucus cervico-vaginal de <i>Cynomolgus macaque</i>	189
4. Mise en évidence de l'absence de toxicité des formulations thermosensibles et mucoadhésives	191
5. Etude de la libération et de la stabilité d'un principe actif à activité préventive anti-VIH spécifique	193
6. Vérification in vitro de l'absence de passage du peptide M48U1 à travers la muqueuse vaginale de <i>Cynomolgus macaque</i>	194
7. Conclusion	195
8. Références	197
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	202
ANNEXE 1 : Liste des acides aminés et leurs abréviations	204
ANNEXE 2 : Espèces de macaques les plus couramment utilisées dans la recherche sur les microbicides	205
ANNEXE 3 : Rhéomètre de type CSL 100	206
ANNEXE 4 : Analyseur de texture de type TAXT2	207
ANNEXE 5 : Vidéomicroscope Axio observer Z1-COLIBRI (Zeiss, Allemagne) équipé d'une caméra CCD HSM	208
ANNEXE 6: Caco-2/TC7 cells viability after 24h of contact with F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%) hydrogels, in comparison with HEC and water	209

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMD : Alliance for microbicide development

CCR5 : Chemokine (C-C motif) receptor 5

CD : Dichroïsme cellulaire

CD4 : Cluster Différenciation 4

CMC : Concentration micellaire critique

CVM : Cervico-vaginal mucus

CXCR4: Chemokine (C-X-C motif) receptor 4

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA: Acide éthylène diamine tétraacétique

EHEC: Ethylhydroxy éthylcellulose

ELISA : Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay

F127 ou P407 : Poloxamer 407 ou Pluronic F127

F68 ou P188 : Poloxamer 188

FCS : Fluorescence correlation spectroscopy

FDA: Food and drug administration

FRAP: Fluorescently-labeled probe observations using fluorescence recovery after

photobleaching

gp: Glycoprotéine

HPMC: Hydroxypropyl méthylcellulose

HPV: Human Papilloma Virus ou Papillomavirus

HSV : Herpes Simplex Virus

Ig : Immunoglobuline

IST : Infection sexuellement transmissible

LCST : Lower Critical Solution Température

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation

MC : Méthylcellulose

MSD : Mean square displacement

MTSA : Microbicide Transmission and sterilization Assay

PAA: Acide polyacrylique

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PC : Polycarbophile

PEG : Polyéthylèneglycol

pH : Potentiel d'hydrogène

PLGA : Poly (D, L-acide lactique-co-acideglycolique)

PNIPAM : Poly (N-isopropylacrylamide)

POE : Poly (oxyde d'éthylène)

POP : Poly (oxyde de propylène)

PrEP : Pre-Exposure Prophylaxis

PS : Polystyrène

PVP: Poly(vinylpyrrolidone)

RANTES: Regulated upon Activation in Normal T-cells, Expressed, probably Secreted

SDS : Laurylsulfate de sodium ou dodécylsulfate de sodium

SIDA : Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis

SPT/MPT : Single or Multiple Particle Tracking

TDF : Ténofovir disoproxil fumarate

T_{gel} : Température de gélification

TMC : Température micellaire critique

VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine

**Développement de systèmes d'administration
originaux destinés à la prévention de la
contamination par le VIH chez la femme**

Introduction Générale

INTRODUCTION GENERALE

Comment a été découverte l'infection à VIH ?

L'origine de l'infection à VIH serait liée à la transmission du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) à l'homme (Montagnier, 210). En effet ces virus sont philogénétiquement proches des virus humains. En 1959, le premier échantillon de sérum contenant le virus VIH est prélevé et conservé sans avoir pu être identifié à Léopoldville aujourd'hui Kinshasa (République Démocratique du Congo) (Montavon, 2002, Zhu, 1995,1998). Plusieurs épidémies attribuées à des zoonoses émergent dans les années 1970 en Afrique centrale et en Amérique du nord (Montagnier, 2010). En 1981 les premiers cas sont signalés par le CDC (Centers for Disease Control) aux Etats-Unis chez des jeunes hommes homosexuels. Les sujets présentent des affections graves qui surviennent généralement en état d'immunodépression ; il s'agit de la pneumocystose à *Pneumocystis carinii* et du sarcome de Kaposi (Montagnier, 2010, Greene, 2007, CDC Report 1981, Gallo et al., 1984, Popovic et al., 1984). Plusieurs cas similaires sont alors identifiés en Europe (Montagnier, 2010). Le syndrome lié à la maladie est caractérisé biologiquement par une forte dépression immunitaire et cliniquement par des infections opportunistes qui comme précédemment décrites n'apparaissaient que chez des sujets hémophiles ou transfusés (Montagnier, 2010). En 1980 Robert Gallo découvre le premier rétrovirus humain : le HTLV-1 en le présentant comme la cause probable de la maladie (Decoster, 2000). Le syndrome lié à cette affection est baptisé Syndrome d'Immuno-déficience Acquise (SIDA) en 1982 (Greene, 2007, CDC Report 1982). Enfin, c'est l'équipe du Professeur Luc Montagnier qui isole le virus VIH-1 alors dénommé LAV pour la première fois en 1983 puis le VIH-2 en 1985 (Barre-sinoussi et al., 1983, Montagnier et al., 1984, Clavel et al., 1986).

Et aujourd'hui ?

Depuis l'identification du VIH, le SIDA s'est transformé en véritable pandémie. Selon l'UNAIDS (UNAIDS Global report, 2010), fin 2009, 33,5 millions de personnes vivaient avec le VIH et plus de la moitié étaient des femmes. Les pays d'Afrique sub-saharienne sont les plus touchés avec 68% des personnes infectées dans le monde en 2009 (UNAIDS Global report, 2010) et 60% en 2011 (OMS, 2012). Paradoxalement à la baisse du nombre de nouvelles infections, le nombre total de personnes vivant avec le VIH ne cesse de croître (Figure 1). Selon l'OMS, près de 30 millions de personnes sont mortes de cette affection (OMS, 2012). La transmission du virus par la voie sexuelle est la principale voie de contamination dans les pays les plus touchés (Sharp & Hahn, 2011, Hladik & McElrath, 2008, Cohen et al., 2011).

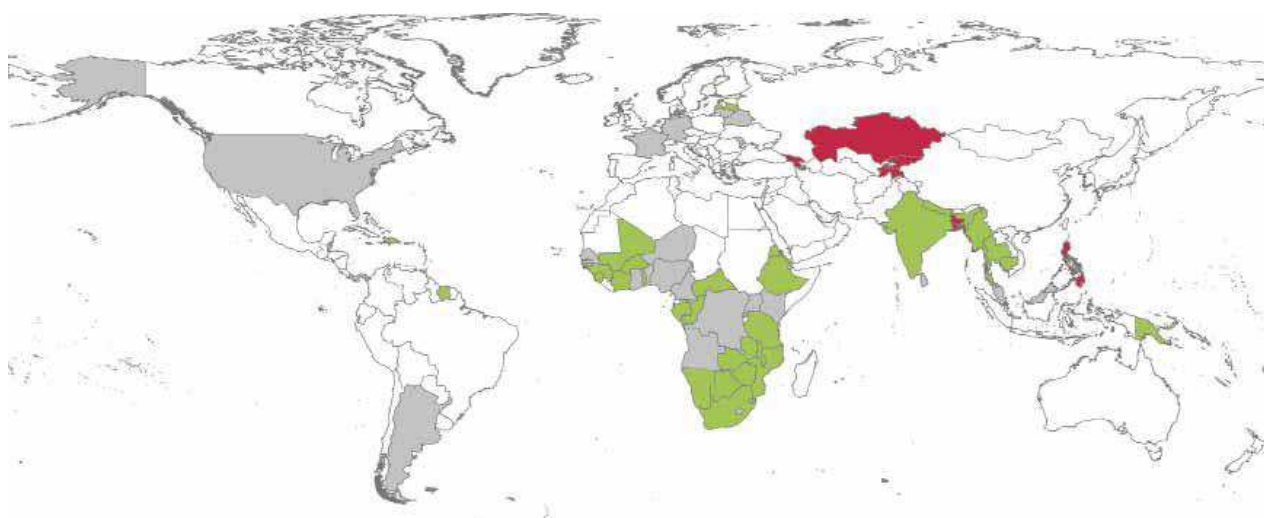


Figure 1 : Evolution du taux d'incidence de l'infection à VIH de 2001 à 2009 dans quelques pays sélectionnés. (UNAIDS, global report 2010). En rouge : augmentation >25%; en gris: stable; en vert : baisse >25% ;en blanc : non inclus dans l'analyse.

Quels moyens de lutte ont été mis en place ?

Les deux stratégies de lutte sont le traitement curatif et la prévention. En ce qui concerne le traitement curatif la thérapie antirétrovirale est la seule pratiquée. Les antirétroviraux utilisés sont

divisés en six classes selon leur mécanisme d'action. Il s'agit des (i) inhibiteurs nucléosidiques et nucléotidiques de la transcriptase inverse ou INTI (ex : zidovudine : AZT, ténofovir :TDF) ; (ii) inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse ou INNTI (ex : efavirenz :EFV) ; (iii) inhibiteurs de la protéase ou IP (ex : ritonavir : RTV, lopinavir : LPV) ; (iv) les inhibiteurs de fusion et d'entrée (ex : enfurtivide : T20) ; (v) les inhibiteurs des corécepteurs (ex : maraviroc) et enfin ; (vi) les inhibiteurs de l'intégrase (ex : ratelgravir). (Schols, 2006). En 2009, dans les pays sous-développés et en voie de développement 30% de personnes supplémentaires par rapport à 2008 ont reçu une thérapie antivirale (UNAIDS Global report, 2010). Cependant des mesures de prévention sont nécessaires pour ralentir l'épidémie. En 2009, 22% des fonds investis pour la prévention ont été investis dans les pays sous-développés et en voie de développement. En dehors des mesures de prévention classique (usage des préservatifs, abstinence, fidélité...), d'autres stratégies plus rationnelles sont aujourd'hui en forte évolution et constituent les principaux axes de recherche en matière de prévention. Selon l'AVAC les efforts de prévention concernent le développement de vaccins, le développement de microbicides, la circoncision masculine volontaire, le traitement prophylactique préexposition (PrEP), la lutte contre les MST notamment l'infection à herpès virus (HSV-2) et à Human papilloma virus (HPV) (AVAC, 2012).

La prévention est-elle encore envisageable ?

A ce jour, aucun vaccin contre la transmission du VIH n'existe sur le marché. Toutefois, la transmission sexuelle du VIH et la vulnérabilité des femmes vis-à-vis de l'infection rendent nécessaire le développement de moyens efficaces de prévention destinés à la voie vaginale. Les microbicides topiques anti-VIH semblent être une bonne alternative pour empêcher ou réduire la transmission du virus (AMD, 2012). Malheureusement, aucun microbicide topique vaginal n'a validé la phase clinique de son développement. En effet, plusieurs études dont celles du programme CONRAD (Contraceptive Research and Development) ont dû être arrêtées.

Le nonoxynol-9, l'une des substances microbicides les plus prometteuses en fait partie (McGowan, 2006, Van Damme et al, 2002) de même que le PRO2000 (Cohen., 2009). Les leçons tirées des précédents échecs rendent encore plus complexe la conception d'une substance microbicide idéale. Celle-ci devrait entre autre (Lard-Whiteford et al., 2004):

- être active en présence des fluides physiologiques (sperme, fluide vaginal) ;
- avoir une faible cytotoxicité in vitro ;
- ne perturber ni la flore vaginale ni modifier le pH vaginal ;
- ne pas irriter la muqueuse vaginale ;
- n'être ni génotoxique, ni immunotoxique, ni carcinogène ;
- ne pas avoir d'effet sur la santé reproductive ;
- être formulée de façon à être efficace sans gêner le plaisir sexuel ;
- être stable dans les conditions normales d'utilisation ;
- être compatible avec les préservatifs et d'autres barrières physiques ;
- être le plus faiblement possible absorbée en milieu systémique ;
- être active chez les modèles animaux ;
- être active contre les autres MST ;
- ne pas favoriser les phénomènes de résistance ;
- être facile à utiliser,
- avoir une couleur, une odeur, une consistance et un goût acceptables
- sa formulation doit pouvoir être utilisée par voie rectale.

Aujourd'hui, malgré les échecs rencontrés, la recherche sur les microbicides topiques est en pleine expansion. CAPRISA, un gel à base de ténofovir testé en Afrique du Sud chez des femmes de 18 à 40 ans a montré sa capacité à réduire l'infection par le VIH de 39% et par le HSV de 51%

(UNAIDS, Global report, 2010). Ces résultats sont encourageants pour la recherche concernant les microbicides topiques vaginaux.

Notre contribution à la recherche sur la prévention.

Dans ce contexte, notre travail consiste à concevoir et développer des gels microbicides destinés à la prévention de l'infection par le VIH. Nous le présenterons de la manière suivante :

- dans une première partie nous essaierons de faire le tour de la problématique en donnant un bref aperçu de l'état des lieux et les perspectives en matière de recherche sur les microbicides en général et sur les formulations topiques pour la voie vaginale en particulier. Avant cela nous poserons les bases anatomo-physiologiques concernant la voie vaginale, virologiques concernant le virus VIH et son mécanisme d'infection, ainsi que galéniques à propos des formulations adaptées à cette voie.
- une deuxième partie expérimentale présentera les travaux de formulation et de caractérisation que nous avons menés au sein de l'équipe.
- nous terminerons par une discussion et conclurons sur les perspectives de développement issues de nos travaux de recherche.

Références

- ✓ AMD, Alliance for Microbicides Development. MICROBICIDES ways forward. (Van Damme L). Health and Sexuality Microbicides. Special report 2002, 1–8.
<http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/27266>. Consulté en 2012
- ✓ AVAC, Advocacy for HIV prevention.
<http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/3109Global>. Consulté en 2012
- ✓ AVAC, Advocacy for HIV prevention.
<http://www.avac.org>
- ✓ Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F, Nugéyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Bin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C. et al. Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983, 220, 868–871
- ✓ Clavel F., Guyader M., Guetard D. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 1986, 324 (6098), pp. 691-695
- ✓ Cohen M.S., Shaw G.M., McMichael A.J., Haynes B.F. Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. *N Engl J Med* 2011, 364, 1943–1954.
- ✓ Decoster A. Les retrovirus. Immunology courses [French] (available online at <http://anne.decoستر.free.fr/d1viro/vretrov0.html>), consulté en 2012.
- ✓ Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B., and et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984, 224, 500-3.

- ✓ Greene, W. C. A history of AIDS: looking back to see ahead. *Eur J Immunol* 2007,37(1), S94-102.
- ✓ Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: Host invasion. *Nature Reviews Immunology* 2008, 8, 447-457.
- ✓ McGowan I. Microbicides: A new frontier in HIV prevention. *Biologicals* 2006, 34 (4), 241-255.
- ✓ Montagnier L. 25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine. *Virology* 2010, 397, 248-254
- ✓ Montagnier L., Gruest J., Chamaret S., Dauguet C., Axler C., Guetard D., Nugeyre M.T., Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Bruner J.B., Klatzman D, Gluckman J.C. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoïde cell Lines. *Science* 1984, 225; 63-66.
- ✓ Montavon C. Etude des VIH-1 recombinants en Afrique. Montpellier II France : Montpellier. 2002.
- ✓ OMS Organisation Mondiale de la Santé, <http://www.who.int/hiv/data/en/>
- ✓ Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984, 224, 497-500.
- ✓ Report, M. a. M. W. Epidemiologic notes and reports: possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome, AIDS - California, *MMWR Weekly*, CDC, 1982.
- ✓ Report, M. a. M. W. Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California, *MMWR Weekly*, 1981.
- ✓ Schols D. HIV co-receptor inhibitors as novel class of anti-HIV drugs. *Antiviral. Res.*, 2006, 71, 216-226

- ✓ Sharp P.M., Hahn B.H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspec Med 2011.doi: 10.1101/cshperspect.a006841.
- ✓ UNAIDS. (ONUSIDA= Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA). Global Report 2010. http://www.unaids.org/globalreport/global_report.htm Consulté en 2012
- ✓ Van Damme L., Ramjee G., Alary M., Vuylsteke B., Chandeying V., Rees H., et al. Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. Lancet, 2002, 360, 971-977.
- ✓ Zhu, T. and Ho, D. D. Was HIV present in 1959? Nature 1995, 374, 503-504.
- ✓ Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., and Ho, D. D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. Nature 1998, 391, 594-597.

Chapitre I : Revue de la littérature
Gels microbicides destinés à la prévention de
l'infection par le VIH

REVUE DE LA LITTERATURE

GELS MICROBICIDES POUR LA PREVENTION DE L'INFECTION PAR LE VIH

1. Introduction

Le VIH ou Virus de l'Immunodéficience Humaine est un rétrovirus (virus à ARN monocaténaire, de polarité positive) qui infecte l'homme (Figure 1). Il appartient au genre *Lentivirus* (lentus = lent) et à la famille des *Retroviridae*. Deux types sont connus, le VIH-1 et le VIH-2. Briggs *et al* (2003) ont mesuré par cEM (Microscopie électronique conventionnelle) la taille du VIH-1 mature et l'ont estimée à $145 \text{ nm} \pm 25 \text{ nm}$ (les valeurs obtenues s'étendent de 120 à 200 nm). Le virus se transmet par les fluides corporels (sang, salive...), les sécrétions (sperme, sécrétions vaginales) et le lait maternel. Il est responsable du Syndrome de l'ImmunoDéficience Acquise (SIDA). Le VIH-1 et le VIH-2 sont morphologiquement identiques. Ils possèdent une enveloppe formée d'une bicouche lipidique ainsi que d'une couche basale constituée d'une protéine M et de deux protéines membranaires (la gp120 et la gp 41 pour le VIH-1). Cette enveloppe contient une capsidie essentiellement constituée de la protéine p24 pour le VIH-1 qui renferme deux brins d'ARN protégés par des nucléocapsides et des enzymes, dont la transcriptase inverse (ou réverse), l'intégrase, la protéase et la ribonucléase H (Figure 1).

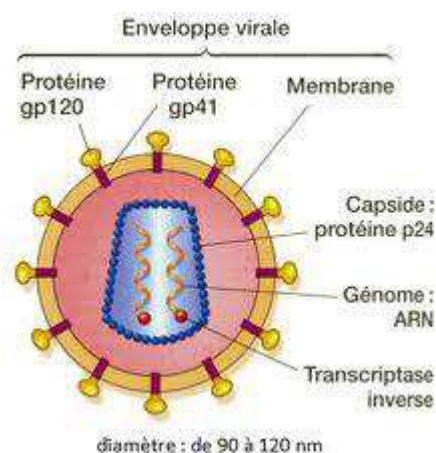


Figure 1 : Représentation schématique du VIH-1.

Deux types du VIH ont été isolés par l'équipe du Professeur Luc Montagnier (Institut Pasteur, Paris). Le VIH-1 a été isolé en France en 1983 à partir d'une culture de lymphocytes infectés

effectuée par Madame Barre-Sinoussi et le VIH-2 à l'hôpital Le Dantec de Dakar en 1985, en collaboration avec une équipe portugaise et l'équipe du Dr Souleymane M'Boup (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983, Montagnier., 2010, Montagnier *et al.*, 1984, Clavel *et al.*, 1986). Le VIH-1 et le VIH-2 sont antigéniquement distincts (Girard *et al.*, 2007). Les deux types possèdent 9 gènes au total. On distingue les gènes gag (group specific antigen), pol (polymérase) et env (enveloppe) et 6 autres gènes codant pour des protéines régulatrices. L'un de ces gènes est spécifique pour chaque type ; il est dénommé vpu (viral protein u) pour le VIH-1 et vpx (viral protein x) pour le VIH-2 (Rodriguez., 2007). Le VIH-1 est le plus virulent et le plus répandu dans le monde. La progression de la maladie est plus lente au cours de l'infection à VIH-2, sa vitesse de transcription étant plus lente. Il reste localisé en Afrique de l'Ouest (Calado *et al.*, 2010, De Cock *et al.*, 1993). Tout au long de ce manuscrit nous nous sommes intéressés à l'infection par le VIH-1 que nous désignons sous le terme VIH ou VIH-1.

La pandémie due au VIH est un problème particulièrement aigu dans le monde. Selon l'OMS (OMS,2012) et depuis le commencement de l'épidémie, plus de 60 millions de personnes ont été contaminées par le virus VIH et presque 30 millions de personnes sont mortes du Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquis (SIDA). En 2010, plus de 34 millions de personnes vivaient avec le VIH dont 60 % en Afrique sub-saharienne. Il y a eu 2,7 millions de nouvelles infections et 1,8 million de décès liés au SIDA. Les pays en voie de développement sont les plus vulnérables à ce phénomène, plus particulièrement ceux d'Afrique sub-saharienne.

La transmission sexuelle du VIH reste la plus fréquente (Sharp *et al.*, 2011, Hladik *et al.*, 2008, Cohen *et al.*, 2011), c'est pourquoi le développement de produits microbicides topiques capables d'inhiber l'adhésion des particules virales à la surface de la muqueuse vaginale ou la fusion du virus avec les cellules immunocompétentes permettrait de disposer de moyens efficaces afin d'empêcher la transmission du virus. Pour atteindre ce but, l'emploi d'un certain nombre de substances microbicides agissant par divers mécanismes d'action peut être envisagé. Plusieurs

molécules candidates ont été testées à travers de nombreuses formulations (McGowan., 2006, Buckheit *et al.*, 2010, Whaley *et al.*, 2010, Lederman *et al.*, 2006). Cependant, pour optimiser l'efficacité des substances microbicides, il est toutefois nécessaire de disposer d'une formulation adaptée, capable de tapisser aisément la muqueuse vaginale tout en restant en place le plus longtemps possible (Morrow & Hendrix, 2010). C'est là l'importance des gels microbicides qui semblent être la forme la plus adaptée à un tel usage. De plus, de telles formulations permettraient à la femme de prendre en charge directement sa protection, indépendamment de la décision de son partenaire (Mantell *et al.*, 2008, Rohan & Sassi., 2009). En effet celles-ci, du fait de leur anatomie sont plus susceptibles de développer des infections sexuellement transmissibles (IST) (y compris l'infection à VIH) que les hommes (Lee., 2000, Rohan & Sassi., 2009). De plus, des études suggèrent qu'elles seraient prêtes à utiliser des gels microbicides pour se protéger (Han *et al.*, 2009, Weeks *et al.*, 2004, El-Sadr *et al.*, 2006). Il serait donc possible d'envisager une amélioration de l'observance d'un geste de prévention ce qui serait bénéfique pour la santé des populations.

Idéalement, une formulation topique microbicide destinée à la voie vaginale devrait avoir les qualités suivantes (Desormeaux *et al.*, 1999) :

- i. une fois administrée, la formulation doit tapisser aisément la muqueuse vaginale. Idéalement, elle formera une barrière (physique et/ou chimique) capable d'empêcher l'interaction du virus avec la muqueuse vaginale ;
- ii. elle doit respecter le pH vaginal normal qui est acide ainsi que la flore vaginale normale ;
- iii. elle doit rester en place le plus longtemps possible pour interagir avec les agents infectieux avant et surtout après le rapport sexuel ;
- iv. elle doit conserver ses propriétés rhéologiques et mucoadhésives après dilution par les fluides physiologiques tels que le fluide vaginal. En effet, il est connu que les

formulations administrées par voie vaginale sont diluées par le fluide vaginal. Cette dilution peut être à l'origine d'une diminution de l'efficacité de la formulation par perte de la gélification, une diminution des propriétés mucoadhésives et une sensation d'inconfort liée à son évacuation de la cavité vaginale ;

- v. l'activité anti-VIH de la substance microbicide doit être préservée ;
- vi. elle ne doit pas être toxique ;
- vii. elle doit maintenir l'intégrité des préservatifs masculins.

De nombreuses formulations ont été évaluées mais malheureusement, aucune formulation à ce jour ne s'est avérée totalement efficace. En effet, plusieurs d'entre elles ont été abandonnées, et rares sont celles ayant atteint la phase III des études cliniques.

Dans cette revue, après quelques généralités sur la voie vaginale et l'infection à VIH, nous ferons l'état des lieux des stratégies visant à la formulations de microbicides topiques pour la voie vaginale tout en faisant un tour d'horizon des gels pharmaceutiques. Nous ferons enfin l'état des lieux sur le plan clinique et aborderons quelques perspectives en matière de prévention de l'infection par le VIH par la voie vaginale.

2. La voie vaginale. Physiologie et exigences

En ce qui concerne sa physiologie, le vagin ne possède pas de glandes sécrétrices, mais il est recouvert d'un fluide appelé fluide vaginal ou sécrétion vaginale. La sécrétion vaginale est un mélange de fluides provenant de diverses sources telles que l'utérus, le col de l'utérus, le plasma et même les sécrétions menstruelles et le sperme (Stenchever *et al.*, 2002, Rohan & Sassi., 2009). Elle est évaluée entre 0,5 et 0,75 g en moyenne (Owen & Katz., 1999, Owen *et al.*, 2000). Elle contient du mucus cervical, des cellules exfoliées provenant de la muqueuse vaginale, du transsudat plasmatique, des carbohydrates, des acides aminés, des acides aliphatiques, des

protéines et des immunoglobulines (IgA par exemple) (Chien & Lee., 2002, Rohan & Sassi., 2009).

Le mucus est un gel viscoélastique qui protège la muqueuse vaginale de l'environnement extérieur et assure sa lubrification (Junginger *et al.*, 2002). Sa composition et ses caractéristiques physiques changent selon la période menstruelle. Il joue un rôle important dans l'activité physiologique du vagin ; notamment dans les phénomènes d'absorption et d'action des médicaments (Khanvilkar *et al.*, 2001). Il serait capable de capturer des particules étrangères et de les éliminer. Par contre certaines d'entre elles pourraient être dirigées vers l'utérus (c'est le cas par exemple des spermatozoïdes en période ovulatoire) (Tang *et al.*, 2009, Cone., 2009).

Le pH vaginal normal est acide (4,5 à 5,5). Il varie selon les sécrétions vaginales et le cycle menstruel. La post-ménopause entraîne des changements importants au niveau de la physiologie du vagin tels que l'atrophie de l'épithélium, l'élévation du pH (6 à 7,5) et la diminution des sécrétions vaginales (Caillouette *et al.*, 1997, Greendale *et al.*, 1997). Les sécrétions menstruelles cervicales et utérines ainsi que le sperme augmentent le pH vaginal (Richardson & Trever, 1999).

La flore vaginale renferme des bactéries (ex : *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Staphylococcus epidermidis*) commensales ou pathogènes. Il s'agit aussi bien de cocci que de bacilles gram positif ou négatif (Rohan & Sassi., 2009).

Le pH vaginal est maintenu par les lactobacilles (dont le *Lactobacillus acidophilus vaginalis* ou bacille de Döderlein) présents dans la muqueuse saine et qui jouent un rôle important dans la prévention des infections par la production d'acide lactique. Ce sont des bactéries gram positifs. Elles sont majoritaires dans une flore vaginale normale. Outre l'acide lactique, ces micro-organismes produisent des substances bactéricides telles que le peroxyde d'hydrogène et des substances tensioactives (Boris & Barbés, 2000). Le pH vaginal joue un rôle important dans l'efficacité des formulations. Ramsey *et al* (2002) l'ont démontré en étudiant l'influence du pH

vaginal sur l'efficacité d'un gel à base de dinoprostone chez 32 femmes. Les résultats ont montré que l'efficacité du gel était significativement associée au pH du vagin.

La voie vaginale est un site d'application efficace pour des traitements locaux ou systémiques (Weber *et al.*, 2005, Vermani & Garg, 2000, Katz & Gerberding, 1997, Richardson & Illum 1992, Garg & Vermani, 2000) du fait de sa grande surface, de sa perméabilité et de sa riche vascularisation. Cependant, il est à noter que sa physiologie est très particulière (fluide vaginal, pH, mucus, flore bactérienne) et variable selon, l'âge, la phase cycle menstruel de même que pendant l'activité sexuelle. De plus, le vagin renferme des enzymes pouvant intervenir lors de l'administration de protéines (Chien & Lee., 2002). Tous ces éléments sont à prendre en considération lors de la formulation des microbicides topiques pour la voie vaginale.

3. Mécanisme de transmission du VIH-1 par voie sexuelle

Le mécanisme d'infection par le VIH-1 au niveau vaginal passe par plusieurs étapes et se fait grâce à une cellule hôte également appelée cellule cible (Figure 2). L'infection peut être le fait des virus seuls ou des virus associés à des cellules. Selon Lederman et al., (2006), la muqueuse vaginale normale est tapissée d'une multicouche de cellules épithéliales qui ne possèdent pas de récepteurs au virus (McGowan, 2006). Le virus associé à une cellule ne peut la franchir que s'il existe une brèche. Quant au virus seul, estimé plus infectieux, il peut se lier aux cellules intra-épithéliales CD4+, CCR5+ dendritiques telles que les cellules dendritiques immatures dites naïves ou les cellules de Langherans qui, grâce à leurs prolongements dendritiques peuvent se faufiler entre les cellules et se rapprocher de la lumière vaginale (Shattock & Moore, 2003, Lawrence et al., 2009). Cette liaison se fait via le récepteur CD4 de la cellule dendritique et la gp120 ou via les lectines membranaires de type C ou la langerine (protéine réceptrice présente au niveau des cellules de Langherans) (Lawrence et al., 2009, Belec., 2007). Les virus sont ensuite présentés au bout de quelques heures à un jour, aux cellules CD4+, CCR5+ subépithéliales qui sont les

lymphocytes T, les macrophages et les cellules dendritiques exprimant les récepteurs au mannose de type Lectine C.

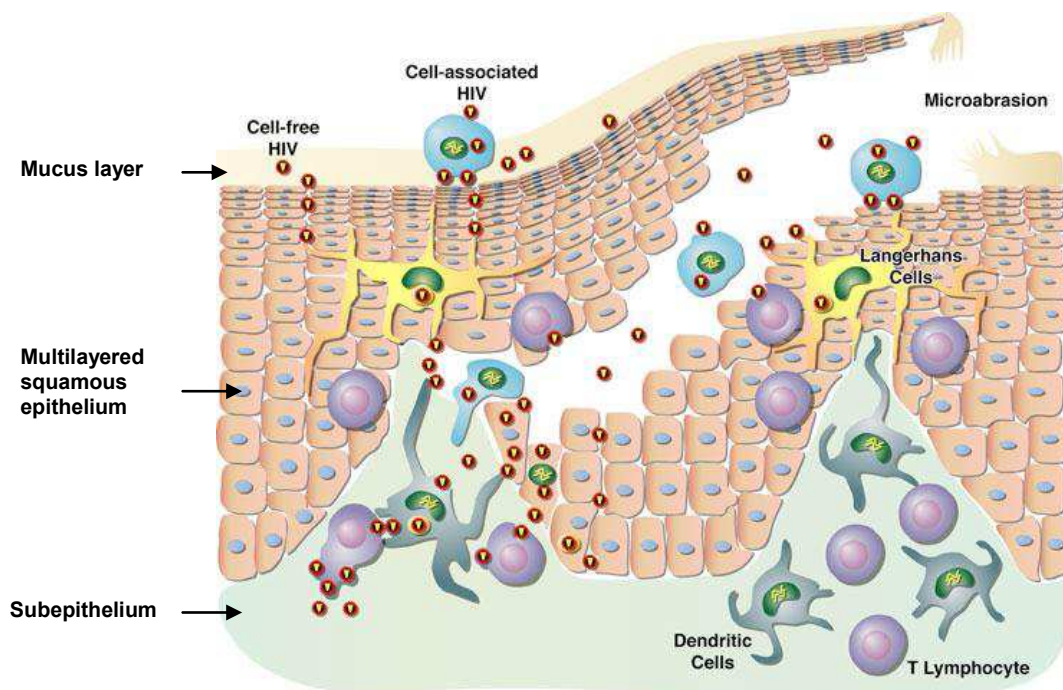


Figure 2 : Mécanisme de l'infection par le VIH-1

(D'après http://www.scripps.edu/gallay/projects_hiv.html)

Selon des études menées sur des modèles animaux tel que le macaque, la première cellule cible (hôte) du VIH-1 serait le lymphocyte T CD4⁺ mucosal ou lymphocyte T helper (Hladik & Doncel, 2010). Les récepteurs CD4 et les corécepteurs CXCR4 et CCR5, les plus répandus au niveau des cellules immunitaires, sont impliqués dans l'étape de fusion du virus avec la cellule hôte. En effet, le virus se lie aux cellules hôtes par sa gp120 qui subit alors une transformation conformationnelle révélant des sites de fixation spécifiques situés au niveau de sa boucle V3, aux corécepteurs

membranaires, (Knysz *et al.*, 2007), que sont les récepteurs de chimiokines CXCR4 (présentes chez les lymphocytes T4) et CCR5 (présentes chez les monocytes et macrophages) (Lawrence *et al.*, 2009, Belec., 2007) (Figure 3). Les différentes souches virales peuvent avoir un tropisme accru pour une chimiokine donnée ou pour les deux. Les principales souches virales impliquées dans le mécanisme d'infection par le VIH-1 ont un tropisme pour le corecepteur CCR5 (Tropisme M).

Le virus peut ensuite fusionner avec la membrane de la cellule hôte, et subir les étapes de transcription, intégration, traduction, et maturation. Il est ensuite libéré sous forme de virions. Il se multiplie ainsi et peu de temps après se retrouve à proximité des tissus lymphoïdes.

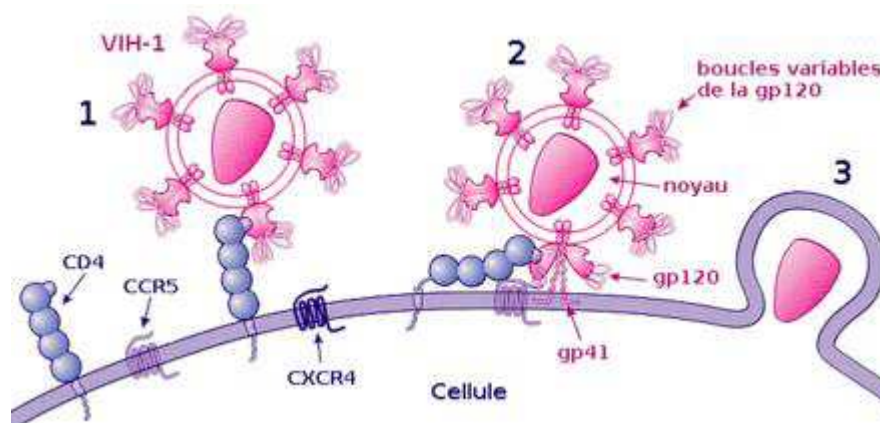


Figure 3 : Mécanisme de fusion du virus avec la cellule cible.

Facteurs favorisant l'infection par la VIH-1.

Le sperme peut fragiliser les défenses naturelles par son effet basifiant sur l'acidité du pH vaginal (Tevi-Benissan *et al.*, 1997) et par conséquent favoriser l'infection par le virus. Il stimule ainsi la réponse immunitaire et augmente le nombre de cellules cibles pour le virus (Kim *et al.*, 2010, Berlier *et al.*, 2006). Les MST également favorisent la pénétration dans les couches profondes de la muqueuse vaginale par le virus car elles provoquent l'apparition de fissures et ulcérations lors du processus inflammatoire (Figure 4). C'est le cas notamment de l'infection à Herpes simplex virus de type 2 (HSV-2).

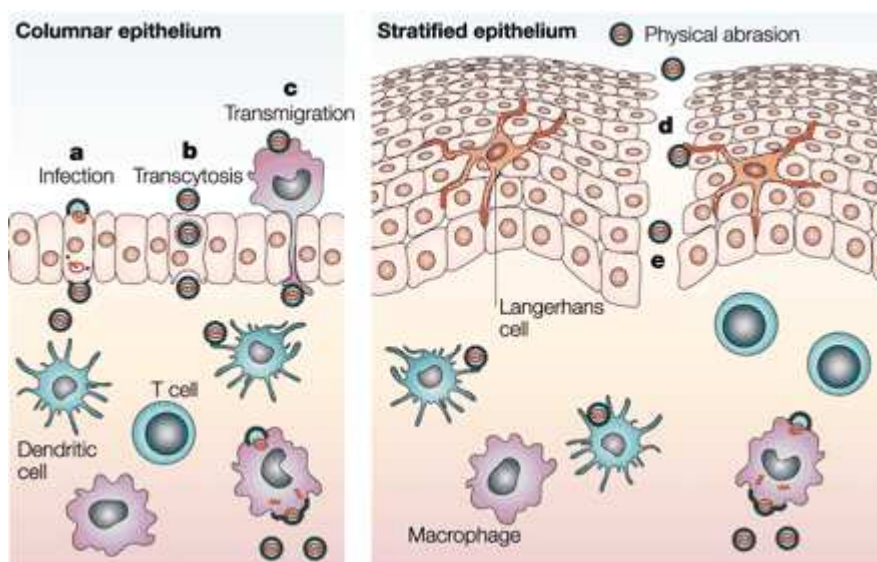


Figure 4 : Mécanismes potentiels de pénétration du virus au travers d'une muqueuse saine ou lésée : (a) Infection directe des cellules épithéliales ; (b) transcytose à travers les cellules épithéliales ou les cellules spécialisées des microplis ; (c) transmigration épithéliale des cellules donneuses infectées ; (d) capture par les cellules intra-épithéliales de Langherans ; (e) contournement de la barrière épithéliales par les brèches physiques (D'après Shattock & Moore. 2003).

Le risque d'infection peut également être augmenté par une protrusion de l'épithélium endocervical qui lui, n'est constitué que d'une seule couche de cellules au niveau ectocervical (Figure 4). La jonction cervico-vaginale de part sa morphologie constitue donc une zone particulièrement vulnérable (McGowan, 2006). De même, l'amincissement de l'épithélium squameux stratifié et la sécheresse vaginale liés aux hormones, notamment la progestérone, peuvent favoriser l'infection (Lederman *et al.*, 2006).

Facteurs diminuant le risque d'infection par le VIH-1

Certains facteurs peuvent ralentir l'infection par le VIH. Il s'agit notamment de l'épaisseur de l'épithélium squameux stratifié, de la couche de mucus qui peut piéger le virus (Lai *et al.*, 2009a,b), de l'importance de la flore commensale, notamment le Lactobacille qui maintient un pH acide et produit du peroxyde d'hydrogène ce qui favorise l'inactivation du virus. Les défenses immunitaires naturelles (défensines, interférons, inhibiteurs de protéases secrétés par les leucocytes) peuvent également ralentir le virus, de même que l'absence génétique (délétion de l'allèle CCR5^{Δ32}) ou induite (par production endogène de ligands) du récepteur CCR5 (Lederman *et al.*, 2006).

Le mécanisme de l'infection par le VIH-1 n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, grâce à une meilleure connaissance des modèles *in vivo* et *in vitro* et à l'évolution rapide des technologies de pointe il sera plus aisé de maîtriser les paramètres à prendre en compte dans le développement de nouveaux microbicides pour la voie vaginale. Il est toutefois important de noter que le mécanisme d'action anti-VIH du topique microbicide va orienter le choix de la formulation la mieux adaptée pour son action. En effet, s'il doit interagir directement avec le virus, il est possible d'envisager une formulation qui tapisse la muqueuse vaginale sans forcément pénétrer en profondeur. Par contre, s'il intervient au niveau de la cellule hôte, il est nécessaire que la formulation permette de l'atteindre (Rohan & Sassi., 2009).

4. Prévention de l'infection par le VIH : travaux antérieurs et perspectives

Exceptées les stratégies visant à créer localement une barrière à l'entrée du VIH, plusieurs stratégies de prévention contre la transmission de l'infection par le VIH sont envisagées telles que la circoncision masculine mais qui ne concerne qu'une moitié de l'humanité, la prophylaxie pré-exposition (Pre-Exposure Prophylaxis ou PrEP) par l'utilisation de principes actifs antirétroviraux administrés par voie orale ou encore la prévention, l'éradication et le traitement des MST d'origine bactériennes, parasitaires et virales, autres que le VIH. Ces MST représentent des facteurs aggravants de l'infection par le VIH.

La PrEP semble être une stratégie pertinente car l'efficacité des antirétroviraux par la voie orale dans un but préventif a été prouvée. Des essais effectués chez le macaque avec la combinaison thérapeutique du ténofovir disoproxil fumarate (TDF) et de l'emtricitabine (Truvada[®] et Viread[®]) ont donné des résultats satisfaisants (García-Lerma *et al.*, 2010). Toutefois, la recherche sur la prévention de l'infection par d'autres voies (notamment rectale ou vaginale) donne également des résultats prometteurs chez la souris humanisée (qui a reçu une greffe d'organe ou de cellules humaines) et le macaque (Veazey *et al.*, 2009, García-Lerma *et al.*, 2008, Cong *et al.*, 2011).

De nombreux chercheurs se sont orientés vers la mise au point d'un vaccin destiné à la prévention de l'infection par le VIH. Cependant, cet objectif étant difficile à atteindre, et afin de contourner le problème, la mise au point de formulations à usage local et topique destinées à cette prévention semble être la solution la plus réaliste. De plus, les préservatifs ne sont pas totalement acceptés ni bien utilisés par les hommes tandis que l'usage des formes microbicides est bien contrôlé par les femmes et ne nécessite ni coopération, ni consentement de la part des partenaires. Ces formes présentent une alternative de choix à la prévention de la transmission du VIH (Elias & Heise, 1994, Langenberg, 2004, Buckheit *et al.*, 2010).

Ainsi, au fil du temps plusieurs molécules ont été testées dans diverses formulations. Actuellement de nombreuses formulations sont en développement préclinique.

4.1. Principales substances microbicides anti-VIH

Un microbicide est une formulation qui peut se présenter sous différentes formes telles que gel, comprimés, film, injectable..., contenant ou pas un principe actif, délivrée à des sujets sains ou porteurs de microbes dans un but prophylactique ou curatif. Cette formulation microbicide, qui doit être bien tolérée, peu coûteuse et efficace, peut être utilisée dans le but de prévenir ou réduire significativement la transmission du VIH par les voies génitales ou orale (AMD, 2012).

En effet, les microbicides ne tuent pas nécessairement le virus mais peuvent prévenir sa transmission (Lederman *et al.*, 2006). Ils peuvent également prévenir la transmission des MST dues au virus (tel que HSV) ou aux bactéries telles que (*Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis*) (Singh *et al.*, 2007).

Selon l'AMD (Alliance for Microbicide Development) on peut classer les microbicides anti-VIH en trois générations (Whaley *et al.*, 2010, AMD, 2012) (Figure 5) :

1^{ère} génération : Cette génération de substances microbicides est composée de tensio-actifs tels que le nonoxynol-9 (Van Damme *et al.*, 2002a,b, Hillier *et al.*, 2005, Fichorova *et al.*, 2001, Barnhart *et al.*, 2001) (testé dans la formulation COL-1492), le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) (Howett *et al.*, 1999, Haineault *et al.*, 2003) ou le C31G (Savvy[®]) (Mauck *et al.*, 2004a, Mauck *et al.*, 2004b). Ils agissent pour la plupart par détérioration de l'enveloppe et/ou de la membrane virale avant son contact avec la cellule hôte. Cependant, leur activité non spécifique et à large spectre est à l'origine d'une toxicité cellulaire et/ou tissulaire (Ballagh *et al.*, 2002, Hillier *et al.*, 2005). Actuellement, il n'existe plus de candidats microbicides en développement dans ce groupe

car il est difficile de les administrer à la dose efficace tout en évitant leur toxicité cellulaire ou tissulaire.

2^{ème} génération : elle comprend les formulations qui permettent de maintenir un pH acide (ces produits sont également appelés tampons acides), les inhibiteurs d'entrée et de fusion et les stimulants de défenses naturelles. Ce sont par exemple AcidformTM (solution de substances tampon acides) (Amaral *et al.*, 2006, Simoe *et al.*, 2006), le sulfate de cellulose (Scordi-Bello *et al.*, 2005, El-Sadr *et al.*, 2006), les carraghenanes (qui sont des polysaccharides sulfatés, CarraguardTM) (Perotti *et al.*, 2003), PRO 2000 (ou BufferGelTM, polymère d'acide acrylique à effet tampon) (Tabet *et al.*, 2003). Les inhibiteurs d'entrée et de fusion agissent par blocage de l'attachement, de la fusion et de l'entrée du virus dans les cellules hôtes. Leur mécanisme d'action est non spécifique et leur spectre d'activité est large. De nombreux échecs cliniques ont émaillé les résultats pourtant prometteurs donnés par ces substances. C'est le cas du PRO 2000 (Cohen., 2009), du sulfate de cellulose (Van Damme *et al.*, 2008) ou du Carraguard[®] (Skoler-Karpoff *et al.*, 2008). Les tampons acides et les stimulants des défenses naturelles aident à maintenir le pH physiologique du vagin face à l'effet alcalinisant du sperme. Il s'ensuit une inactivation des microbes pH-sensibles et un effet positif sur les défenses naturelles.

3^{ème} génération : cette génération est en plein essor avec le développement des substances biopharmaceutiques. Les substances biopharmaceutiques sont des protéines (lectines, défensines), des acides nucléiques (ADN, ARNi, oligonucléotides antisens), ou encore des virus ou des bactéries modifiés génétiquement (Medaglini *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2006). Cette génération regroupe également les microbicides à base d'antirétroviraux tels que les gels à base de ténofovir ou les anneaux vaginaux contenant de la dapivirine et les combinaisons multiples. Leur mécanisme d'action est spécifique et leur spectre d'activité est étroit pour certains (tenofovir,

(Férrir *et al.*, 2011), dapivirine ou TMC120 (Woolfson *et al.*, 2010), UC 781 (Damian *et al.*, 2010, Patton *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2005) et large pour d'autres (combinaisons multiples).

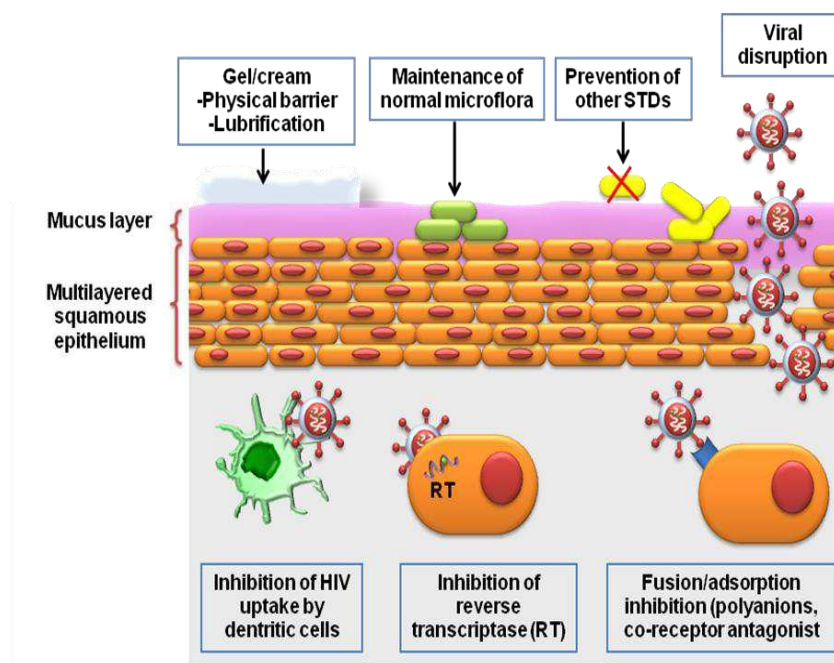


Figure 5 : Stratégies de prévention de la transmission de l'infection par le VIH par la voie vaginale.

Les substances microbicides ou Active Pharmaceutical Ingredient (API) ont par elles-mêmes un effet anti-VIH (Doncel & Clark., 2010). Actuellement, selon l'AVAC (2012) plus de 70 molécules microbicides sont en phase de développement. Le tableau 1 regroupe principalement des molécules de 2^{ème} et 3^{ème} génération. Dans ce tableau, nous avons choisi de classer les molécules par mécanisme d'action.

Tableau 1. Molécules microbicides actuellement en développement préclinique (adaptation du rapport fourni par l'Alliance pour le Développement des Microbicides, consulté en 2012).

Candidats microbicides en développement préclinique	Mécanisme d'action
Unipron	Stimulants des défenses vaginales
5P12-RANTES Actohivine C52L CADA (cyclotriazadsul fonamides) Cyanovirin-N (CV-N) CMPD 167 D-peptides DS001/L-860,167 DS003/BMS-599793 DS004/L-860,872 DS005/L-860,882 DS007/L'644 peptide EBd peptides Flavonoïdes (EGCG) Griffithsine ISIS 5320 K5-N, OS(H), K50SH LMBL 5 (lectines issue du lactobacille reconnaissant le mannose) Maraviroc Anticorps neutralisants Dendrimères PEHMB PIEv12 trimères PPCM (oligomère aryle polycarboxylé, poly ([1,4-phenylene-(1-carboxyl) méthylène]) PSC-RANTES RANTES REP 9C, REP 9AC Retrocyclines (RC101) sCD4-17b Single-chain ICAM Sodium rutine sulfate (SRS) Soluble DC-SIGN Syndecan TI249 Talactoferrine	Inhibiteurs d'attachement, de fusion et d'entrée
Dapivirine (inhibiteur non nucleosidique de la transcriptase réverse) Darunavir (inhibiteur de protéase) EFdA (inhibiteur nucleosidique de la transcriptase réverse) GS9160 (inhibiteur de l'intégrase) Lopinavir (inhibiteur de protéase) MIV-150 (inhibiteur non nucleosidique de la reverse transcriptase) Raltegravir (inhibiteur de l'intégrase) Ritonavir (inhibiteur de protéase) Saquinavir (inhibiteur de protéase) Ténofovir (inhibiteur analogue nucléotidique de la transcriptase réverse) UC781 (inhibiteur non nucleosidique de la transcriptase reverse)	Inhibiteurs de la réplication
Glycérol monolaurate	Immunomodulateurs
Dapavirine et DS Dapavirine et DS003 Dapavirine et maraviroc	Combinaisons multiples/ mécanismes multiples

Diterpène HHA, KR V 2110, T20 combinaisons KP1 KP17 LNG et MIV - 150 dans un anneau vaginal mapp 66 (combinaison d'anti-CCR5 et antiHSV anticorps) Maraviroc et ténofovir MIV-150, zinc acétate et carraghénane (carraghénane est un excipient) NCp7 thioester (SAMTs) Nisine Novasomes Opuntia spp (Osp) Pyrimidinedionnes Pyrimidinedionnes et ISIS 5320 siRNA SJ 3991 UC781 et PK17 UC 781 et progestine UC 781 et tenofovir x-REPLAB Acétate de zinc et MIV-150 dans un anneau vaginal Dérivé du Zinc tétra-ascorbo-camphorate (C14)	
Basant C5A (virucide) Acétate de zinc et carraghénane (carraghénane est un excipient) Zinc	Mécanismes nouveaux et non caractérisés

Les antirétroviraux et notamment les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase reverse grâce à leur activité antivirale élevée et leur toxicité limitée sont intéressants à envisager pour la formulation de microbicides topiques (Van Herrewege *et al.*, 2007b). Cependant, le risque d'exacerbation de la résistance aux antirétroviraux du fait de l'exposition de l'organisme à de telles molécules pour la prévention orale n'est pas à négliger (Omar & Bergeron, 2011, Omar & Bergeron, 2010, Rossi, 2010).

Il apparaît clairement que les substances microbicides les plus prometteuses sont celles qui ciblent uniquement le virus plutôt que les substances agissant de manière apécifique ou au mieux peu spécifique (Lederman *et al.*, 2006).

Synthétiser de nouvelles molécules à activité plus spécifique semble être une bonne alternative pour limiter la transmission par le VIH (Van Herrewege *et al.*, 2007). Ainsi, les nouvelles perspectives de recherche en la matière s'axent sur les substances de nature protéique, glycoprotéique ou complexe. Grâce aux progrès considérables des techniques de bioingénierie et

de biotechnologie, la fabrication de ces molécules à partir de bactéries et de levures ou des plantes a été rendue plus accessible (Whaley *et al.*, 2010, AMD, 2012, Rohan & Sassi, 2009). La cyanovirine (Keeffe *et al.*, 2011), les anticorps, la griffithsine (Emau *et al.*, 2007), le RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted, chemokine utilisée par les lymphocytes mémoire, également appelé CCL5) (Veazey *et al.*, 2009) de même que les siRNA (Palliser *et al.*, 2006) ou les lactobacillus génétiquement modifiés (Liu *et al.*, 2006) sont différents exemples de substances complexes possédant des propriétés anti-VIH et actuellement en développement préclinique par différentes voies d'administration.

Vita *et al.*, (1999) ont montré la similitude de structure entre une toxine provenant du dard d'un petit scorpion (la scyllatoxine) et la région du récepteur CD4 qui interagit avec la gp 120 du virus. Ainsi, la liaison entre l'épitope CD4 et la gp 120 lors de l'attachement du virus a été modélisée à partir de cette toxine. Ces chercheurs ont ainsi ouvert la voie à la mise au point de miniprotéines mimant ces interactions telles que le peptide CD4M9. Celles-ci ont pour objectif d'empêcher le contact entre les lymphocytes CD4 et le virus. Cette approche a été reprise dans des travaux visant à la formulation d'un peptide immunogène pouvant entrer dans la conception d'un vaccin anti-VIH. Ces études ont permis de caractériser, de purifier et de montrer l'aptitude d'une glycoprotéine, la o-gp 140 SF162ΔV2 provenant d'un isolat de VIH-1 modifié, à induire une réponse immunologique efficace (Srivastava *et al.*, 2003). La combinaison de ces miniprotéines à la gp120 virale par des liaisons covalentes donne des résultats prometteurs pour la recherche vaccinale (Martin *et al.*, 2011, Dey *et al.*, 2012)

De nombreux autres peptides ont pu ainsi voir le jour. Martin *et al.*, (2003) ont synthétisé et caractérisé le peptide CD4M33 en s'inspirant du peptide CD4M9 (28 acides aminés) comme modèle structural. La différence entre les deux structures réside dans le remplacement de trois acides aminés du CD4M9. Le CD4M33 (Figure 6) présente une grande affinité de liaison avec la gp120 (proche de celle du CD4). Par la technique de dosage d'immunosorption liée à une enzyme

couramment appelée technique ELISA, il a été démontré que cette molécule inhibait de façon spécifique l'interaction entre les lymphocytes CD4 et deux types de gp120 (la gp120_{HXB2} et le gp120_{JRFL}).

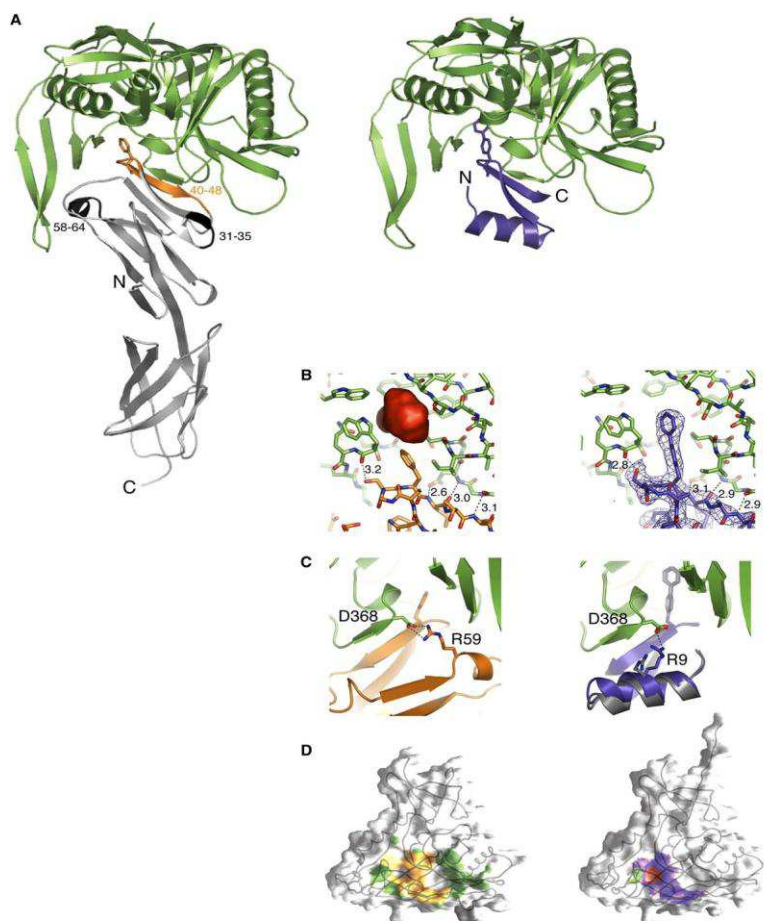


Figure 6 : Modélisation du peptide CD4 mimétique (en violet) : CD4 mimic M33 (en gris CD4) (Huang *et al.*, 2005). **(A)** Ribbon diagrams of core YU2 gp120 (green) are shown binding to CD4 (left) and CD4M33 (right). In this orientation, the four-stranded bridging sheet of gp120 is positioned directly to the left of CD4, the inner domain is positioned above it, and the outer domain is positioned to the right. CD4M33 is shown in purple, and CD4 is shown in gray, except for the three main regions that contribute to binding, which are colored orange-yellow (residues 40–48) and black (residues 31–35 and 58–64). **(B)** Close-up view of the CD4-gp120 “hotspot.” The orientation and colors are the same as in (A), except that oxygen atoms are colored red and nitrogen atoms are colored blue. The unusual interfacial cavity (red) between

CD4 and gp120 is shown in the left panel. The right panel shows the biphenyl side chain of CD4M33 reaching into the heart of gp120. Density ($F_o - F_c$; 3σ ; purple) is shown from a simulated annealing omit map in which the entire CD4M33 had been removed. Distances (\AA) are shown for four hydrogen bonds.

La mise en évidence des interactions de la gp120 avec le lymphocyte CD4 a été réalisée par la technique de résonance plasmonique de surface (Biacore) dans HBS (HEPES-tampon salin, 3 mmol/L EDTA, 0,05 % de tensioactifs Biacore à pH 7,4). Stricher *et al.*, (2005) (Stricher, 2004) ont décrit une méthode d'analyse de l'interaction gp-120/CD4 par couplage du CD4M33 à un marqueur fluorescent en utilisant un dérivé fluorescent : le [Phe²³] M33. Les essais réalisés se font en solution et sont simples, rapides, sensibles et reproductibles.

La structure du CD4M33 (2,4 kDa) lui permet d'être stable même dans les conditions les plus dénaturantes : pH acide (3,5), températures élevées (90 °C), concentration élevée de chlorure de guanidinium 4 mol/L et d'être plus résistant que les lymphocytes CD4 qui se dégradent en présence d'enzymes corporelles telles que les protéases. De plus, ce peptide limite le risque de réaction autoimmune car il possède peu d'épitopes communs avec les CD4 humains. (Martin *et al.*, 2003)

Cependant, la biodisponibilité de ce peptide par voie orale est réduite, limitant l'administration aux voies parentérales, notamment la voie sous-cutanée ou la voie intraveineuse. Ceci peut entraîner des coûts de traitement beaucoup plus élevés et constituer une limite à l'accès au médicament. Surtout, ces voies d'administration sont inenvisageables dans le cadre de traitements préventifs. Il paraît en revanche beaucoup plus rationnel d'utiliser ces peptides dans des formulations microbicides destinées soit à la voie vaginale soit à la voie rectale et qui peuvent être appliquées lors des rapports sexuels afin de prévenir l'infection par le VIH (Stricher *et al.*, 2005). Plusieurs autres miniCD4 sont considérés comme prometteurs, notamment le CD4M47, le CD4M48 ou M48U1, le CD4M64 ou M64U1 (Figure 7) (Van Herrewege *et al.*, 2007b) et peu immunogènes (Martin *et al.*, 2011).

M48U1 : TpaNLHFCQLRCKSLGLLGRCApTU1CACV

M64U1-SH : TpaNL (K-Tpa) WCQKRCKSLGLLGRCApTU1CACV

M64U1(Biot)-SH : TpaNL (K-Tpa) WCQKRC (K-Biot) SLGLLGRCApTU1CACV.

Figure 7 : Séquences de divers peptides CD4 mimétique.

Biot =biotine; Tpa = 3-mercaptopropanoyl (-COCH₂CH₂SH); dP =D-proline, et U1 = p-(cyclohexylmethoxy) phenylalanine (Martin et al., 2011).

Lors d'une étude menée par Van Herrewege *et al.*, (2007b) , le M48 U1 a présenté *in vitro* une activité très élevée sur le VIH-1 sous-type B et sur des pseudovirus HIV-1 à tropisme CCR5 et CXCR4 avec une CE₅₀ (CE=concentration efficace) de 2nM. Une concentration de 66 nM de ce peptide est suffisante pour empêcher la réplication du virus et aucune toxicité n'a pu être décelée aux doses étudiées.

Une autre miniprotéine couplée à un sucre, la miniCD4-HS (Figure 6), a été également été synthétisée rendant encore plus précoce l'activité préventive vis-à-vis de l'infection (Baleux *et al.*, 2009).

Cependant, quel que soit le principe actif ciblant le virus, l'efficacité d'une formulation microbicide est également conditionnée par les caractéristiques même de la formulation, en particulier son aptitude à tapisser l'épithélium vaginal et à se maintenir à ce niveau suffisamment longtemps afin de former une « barrière » chimique et physique capable d'interdire ou au moins limiter le plus possible l'interaction du VIH avec la muqueuse vaginale.

4.2. Comment formuler efficacement un microbicide pour la voie vaginale ?

Une formulation microbicide doit évidemment être formulée de façon appropriée à la voie vaginale. Elle doit être peu coûteuse, incolore, inodore, insipide, contraceptive ou non, facile à utiliser, pouvant permettre divers modes d'utilisation et ne pas gêner le plaisir sexuel (Buckheit *et al.*, 2010).

Les formes pharmaceutiques destinées à la voie vaginale sont diverses : liquides (solutions, émulsions et suspensions vaginales), semi-solides (crèmes, pommades et gels) (Prista *et al.*, 1996, Vermani & Garg, 2000) ou solides (ovules, comprimés vaginaux, capsules vaginales, films vaginaux). A ces formes pharmaceutiques s'ajoutent des dispositifs tels que les anneaux vaginaux. Ces derniers, ainsi que les formes semi-solides sont très utilisés dans les études récentes de formulations microbicides topiques. Les anneaux vaginaux contrairement aux formes semi-solides destinées à tapisser la muqueuse vaginale sont positionnés à un endroit précis notamment dans le tiers supérieur du vagin (particulièrement sensible à l'infection) proche de la jonction cervico-vaginale. Ils sont sensés libérer le principe actif de manière contrôlée et durant une longue période (pouvant aller jusqu'à plusieurs mois) dans la lumière vaginale. Les anneaux vaginaux sont généralement constitués d'une matrice polymérique (silicone, matières thermoplastique...) contenant des substances médicamenteuses (Malcolm *et al.*, 2010). Garg *et al.*, (2010) ont relevé les avancées récentes en ce qui concerne les candidats microbicides anti-VIH qu'ils ont distingués comme coïto-dépendants (administrés avant et/ou après le rapport sexuel) tels que les gels, les crèmes ou les comprimés vaginaux et non coïto-dépendants (films, anneaux vaginaux). Selon leur nature, le développement de ces formulations devra également prendre en compte les nécessités du scale-up, de l'évaluation clinique et de leur enregistrement dans le cadre des directives réglementaires.

Ndesendo *et al.*, (2008) ont classé les formulations microbicides topiques anti-VIH pour la voie vaginale en trois groupes selon la nature et le mode d'action des molécules apportant l'activité anti-HIV:

- Les composés polymériques anioniques qui possèdent une activité de prévention de l'infection par le VIH-1 sans avoir besoin de rajouter un principe actif. Il s'agit notamment des carraghenanes (polysaccharides extraits d'algues rouges) (Elias *et al.*, 1997, Skoler-Karpoff *et al.*, 2008), du polycarbophile (Van Damne *et al.*, 2002), de la cellulose acétate phtalate (Huang *et al.*, 2012), de l'acide polyacrylique (Dey *et al.*, 2012), du dextrane sulfate (Bakobaki *et al.*, 2005)... Ils sont censés se lier aux groupements chargés positivement à la surface du virus (Pilcher., 2004). Dans ce groupe, certains polymères donnent des gels thermoréversibles qui tapissent aisément la muqueuse vaginale et présentent de bonnes propriétés adhésives. Les gels à base de polysaccharides montrent une bonne biocompatibilité et sont biodégradables (D'Cruz *et al.*, 2004). Ces polymères anioniques peuvent être associés à des molécules qui présentent des activités anti-VIH telles que le nonoxynol-9. C'est le cas par exemple du gel COL-1492 à base de polycarbophile contenant du nonoxynol-9 dont l'efficacité a été testée par Van Damne *et al.*, (2002). Ce gel, à l'instar des formulations à base de polymères anioniques en général, n'a pas montré d'effet protecteur contre la transmission du VIH (Pirrone *et al.*, 2011).
- Les composés non polymériques : ce sont notamment les analogues nucléosidiques (tenofovir), des protéines (cyanovirine), ou encore des analogues non nucléosidiques de la reverse transcriptase (UC 781). Ceux-ci doivent évidemment être introduits au sein de formulations en vue de leur utilisation. Ainsi, une formulation semi-solide à base d'hydroxy éthylcellulose (HEC) contenant une combinaison de cetyl betaine et de myristamine oxyde (C31G) a montré un large spectre antimicrobien et spermicide et fait l'objet d'une étude clinique de phase III (Harrison *et al.*, 2003, AMD, 2012). La dapavirine

(TMC 120) est testée dans des anneaux vaginaux afin de permettre sa libération prolongée et améliorer ainsi l'observance au traitement (Woolfson *et al.*, 2006).

- Les autres composés tels que : les dendrimères porteurs de charges électriques négatives (Bernstein *et al.*, 2003, Bourne *et al.*, 2000 ; McCarthy *et al.*, 2005), le lauryl sulfate de sodium (Roy *et al.*, 2001), la thiourée. Des études cliniques en Phase I ont montré que VivaGel™, un gel microbicide contenant 3 % m/m de SPL7013 (fabriqué par Starpharma Pty.Ltd) un sel sodique d'un dendrimère sulfonate ne présentait pas de risque et était bien toléré. Il s'agit d'un dendrimère polyanionique ($M_m = 16,581$ Da) synthétisé à partir d'une molécule divalente, la benzhydrylamine amide de L-lysine sur laquelle on peut additionner plusieurs des molécules de L-lysine (jusqu'à 4 générations) pour obtenir une molécule finale exposant jusqu'à 32 groupements amine à la surface (Mumper *et al.*, 2009).

Récemment, une approche consistant à encapsuler les substances actives dans des nanoparticules a été proposée (Whaley *et al.*, 2010). Cette stratégie permettrait de diminuer un effet toxique éventuel du principe actif tout en favorisant le ciblage du site d'action. De plus, il serait plus aisé d'administrer des molécules fragiles en utilisant les nanoparticules. Des nanoparticules destinées à inclure des principes actifs ayant une activité anti-VIH sont en cours d'étude. L'objectif étant qu'elles parviennent à franchir la barrière physiologique constituée par la couche de mucus cervico-vaginal de sorte à atteindre les cibles au niveau épithélial. Toutefois, leur capacité à atteindre l'épithélium vaginal et/ou de diffuser localement dedans pourrait constituer une limite à ce concept. En effet, il a été démontré que des nanoparticules de polystyrène non-chargées en principe actif étaient capables de diffuser à travers la barrière physique constituée par le mucus vaginal (Tang *et al.*, 2009, Lai *et al.*, 2008, Lai *et al.*, 2007). Cependant, cette diffusion est certainement moindre que celle de molécules de petite taille en solution. Toutefois, la modulation de la surface des particules par des techniques telles que la pégylation a permis d'améliorer leur capacité de diffusion à travers le mucus.

Enfin, les formes semi-solides notamment les gels sont largement utilisés dans le développement des microbicides topiques anti-VIH (Garg *et al.*, 2010). Ces formes sont passées en revue dans le paragraphe suivant.

4.2.1. Gels pharmaceutiques couramment utilisés

Les gels à usage pharmaceutique les plus utilisés contiennent des polymères hydrophiles à l'origine de la gélification. Grâce à leur forte teneur en eau, ces préparations sont surtout destinées à être appliquées sur les muqueuses (orale, nasale, ophtalmique, rectale ou vaginale) ou sur la peau pour un usage cosmétique ou thérapeutique.

Les gels pharmaceutiques sont constitués de polymères naturels, notamment certaines protéines (collagène, gélatine) et polysaccharides (alginates, carraghénanes, gomme guar), ou de polymères semi-synthétiques (carboxyméthylcellulose, hydroxypropyl méthylcellulose) ou synthétiques (carbomer, pluronic) ou encore de substances inorganiques (hydroxyde d'aluminium, bentonite, laponite) (Offner & Kleth-Gelotte, 2002).

Les propriétés suivantes sont généralement recherchées pour les gels pharmaceutiques : stabilité en milieu acide, adhérence, non liquéfaction à la température corporelle, dissolution lente, caractère lubrifiant, toucher non gras, non irritant (Offner & Kleth-Gelotte, 2002). Lorsqu'ils sont formulés pour la voie vaginale, d'autres éléments doivent également être pris en compte. Il s'agit notamment du maintien d'un pH optimal pour l'épithélium vaginal, de la facilité d'application afin d'obtenir une distribution homogène du principe actif, de la rétention dans le vagin, et de la compatibilité avec d'autres substances co-administrées (Chien & Lee, 2002).

De manière à satisfaire ces exigences, les formulations gélifiées associent de plus en plus souvent des polymères ayant des propriétés diverses et adaptées à l'application vaginale.

Les formulations topiques vaginales gélifiées, hormis le principe actif et l'agent gélifiant, sont composées en grande partie d'eau (entre 70 à 99 % en masse) et contiennent en quantité variable des excipients qui possèdent notamment les propriétés suivantes :

- hydratant, émollient, lubrifiant (ex : glycérol, poly(éthylène glycol)...);
- conservateurs : il s'agit le plus souvent de parabènes (ex : p-hydroxybenzoate de propyle ou propylparaben [E216], p-hydroxybenzoate d'éthyle sodique ou éthylparaben sodique [E215]...); Ces substances sont actuellement en passe d'être interdites d'emploi et leur remplacement doit donc être envisagé.
- Eventuellement, on peut ajouter des ajusteurs de pH (ex : phosphate de potassium dibasique...); d'osmolalité (ex : phosphate de sodium monobasique...); des antioxydants (ex : EDTA [acide éthylène diamine tétraacétique] sous sa forme disodique...).

Les avantages des hydrogels par rapport à d'autres formulations sont que leur réalisation est aisée et à un faible coût de production. Les hydrogels sont généralement incolores, inodores, insipides, utilisables de façon combinée avec des dispositifs vaginaux ou des préservatifs (Pilcher, 2004, Garg *et al.*, 2010). En effet, selon une estimation du London School of Hygiene and Tropical Medicine, un gel microbicide efficace à 60 % permettrait d'éviter 2,5 millions nouvelles infections sur 3 ans. Cela reviendrait à économiser 2,7 milliards de \$US (Pilcher., 2004). Cependant, au plan pratique, les sensations d'inconfort, les fuites, l'effet salissant sont des inconvénients à prendre en considération, de même que la nécessité de l'utilisation d'un applicateur pour l'administration (Hussain & Ahsan, 2005, Garg *et al.*, 2010).

Au plan de leur efficacité, le problème le plus important présenté par ces formes est certainement leur faible rémanence à la surface épithéliale et leur détachement rapide du site d'application (Garg & Vermani, 2000, Garg *et al.*, 2003, Holt *et al.*, 2006). Afin de pallier à cela, des polymères

mucoadhésifs sont souvent rajoutés aux formulations permettant ainsi d'immobiliser le gel le plus longtemps possible au niveau de la muqueuse vaginale (Justin-Temu *et al.*, 2004).

C'est pour cette raison que les gels thermosensibles et mucoadhésifs sont une forme pharmaceutique très intéressante pour la prévention de la transmission du VIH par voie vaginale car ils peuvent présenter la propriété d'être liquides à faible température ce qui facilite le tapissage de la muqueuse et de passer dans un état semi-solide à la température du corps, ce qui facilite leur rémanence.

Dans le paragraphe ci-dessous, nous traiterons d'une façon générale les hydrogels à base de polymères thermosensibles et/ou mucoadhésifs utilisés pour la voie vaginale. Ces gels peuvent avoir une activité antiparasitaire, antibactérienne, antifongique ou antivirale. Très peu de travaux ont directement concerné les gels thermosensibles et mucoadhésifs destinés à limiter la transmission du VIH.

4.2.2. Hydrogels à base de polymères mucoadhésifs

Mucoadhésion et polymères mucoadhésifs

La bioadhésion peut être définie comme l'état dans lequel deux matériaux, dont l'un d'entre eux est de nature biologique, sont maintenus ensemble par des forces interfaciales pendant un certain temps. Lorsque ce phénomène est dû au revêtement de mucus on parle de mucoadhésion (Meignant *et al.*, 1999). Pendant longtemps, la biodisponibilité de nombreux principes actifs n'était pas optimale du fait que ce phénomène n'était pas pris en compte. Ponchel *et al.*, (1997, 1998) ont conçu des formulations destinées à la voie orale avec des polymères mucoadhésifs permettant de prolonger le temps de résidence des principes actifs à la surface de la muqueuse gastro-intestinale. La muqueuse vaginale est également favorable à ce phénomène car elle est revêtue d'une fine couche de mucus.

Afin d'expliquer le phénomène de mucoadhésion, la théorie d'interpénétration est la plus largement évoquée (Das Neves & Bahia, 2006) (Figure 8). La mucoadhésion se déroule en trois étapes principales :

(i) création d'un contact entre la forme pharmaceutique et la muqueuse ;

(ii) interpénétration des chaînes polymère avec les glycoprotéines du mucus ;

(iii) adhésion par développement d'interactions chimiques faibles entre les chaînes de polymères et les glycoprotéines constitutives de la couche de mucus et/ou à la surface des cellules épithéliales.

La profondeur de l'interpénétration dépend du coefficient de diffusion des chaînes polymères et du temps de contact ; elle influence la force des liaisons adhésives (Smart, 2005). Dans le cas des gels, ce sont les extrémités des chaînes et la faible masse molaire qui contribuent au phénomène d'interpénétration. Une mouillabilité adéquate est évidemment un préalable indispensable à l'obtention d'une bonne adhésion (Huang *et al.*, 2000, Edsman & Hagerstrom, 2005).

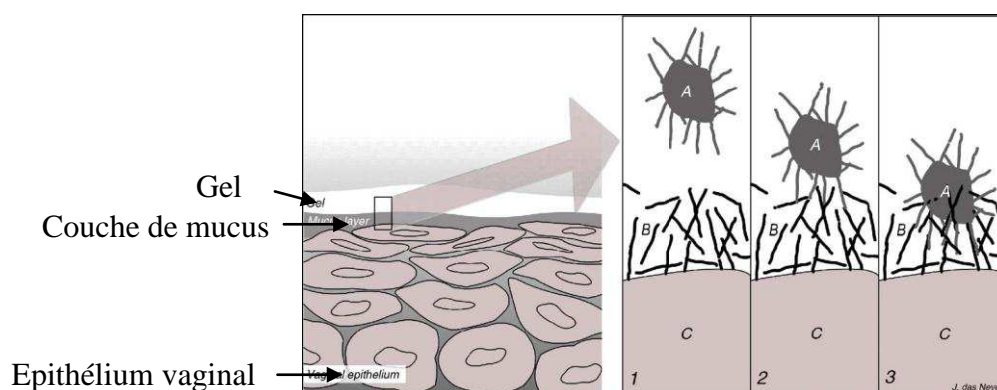


Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de la théorie d'interpénétration. (1) Chaînes de polymères s'approchant de la couche de mucus. (2) Interpénétration des chaînes de polymère et de mucine. (3) consolidation des forces d'adhésion. (A : polymère ; B : couche de mucus ; C : cellule épithéliale).

Toutefois, la résistance de la liaison adhésive dépend aussi considérablement des capacités de déformation de l'hydrogel muco-adhésif qui se forme à l'interface entre la formulation muco-adhésive et le tissu sur lequel se produit l'adhésion. Ainsi, les caractéristiques rhéologiques des uns et des autres ont également une très grande incidence sur l'intensité de l'adhésion.

La mucoadhésion peut être obtenue aussi bien à partir de polymères synthétiques que de polymères naturels (Tableau 2). Actuellement, les polymères synthétiques les plus utilisés sont de type polyacrylates (polymères d'acide acrylique).

L'acide polyacrylique (également appelé PAA ou carbomer ou Carbopol[®]) est un polymère bio-adhésif de masse molaire élevée, connu pour son adhésion aux cellules muqueuses hydratées des yeux, du nez, des poumons, du tractus gastro-intestinal et du vagin (Dittgen *et al.*, 1997). Il est très utilisé dans plusieurs formulations mises sur le marché pour la voie vaginale. On le retrouve par exemple dans les spécialités suivantes : Rozagel[®] et Rozex[®] qui sont des gels antibactériens contenant du métronidazole associé à du Carbopol[®] 940 pour le premier et du Carbopol[®] 980 pour le second ; Replens[®] un hydratant vaginal composé de polycarbophile et de Carbopol[®] 974P (OMS/VIDAL/AFSSAPS, Das Neves & Bahia., 2006). Le PAA est également très utilisé dans les formulations microbicides développées pour la prévention de la transmission par le VIH. Ce fut notamment le cas du PRO2000 ou BufferGel[®] à base de Carbopol[®] 974P et du VivaGel[®], un gel à base de Carbopol[®] 971P et de SPL7013 (Mumper *et al.*, 2009).

Les polymères de l'acide acrylique (PAA) sont sensibles au pH. En effet, ils s'ionisent en fonction des variations de pH ; et lorsque celui-ci augmente au dessus du pKa des groupements carboxyliques, ils gélifient (Jeong *et al.*, 2006).

Récemment, les polymères thiolés ont montré un meilleur temps d'adhésion et un travail d'adhésion plus important que les polymères les plus fréquemment utilisés grâce à la formation de liaisons disulfures avec la mucine (Grabovac *et al.*, 2005). Valenta *et al.*, (2001) ont utilisé un

polymère thiolé pour la libération de progestérone par voie vaginale (Carbopol[®] 974P/Cystéine). Les propriétés mucoadhésives du système sont améliorées par les interactions des groupements thiols de la cystéine avec la couche de mucus.

D'autres polymères tels que le chitosane, le carraghénane ou l'alginate de sodium présentent un intérêt accru depuis quelques temps du fait de l'obtention relativement récente de l'agrément d'utilisation pharmaceutique (Valenta, 2005). Par définition, les excipients choisis parmi ces matériaux sont connus pour être pharmaco-toxicologiquement inertes (Pifferi & Restani, 2003).

Tableau 2 : Exemples de polymères utilisés dans les formulations de gels pour la voie vaginale.

Polymères mucoadhésifs	Référence
Carraghénanes	Skoler-Karpoff <i>et al.</i> , 2008 ; Perroti <i>et al.</i> , 2003
Carbopol [®] ou PAA ou carbomer	Mumper <i>et al.</i> , 2009 ; Pavelic <i>et al.</i> , 2005
Gélatine	Meignant <i>et al.</i> , 1999
Chitosane	Sandri <i>et al.</i> , 2004 ; Kim <i>et al.</i> , 2003
Carboxy-méthylcellulose (CMC)	Smart <i>et al.</i> , 1984 ; Genc <i>et al.</i> , 2000
Hydroxy-éthylcellulose (HEC)	Gupta <i>et al.</i> , 2012 ; Ballagh S.A <i>et al.</i> , 2002
Hydroxy-propylcellulose (HPC)	Valenta, 2004, Wang & Lee, 2004
Hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC)	Aka Any-Grah <i>et al.</i> , 2010
Méthylcellulose (MC)	Gordon-Wright & Elder, 1979
Polycarbofile (PC)	Chang <i>et al.</i> , 2002a, Kieweg & Katz, 2007
Pectine et traganth	Bombart, 1994
Acide hyaluronique	Richardson & Trever, 1999; Baldacci, 1997
Polysaccharides sulfatés	Witvrouw & Declerq, 1997; Zaneveld <i>et al.</i> , 2002
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	Jones <i>et al.</i> , 2003
Alginate de sodium	Offner & Kleth-Gelotte, 2002
Amidon	Offner & Kleth-Gelotte, 2002

Les gels à base de polymères muco-adhésifs composés d'acide polyacrylique et d'hydroxypropyl-méthylcellulose (HPMC) ont montré une bonne aptitude en tant que système microbicide par voie vaginale (Wang *et al.*, 2002). De nombreuses autres formulations microbicides à base de polymères mucoadhésifs associés à d'autres polymères ont montré de bons résultats. C'est le cas par exemple de gels contenant :

- (i) De la carboxyméthylcellulose associée à de la polyvinylpyrrolidone (Neyts *et al.*, 2000 ; Thormar *et al.*, 1999);
- (ii) Du Carbopol[®] associé au SPL7013 (dendrimère) (Mumper *et al.*, 2009).

Toutefois, le polymère le plus utilisé actuellement pour formuler des gels microbicides est l'HEC. Ainsi, des substances telles que le nonoxynol-9, la C 31G ont été formulées dans des gels à base d'HEC et ont été évaluées dans le cadre d'essais cliniques.

4.2.3. Hydrogels à base de polymères thermogélifiants

Certains hydrogels peuvent réagir aux changements de leur environnement notamment, la température, le pH et la présence de sels. On les appelle hydrogels environnement-sensibles, hydrogels « intelligents » ou « smart »hydrogels (Jeong *et al.*, 2006). Les formulations qui sont capables de gélifier en réponse au changement de température comme par exemple lors de l'administration de la formulation sont appelés systèmes thermogélifiants (Ruel-Gariépy & Leroux, 2004, Klouda & Mikos., 2008). Certains sont liquides à température élevée et gélifient à basse température, d'autre ont un comportement inverse. La plupart des polymères naturels gélifient à basse température et forment tous des gels dans l'eau plutôt que dans des solvants organiques. Ce sont par exemple la gélatine (protéine issue de l'hydrolyse partielle du collagène), l'agarose ou les carraghénanes (polysaccharides provenant d'une algue rouge). Quant à ceux qui gélifient à haute température, ils sont caractérisés par leur LCST ou « Lower Critical Solution Température » en dessous de laquelle ils sont liquides et au-dessus de laquelle ils changent

brusquement de phase et forment un « cristal solide » (gélification) (Jeong *et al.*, 2006, Ruel-Gariépy & Leroux, 2004). Il est utile de rappeler que la valeur de la LCST est proche de la température de gélification (T_{gel}).

Les systèmes thermogélifiants qui sont sous forme liquide à une température inférieure à 37 °C sont particulièrement intéressants. En effet, leur administration sous forme liquide permet l'étalement de la formulation qui gélifie par la suite à une température proche de 37 °C, après administration (Chang *et al.*, 2002a,b, Koffi *et al.*, 2006). Les polymères qui sont liquides à haute température et gélifient à faible température tels que la gélatine, l'agar-agar ou les carraghénanes ne seront pas traités dans ce manuscrit. Les systèmes thermogélifiants in situ à base de solution aqueuse ou hydrogels peuvent être classifiés de la manière suivante.

Dérivés de la cellulose

La cellulose n'étant pas soluble dans l'eau, l'addition de groupements hydrophiles à sa structure donne naissance à des dérivés semi-synthétiques solubles. La transition sol-gel est fonction du degré de substitution en groupements hydroxyles (Jeong *et al.*, 2002). Les dérivés de la cellulose les plus utilisés sont, l'hydroxy éthylcellulose (HEC), la méthylcellulose (MC), l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC), l'éthylhydroxy éthylcellulose (EHEC) et le xyloglucane (Kawasaki *et al.*, 1999, Miyazaki *et al.*, 2001, Takahashi *et al.*, 2002). Dans les systèmes à base de dérivés de cellulose, la gélification est provoquée par la diminution ou par l'augmentation de la température. Parmi ceux dont la gélification résulte d'une augmentation de la température ont distingué la méthylcellulose et l'hydroxypropyl méthylcellulose (Ruel-Gariépy & Leroux, 2004). Dans ce dernier cas l'augmentation de la température entraîne une diminution de l'hydratation des chaînes de polymères et favorise la formation de liaisons polymère-polymère. Ainsi, à des concentrations de 1 à 10 % la méthylcellulose donne un gel entre 40 et 50 °C tandis que l'hydroxypropyl méthylcellulose donne à ces mêmes concentrations un gel à des températures allant de 75 à 90 °C

(Heymann, 1935, Sarkar, 1979) ce qui ne présente pas d'intérêt pour nous car la gélification se fait à des températures très éloignées des températures physiologiques. D'autres polymères tels que l'éthylhydroxy éthylcellulose dont la viscosité baisse avec l'augmentation de la température nécessitent la présence d'agents tensioactifs (tels que le sodium dodécylsulfate ou le bromure de cetyltri ammonium) afin d'améliorer leurs propriétés thermogélifiantes. Dans ces conditions ils donnent des gels à des températures de 30 à 40 °C pour des concentrations de 1 à 4 % en masse (Carlson *et al.*, 1990, 1988).

Chitosane associé aux sels de polyols

Le chitosane est un dérivé polysaccharidique naturel obtenu par désacétylation de la chitine qui est le principal constituant du cytosquelette des crustacés. C'est un polymère cationique, biocompatible qui présente des propriétés pH sensibles et est soluble dans l'eau lorsque son pH est inférieur ou égal à 6,2. Sa basification au dessus de cette valeur entraîne la formation d'un précipité sous forme de gel. Les propriétés pH sensibles du chitosane (polymère cationique) sont transformées en propriétés thermosensibles par addition de sels de polyols (β -glycérophosphate). On obtient des systèmes de pH neutre, liquides à température ambiante et qui forment des gels monolithiques à la température du corps. En effet, la perte d'eau par augmentation de la température entraîne une baisse de l'hydratation des chaînes de polymères. Ceci favorise la formation de liaisons entre les chaînes et l'enclenchement du processus de gélification. Les gels à base de chitosane modifié chimiquement sont obtenus à 37 °C à faibles concentrations de polymères (~2 % en masse) (Ruel-Gariépy *et al.*, 2000).

Les copolymères de N-isopropylacrylamide

Les polymères de poly (*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) sont des polymères synthétiques non-biodégradables qui présentent une LCST proche de 32 °C dans l'eau (He *et al.*, 2008, Ruel-Gariépy et Leroux, 2004). Ces solutions de copolymères présentent des viscosités faibles à

modérées en dessous de la température de gélification. Elles donnent des gels résistants et élastiques, et présentent une rapide cinétique de gélification après augmentation de la température (Klouda & Mikos., 2008). Leur copolymérisation est en plein essor et présente des avantages considérables (Qiu & Bae., 2006, Klouda & Mikos., 2008).

Poly (éthylène oxyde)/poly (D, L-acide lactique-co-acide glycolique) PEO/PLGA

Des systèmes biodégradables basés sur des solutions de copolymères synthétiques de polyéthylène oxyde et polyacide lactique décrits par Jeong *et al.*, (1997, 2006) sont liquides à température élevée (45 °C) et donnent des gels à la température corporelle. Cependant, la nécessité de chauffer le système pour qu'il devienne liquide limite la nature des principes actifs incorporables et rend les procédures d'injection difficiles puisqu'elles se font à température ambiante lorsque ces systèmes sont sous forme de gels. Plus tard, (Jeong *et al.*, 1999, 2000, 2002, Lee *et al.*, 2001) des solutions tri blocs de copolymères (POE-PLGA-POE) capables de former à température ambiante une solution qui donne un gel transparent à 37 °C ont été formulées. Ces gels se forment par accroissement du diamètre des micelles et agrégation de celles-ci. Ils présentent une concentration critique de gélification de 16 % en masse à 40 °C et donnent un gel transparent à une concentration de 33 % en masse à 30 °C. Ces gels ne s'érodent pas rapidement et sont dégradables *in vivo* grâce aux segments de PLGA. De plus, ils ne sont pas toxiques (Jeong *et al.*, 1997, 2002). Les propriétés thermosensibles dépendent des proportions en PLGA et en PEO.

Les gels à base de poloxamer (ICI) ou pluronic(BASF)

Les poloxamers (Pluronic[®], Lutrol[®]) sont des copolymères synthétiques tribloc de type A-B-A composés d'unités de polyoxyde d'éthylène (POE ou PEG = Polyéthylène glycol) et de polyoxyde de propylène (POP), soit une structure de type : POE-POP-POE (Figure 9). Les solutions aqueuses concentrées de pluronics donnent des gels thermoréversibles à des températures élevées. Les gels de pluronics prolongent le temps de résidence au site d'application ce qui améliore la

biodisponibilité et l'efficacité du principe actif (Katakam *et al.*, 1997, Wenzel *et al.*, 2002, Al-Tahami & Singh., 2007). Johnston & Miller (1985) ont démontré une toxicité limitée par la voie intramusculaire. Ils sont largement utilisés dans diverses applications notamment destinées aux voies ophtalmique, nasale, vaginale, rectale, auriculaire, dentaire, buccale et cutanée.

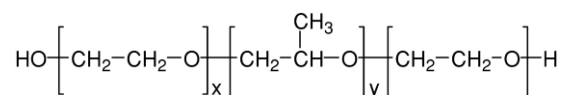


Figure 9 : Formule chimique générale des pluronics.

Le pluronic F127 est particulièrement intéressant car il est le moins toxique et gélifie à des températures proches des températures physiologiques (Al-Tahami & Singh., 2007, Wasan *et al.*, 2003). Cette température de gélification peut être modulée soit en modifiant la concentration du pluronic F127 dans l'eau, en mélangeant avec un autre pluronic, le F68 ou en rajoutant des additifs tels que des sels ou le propanediol (Koffi *et al.*, 2006, Bouchemal *et al.*, 2009, Dumortier *et al.*, 2006).

Il est possible de greffer chimiquement un polymère mucoadhésif au pluronic (Bromberg *et al.*, 2004 ; Cho *et al.*, 2003) c'est le cas par exemple des copolymères greffés chimiquement de type pluronic-acide polyacrylique (pluronic-g-PAA) qui présentent à pH 7,4 une température de gélification proche de 32 °C. Les pluronic-g-PAA tels que le F127-PAA du fait de leur nature bioadhésive et thermosensible ont été proposés pour l'administration de principes actifs pour une action topique (Ron *et al.*, 1996) et vaginale (Ron *et al.*, 1997). Cependant, il a été reporté que certains copolymères greffés chimiquement présentent une toxicité une fois administrés *in vivo* (Hoffman *et al.*, 1995). De plus, lorsque le pH augmente, la LCST de ces systèmes augmente du fait de l'augmentation de l'hydrophilie et des charges répulsives (Jeong *et al.*, 2006).

Cependant, il est plus simple d'associer les pluronics à des polymères mucoadhésifs sans faire appel au greffage chimique. Ainsi, de nombreuses formulations à base de pluronics et de

polymères mucoadhésifs ont pu être développées dans les domaines médical, cosmétique et pharmaceutique, notamment dans des formulations contenant des substances diverses telles que la quinine (Koffi *et al.*, 2006) ou le clotrimazole (Chang *et al.*, 2002b).

Les gels à base de pluronics peuvent également inclure des molécules plus ou moins fragiles telles que les acides gras (Charrueau *et al.*, 2001), les peptides (Barichello *et al.*, 1999a,b ; Bhardwaj & Richard, 2003), les hormones (Wenzel *et al.*, 2002) ou de l'ADN (Roques *et al.*, 2009). De même, leur utilisation par différentes voies d'administration, notamment la voie vaginale, a été envisagée (Chang *et al.*, 2002, Owen & Katz., 2005, Koffi, 2005). Plusieurs études ont montré que les gels à base de pluronics permettaient de prolonger la libération des principes actifs (Tableau 3).

Tableau 3 : Quelques formulations à base de Pluronic F127 utilisées par voie vaginale.

Formulation	Principe actif	Voie d'administration	Remarque	Réf
F127/F68/Polycarbophile	Antigène HBS+RANTES exprimant un ADN plasmidique	Vaginale	Prolongation du temps de résidence au niveau du vagin et libération prolongée du PA	Oh <i>et al.</i> , 2003
F127/F68/Polycarbophile 15/15/0,2 % ou 15/20/0,2 %	Clotrimazole	Vaginale	Prolongation du temps de résidence au niveau du vagin et libération prolongée du PA	Chang <i>et al.</i> , 2002b
F127/HPMC 20/0,2 % m/V F127/Polycarbophile 20/0,2 % m/V	Clotrimazole solubilisée dans la β -cyclodextrine (1 : 1) ratio molaire	Vaginale	Libération continue et prolongée du PA	Bilensoy <i>et al.</i> , 2006
F127*	–	Vaginale	Lubrifiant vaginal (commercialisé)	Rohan <i>et al.</i> , 2004

*Cette formulation a été mise sur le marché sous le nom Vasigil Intimate Moisturizer[®]. En plus du pluronic F127 et de l'eau, des additifs tels que la glycérine et le propylene glycol ont été rajoutés.

Afin de formuler de manière efficace un gel microbicide plusieurs éléments critiques doivent être maîtrisés de façon rationnelle (Garg *et al.*, 2010). Il s'agit notamment des points clés suivants :

- (i) la composition de la formulation ;
- (ii) les propriétés physico-chimiques du gel (ex : pH, osmolalité) ;
- (iii) la distribution et la rétention vaginale (ex : propriétés physiques et mécaniques) ;
- (iv) la libération du principe actif ;
- (v) l'acceptabilité et l'absence de toxicité.

Une fois ces éléments évalués, il sera aisé d'atteindre les objectifs d'efficacité, de sécurité et de fiabilité vis à vis de la libération efficace du principe actif (Garg *et al.*, 2010, Ndesendo *et al.*, 2008).

Dans la mesure où l'influence de la formulation est recherchée, il est évident que les tests cliniques doivent être menés directement sur la formulation considérée et non pas uniquement sur la molécules microbicide elle-même, afin de déterminer le potentiel thérapeutique de ces formulations. Des études précliniques préalables que nous abordons dans la partie suivante sont néanmoins indispensables..

5. Le développement préclinique d'un candidat microbicide destiné à la voie vaginale.

Jusqu'à présent, aucune directive ne formalise les étapes du développement préclinique des substances microbicides pour la voie vaginale. Toutefois, le développement préclinique des molécules actives microbicides est réalisé en se référant aux exigences des microbicides destinés à la voie parentérale (Buckheit *et al.*, 2010). Ces exigences peuvent être étendues aux formulations topiques microbicides. Selon Buckheit *et al.*, ce développement se déroule en 10 étapes :

- **Etude *in vitro* de l'efficacité et de la toxicité** : elles se font sur culture cellulaire. Les essais d'efficacité et de toxicité sur les souches cliniques à faible passage (notamment les sous-types B, C et/ou E) sont incontournables (tests PBMC). Par la suite, d'autres essais d'efficacité peuvent être effectués en utilisant des cellules souches virales à tropisme CCR5, sur les monocytes et les cellules dendritiques, en présence de mucine, en présence de fluide vaginal et de liquide séminal synthétiques, à pH vaginal. La toxicité peut être évaluée sous l'angle de l'observation de l'influence sur la flore vaginale normale (*Lactobacillus*) et sur des cellules d'origine vaginale, cervicale ou rectale (Fichorova *et al.*, 2001).

- **Essais d'inhibition de la transmission** : Le but est de déterminer qualitativement et/ou quantitativement l'inhibition de la transmission et de la réplication du virus par le microbicide (Watson *et al.*, 2008). L'étude se déroule en culture cellulaire. L'inhibition est observée en tenant compte des cellules impliquées dans la transmission de l'infection. On distingue les essais de transmission du virus seul ou associé, les essais de transmission indépendamment ou non des CD4. Le test MTSA (Microbicide Transmission and sterilization Assay) permet de mesurer la concentration en microbicide qui supprime totalement la transmission du virus et stérilise le milieu. Les essais peuvent être effectués en présence de fluide vaginal ou de liquide séminal simulés et diverses souches virales peuvent être utilisées (y compris des souches résistantes).
- **Essais mécanistiques** : ces essais servent à déterminer le mécanisme d'action anti-VIH du virus. Ils se déroulent sur cultures cellulaires avec un suivi des paramètres biochimiques et enzymatiques. Ce sont principalement les essais d'inhibition de l'attachement, d'inhibition de fusion, d'inactivation virale, d'inhibition de la transcriptase réverse, l'étude du tropisme CCR5 et CXCR4 et d'inhibition des DC-SIGN pour les inhibiteurs de l'attachement ainsi que les tests ELISA gp120/CD4.
- **Détermination de la gamme d'action** : ces essais permettent de tester tous les moyens possibles de transmission du virus au niveau vaginal. Ils sont effectués en routine en présence ou non de mucopolysaccharides tels que la mucine de porc ou de fluide vaginal ou de liquide séminal simulés (Owen & Katz., 1999, 2005). Ils évaluent l'aptitude du microbicide à empêcher l'infection de cellules exprimant ou non les récepteurs CD4 par le virus seul ou associé. Par conséquent, le choix des cellules pour la culture *in vitro* doit être adapté. Il s'agit donc de tests d'efficacité contre toute la gamme des sous-types de VIH, les virus à tropisme CCR5 et CXCR4, les souches virales résistantes, le VIH-2, le SIV (virus simien) et le SHIV (chimère des virus VIH et SIV, possède des parties des deux génomes). Des tests d'efficacité vis-à-vis d'autres MST (d'origine virale, bactérienne, parasitaire ou

fongique) sont également effectués ex : HSV-2, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans* et *Trichomonas vaginalis*.

- **Toxicité sur la voie vaginale ou rectale** : Il s'agit d'essais de toxicité *in vitro* sur culture de cellules d'origine rectale, vaginale ou cervicale. D'autres essais sont également effectués tels que les essais de toxicité vis-à-vis des lactobacilles et le MatTek épivaginal test.
- **Essais de combinaison avec d'autres microbicides potentiels** : Les stratégies de combinaison des microbicides topiques commencent tout juste à être mises au point. Les techniques d'évaluation précliniques doivent alors être adaptées à ces nouvelles stratégies. Par exemple, si l'activité des microbicides se situe à des niveaux différents, il faudra entre autre en tenir compte dans le choix des cellules immunitaires à utiliser et des souches de cellules à mettre en culture. Les tests réalisés dans ces conditions sont les tests d'attachement, les tests standards PBMC et le test MTSA.
- **Résistance** : Il s'agit de réaliser des essais *in vitro* d'activité antivirale en présence de souches résistantes. A ce stade, on peut réaliser des essais d'attachement pour évaluer la transmission de souches résistantes et étudier la sélection de souches résistantes dans des conditions similaires à la présence d'un microbicide. Toutes les souches virales sauvages et toutes les souches possédant une résistance connue au microbicide lui-même ou à d'autres microbicides possédant une action inhibitrice similaire doivent être utilisées dans ces essais.
- **Etudes sur explant cervical ou autres modèles *ex vivo*** : ces études permettent d'évaluer la toxicité cellulaire du candidat microbicide et son activité sur les cellules cibles présentes dans la partie submucosale du vagin. Trois modèles sont décrits (Collins *et al.*, 2000, Greenhead *et al.*, 2000). Dans le premier modèle l'explant est complètement immergé dans le milieu de culture tissulaire et l'inoculum (VIH-1) est appliqué sur la partie apicale de l'explant en présence ou non de microbicide. Ce type de modèle est donc « polarisé »

puisque le milieu de culture et le virus sont en contact avec la partie apicale. Dans le second modèle, l'explant est exposé au VIH-1 en présence ou non de microbicide sans tenir compte de la polarité puis le tout est immergé dans le milieu de culture tissulaire. La culture se fait de sorte à permettre un accès indépendant aux surfaces apicale et basolatérales. Le VIH-1 est mis en contact du côté apical de l'explant et le milieu de culture est mis en contact du côté basolatéral. Enfin, la méthode la plus récente consiste à positionner l'explant de sorte à ce que la partie apicale de l'épithélium soit en contact avec l'air à l'interface et la partie basale est immergée dans le liquide de culture. Dans cette méthode, l'inoculum est appliqué en présence ou non de microbicide directement sur la partie apicale du tissu. Cette technique permet de se rapprocher des conditions *in vivo*. en ajoutant du fluide vaginal ou du liquide séminal simulé. Elle permet d'observer l'efficacité de nombreux candidats microbicides.

- **Etude de l'activité dans des gels candidats microbicides**
- **Etudes *in vivo* chez l'animal** : plusieurs modèles sont utilisés tels que le *rhesus macaque*, ou la souris humanisée.

En plus des études précitées, d'autres études plus spécifiques peuvent être réalisées afin d'aboutir à un IND (Investigational New Drug ou Nouveau médicament en cours d'investigation). Il s'agit des tests suivants :

- Test d'irritation vaginale du lapin (RVI) (Draize, 1944) ;
- Test d'irritation du pénis du lapin (Zaneveld *et al.*, 2002) ;
- Essai local sur les ganglions lymphatiques (Dearman *et al.*, 1999) ;
- Les études d'absorption (pour évaluer une potentielle absorption systémique du candidat microbicide) (Van Damme *et al.*, 2005) ;
- Evaluation de la réponse inflammatoire dans l'environnement vaginal (mesure du profil de libération et dosage des cytokines et des chemokines) (Doncel *et al.*, 2004).

Selon Doncel & Clark, (2010) une évaluation préclinique est construite selon un modèle logique et précis. (i) Elle doit débiter par la sélection d'une substance active et d'une formulation non cytotoxiques, spécifiques, efficaces, et stables ; en tenant compte du mode de libération recherché. (ii) Ensuite, il faudrait évaluer *in vitro* la corrélation entre les propriétés physico-chimiques de la formulation finale et son acceptabilité (tolérance), la libération du principe actif, l'activité antivirale spécifique, ainsi que la toxicité cellulaire et tissulaire. (iii) L'évaluation préclinique se poursuit *in vivo* chez l'animal avec l'étude des paramètres pharmacocinétiques, pharmacodynamiques et en parallèle l'évaluation de la toxicité. (iv) La dernière étape correspond à l'évaluation de la sécurité et de l'efficacité au niveau cervico-vaginal. Ces différentes étapes peuvent mener à des études plus approfondies. Diverses études ont été menées afin d'évaluer l'efficacité et la toxicité des formulations microbicides (Bilensoy *et al.*, 2007, Chang *et al.*, 2002b, Catalone *et al.*, 2004, Mauck *et al.*, 2004a,b). Cependant, lors des études précliniques, l'expérience a montré que seules l'évaluation de l'efficacité, la sécurité et des propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques au niveau cervico-vaginal ne suffisent pas. D'autres éléments capables d'influencer l'efficacité et la sécurité des candidats microbicides sont à inclure (Doncel & Clark, 2010). Ce sont notamment, les cellules cibles impliquées dans la transmission du virus (monocytes, lymphocytes, cellules dendritiques), la présence ou l'absence de mucine, les sécrétions cervico-vaginales (fluide vaginal), le liquide séminal, la microflore vaginale, le pH vaginal.

5.1. Modèles *in vitro* et *ex vivo* d'évaluation de candidats microbicides.

Des modèles en culture cellulaire ou sur explants cervico-vaginaux sont généralement utilisés afin d'évaluer l'efficacité et la toxicité des candidats microbicides. Les cellules utilisées sont généralement les cellules sanguines et les cellules de Langherans. Toutefois, selon Lederman *et al.*, (2006), les explants ecto-cervicaux sont plus intéressants pour les candidats sous-forme gels ou de type tampons car ils offrent une plus grande surface d'expérimentation. Ils permettent

également d'évaluer les paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques, notamment l'absorption, les concentrations en substance active ou en métabolites, ainsi que les interactions entre les cellules impliquées dans le processus infectieux et la capacité à inhiber l'infection par le VIH. L'équipe du Dr Guido Vanham (Van Herrewege *et al.*, 2007, Gali *et al.*, 2010) a travaillé à la mise au point d'une méthodologie originale faisant appel à des "dual chambers" afin de démontrer l'efficacité *in vitro* de microbicides sous forme de gels sur des cultures de cellules infectées par des virus. Ces gels contenaient des principes actifs tels que des inhibiteurs de la transcriptase inverse et des inhibiteurs de la fusion qui se sont avérés efficaces. Malheureusement, tous ces gels ont montré une toxicité sur les cellules.

En effet, étant donné que le virus peut posséder une localisation intracellulaire (dans les cellules hôtes), certains principes actifs, pour les atteindre, détruisent la structure lipidique de la membrane après une exposition répétée ce qui évidemment se révèle toxique vis-à-vis des cellules (Veazey, 2009). De plus, les résultats des tests de toxicité ne permettent pas un screening efficace de l'effet des différents composants car en général il s'agit de couches de cellules. Il n'est donc pas possible de détecter un potentiel effet allergisant ou inflammatoire dus à une exposition répétée ou prolongée.

Les dual chambers restent cependant un bon outil d'évaluation des candidats microbicides (Doncel & Clark, 2010).

5.2. Modèles *in vivo* d'évaluation des candidats microbicides

Les études *in vivo* sont réalisées sur des modèles animaux conventionnels. Chaque type de modèle présente ses avantages et ses inconvénients.

Modèles Rongeurs et Lapins

Les rongeurs ne sont pas coûteux mais malheureusement ne sont pas sensibles à l'infection par le VIH. De plus, les rongeurs ont des cycles de reproduction et une anatomie vaginale et cervicale très différents de ceux des humains (Schacklett, 2008). Ils sont utilisés dans les études préliminaires notamment pour les mesures répétitives et à doses multiples (Galen *et al.*, 2007, Palliser *et al.*, 2006).

Modèles de souris humanisées

Ces modèles sont issus d'une transplantation de cellules humaines provenant notamment du sang, du foie et du rein (Denton, 2008, Veazey, 2009, Lederman *et al.*, 2006, Di Fabio *et al.*, 2001, Khanna *et al.*, 2002). Les souris humanisées sont utilisées afin de confronter les résultats obtenus sur les modèles *in vitro* et *ex vivo*. Il s'agit par exemple des SCID mice (Severe combined immunodeficient mice) reconstituées avec des cellules mononuclées de sang périphérique humain. La souris BLT qui est le modèle le plus complet à ce jour est reconstitué à partir de cellules souches du foie et du thymus fœtal humain. Ainsi, ces souris présentent un repeuplement systémique en cellules T, cellules B, monocytes, macrophages, et cellules dendritiques (Wege *et al.*, 2008)

Modèles primates non humains

Les primates les plus utilisés en tant que modèle sont : *rhésus macaques* (Nuttall *et al.*, 2008, Boadi *et al.*, 2005), *pigtail macaques* (Patton *et al.*, 2006a, 2006b) et *cynomolgus macaques* (Moore & Shattock, 2003, Tsai *et al.*, 2003). Ces animaux sont les premiers à avoir été utilisés pour la transmission, l'immunologie et l'étude de la pathogénèse du VIH (Montagnier., 2010, Lackner & Veazey, 2007). Ils sont incontournables pour tester l'efficacité et l'innocuité des candidats microbicides. Ils permettent également d'étudier les mécanismes d'entrée ou de blocage

des virus. Le modèle *pigtail macaque* est préféré de certains chercheurs car les animaux mettent bas une fois par an, tandis que les *rhesus macaque* le font selon les saisons. Cependant, ces animaux sont moins disponibles. Le type *cynomolgus macaque* est moins coûteux que le type rhesus mais des études comparatives de validation de ce modèle restent encore à faire (Veazey *et al.*, 2009). Les modèles primates non humains demeurent les plus proches du système humain mais n'y sont pas identiques. Lors de certaines expérimentations des injections d'hormones telles que les progestatifs sont réalisées afin de réduire l'épaisseur de l'épithélium vaginal, de faciliter et de standardiser l'infection artificielle (Lederman *et al.*, 2006).

Lard-Whiterford *et al.*, (2004) a résumé les recommandations de l'International Working Group of Microbicides de sorte à attirer l'attention de la communauté scientifique sur la nécessité de prendre en compte certains aspects lors du développement clinique de leurs formulations. Il s'agit notamment :

- de l'activité antimicrobienne contre la microflore commensale et pathogène vaginale à l'origine des IST par des études *in vitro* sur cultures cellulaires. Il s'agira d'effectuer des essais bien ciblés, sur des types cellulaires bien définis et de sorte à déterminer un index thérapeutique. Il faudra inclure les virus et les types de cellules les plus susceptibles d'être impliquées dans le processus de l'infection *in vivo*. Tous les modèles animaux devront être les plus proches possibles de l'être humain, de surcroit les exigences liées aux caractéristiques de la voie vaginale devront être pris en considération.
- De l'utilité de données toxicologiques et pharmacocinétiques non cliniques. En plus, des études pharmacocinétiques et toxicologiques usuelles, la toxicité génétique, l'effet irritant sur la muqueuse vaginale, les risques pharmacologiques sur différents organes devront être évalués. Des études de toxicité sur la reproduction, des études

d'hypersensibilité (immunogénicité cutanée) et de carcinogénicité pourront être menées.

- De l'observation de paramètres sur la qualité de la formulation. En effet, les microbicides devront respecter les exigences des Bonnes Pratiques de Fabrication essentiellement. Les produits destinés aux études cliniques de phase III devront être bien caractérisés de manière à être similaires à ceux qui seront proposés sur le marché. Il faudra donc effectuer les études de caractérisation des formulations (dosage, rétention et distribution dans la cavité vaginale, solubilité, pH, stabilité, osmolalité, effet tampon, viscosité, rhéologie...), effectuer les tests adéquats selon la forme galénique, effectuer des études de libération *in vitro* pour les formes semi-solides, tester la compatibilité avec les barrières physiques telles que les préservatifs ou les diaphragmes. Lors de ces études on mettra l'accent sur la stabilité du principe actif dans la formulation et sur l'interaction avec le pH vaginal.

Le développement préclinique du candidat microbicide permettra d'obtenir des données analytiques et galéniques qui serviront à constituer le dossier d'autorisation de mise sur le marché du futur médicament. De plus, les pré-requis toxicologiques et pharmacologiques (toxicité aigue, toxicité chronique, effet sur la fonction de reproduction, mutagenèse, cancérogenèse, pharmacodynamie, pharmacocinétique) ayant été remplis le candidat microbicide pourra alors faire l'objet d'études cliniques.

6. Développement clinique des microbicides : état des lieux et perspectives.

Les études cliniques sont réalisées chez l'être humain. Elles mesurent l'innocuité et l'efficacité. Elles se déroulent en quatre phases :

- la phase I : elle est préliminaire à l'étude d'efficacité. Il s'agit d'évaluer la tolérance et l'absence d'effets secondaires. Cette phase permet également d'étudier la cinétique et le métabolisme chez l'homme. Les groupes étudiés sont le plus souvent de petite taille (20 à 80 participants).

- la phase II : ou étude pilote, consiste à déterminer la dose optimale du médicament et ses éventuels effets secondaires. La population étudiée est composée de malades, souvent de nombre inférieur à 500. Elle est subdivisée en deux phases : les phases IIa et IIb. La phase IIa estime l'efficacité de la molécule sur un nombre limité (de 100 à 200) de malades, alors que la phase IIb détermine la dose thérapeutique de la molécule sur une plus grande échelle (de 100 à plus de 300 malades).

- la phase III : ou « étude pivot » est l'étude comparative d'efficacité proprement dite. Elle compare le traitement soit à un placebo, soit à un traitement de référence. Les groupes sont de taille importante, souvent plusieurs milliers de participants.

- la phase IV : (ou *post-marketing*) représente le suivi à long terme d'un traitement alors que le traitement est déjà autorisé sur le marché. Elle doit permettre de dépister des effets secondaires rares ou des complications tardives.

Dans le domaine des microbicides, de nombreuses études cliniques ont été menées jusqu'à présent. Cependant aucun médicament à base de microbicide n'est disponible à ce jour sur le marché (Tableau 4).

Tableau 4. Etudes cliniques récemment achevées ou en attente de résultats sur les microbicides anti-VIH à usage topique (CTG, 2012, AVAC, 2012).

Produit	Forme galénique	Phase	Nombre d'études
Tenofovir	Gel	I	2
Tenofovir	Gel	II	2
UC-781	Gel	I	2
3 % SPL7013 (Vivagel)	Gel	I	1
Ethanol 62 % et 15 % dans un émollient	Gel	I	1
Dapivirine	Gel	I	1
Buffer gel	Gel	I	1
Buffer gel	Gel	II/IIb	1
PRO 2000			
Dapavirine	Anneau vaginal	III	1
Dapavirine	Anneau vaginal	I/II	4
Dapavirine	Anneau vaginal	I	1

Certains des facteurs étant à l'origine de ces échecs en phase d'étude clinique ont été identifiés. Toutefois, leur recherche est parfois délicate car ces essais sont difficiles à contrôler. Ainsi, notamment l'étude de l'efficacité du produit dans l'environnement réel d'utilisation au niveau vaginal est très complexe. L'adhésion du produit avant le rapport sexuel (qui peut être fortement diminuée par la dilution par le fluide vaginal et le liquide séminal), l'exclusion des femmes enceintes des études cliniques (en raison de nombreux obstacles tels que le coût de l'étude, la sécurité du fœtus car le principe actif pourrait traverser la barrière foeto-placentaire, les questions juridiques..), la capacité à tapisser aisément la muqueuse vaginale et cervicale et enfin la réelle incidence de l'infection à VIH dans la population testée (Omar & Bergeron., 2010, 2011, Lysterly *et al*, 2008) représentent autant de paramètres à maîtriser.

Le nonoxynol-9, un tensio-actif non ionique, était considéré comme l'une des substances les plus prometteuses pendant les années 1980-1990. L'utilisation de cette molécule comme microbicide topique a été peu à peu abandonnée car des études ont montré qu'elle n'est pas aussi efficace *in vivo* qu'elle ne l'est *in vitro*. De plus, cette molécule a présenté une toxicité extrêmement importante qui a été à l'origine de l'abandon des essais cliniques menés en 2002 (Roddy *et al.*, 2002, Wilkinson, 2002, Richardson, 2002, Van Damne *et al.*, 2002). En effet, tout comme pour un gel à base de cellulose sulfate (Mesquita *et al.*, 2009) des études ont montré que le nonoxynol-9 entraînait une rupture de la barrière épithéliale vaginale et à rebours de l'effet escompté, accélérât la réplication virale (Van Damne *et al.*, 2002, 2008). Une autre cause avancée pour expliquer ces échecs était que les gels utilisés ne tapissaient pas uniformément la muqueuse vaginale (Omar & Bergeron, 2011, Omar *et al.*, 2008).

« The Invisible Condom », un applicateur multiperforé renfermant un gel, a été alors développé par des scientifiques (Omar *et al.*, 2008, Gagné *et al.*, 1999). Il a été conçu sur l'hypothèse que le mode d'application du gel était à la base de son manque d'efficacité. En effet, il s'agit d'appliquer un gel à base de pluronic F127 à 20 % et de SLS de façon uniforme sur toute la muqueuse cervico-vaginale à l'aide d'un dispositif adapté. Ce nouveau procédé a fait l'objet d'études cliniques en phase I et II et a donné des résultats prometteurs (Trottier *et al.*, 2007, Mbopi-Keou *et al.*, 2010).

Dans la recherche basée sur l'inhibition du VIH pour la prévention de l'infection, le CAPRISA à base de tenofovir (inhibiteur nucléosidique de la réverse transcriptase par inhibition compétitive) a montré 39 % de protection contre le VIH lors d'essais cliniques (Karim *et al.*, 2010). Un inhibiteur non nucléosidique de la réverse transcriptase, l'UC 781 a également montré de bons résultats sur le plan pharmacocinétique et préclinique (études cliniques de phase I) en tant que microbicide associé à des gels à base de Carbopol® 974P destinés à la voie vaginale (Patton *et al.*, 2007, Fletcher *et al.*, 2005).

De nombreuses études ont pour objectif d'empêcher la fixation du virus aux lymphocytes notamment par l'utilisation de microbicides topiques tels que la cyanovirine, une protéine inhibitrice de fusion, active sur VIH-1 et VIH-2 et issue de la culture de cyanobacterium (algue bleue-verte). Elle a été testée en phase préclinique dans des gels à base d'HEC en tant que gel microbicide topique pour la voie vaginale (Tsai *et al.*, 2004). En bloquant la gp 120, ce gel empêche l'interaction entre le virus et la cellule cible. Cependant, ces formulations n'ont pas encore fait l'objet d'études cliniques.

Plusieurs autres formulations sont en phase d'expérimentation clinique la plupart en phase I et II ; les résultats sont attendus dans les prochaines années. Les principales molécules testées sont le tenofovir et la dapavirine dans diverses formulations dont les plus courantes sont des hydrogels (le plus souvent à base d'HEC) et des anneaux vaginaux (Tableau 5). Les molécules plus fragiles, notamment de nature peptidique, sont en général associées à des films, des comprimés ou des anneaux vaginaux.

Selon Morrow & Hendrix (2010), les études cliniques devraient tenir compte d'un certain nombre de points spécifiques. En effet, d'une part, selon eux, les études de pharmacocinétique et d'acceptabilité sont liées puisque l'acceptabilité par la femme influence l'adhérence au protocole ayant ainsi un impact sur la dose de médicament efficace. D'autre part, l'évaluation de la toxicité devrait être corrélée avec l'acceptabilité et la pharmacocinétique. Ces trois paramètres, s'ils sont évalués de façon intégrée, pourraient permettre de mieux mener les études cliniques.

Tableau 5. Etudes cliniques planifiées ou en cours sur les microbicides anti-VIH à usage topique (CTG 01/2012, AVAC consulté en 2012).

Produit	Forme galénique	Phase	Fin de l'étude
Dapavirine	Anneau vaginal	III	2015
Tenofovir 1 %	Gel	III	2014
Tenofovir 1 %	Gel reformulé (réduction de la proportion en glycérine/voie rectale)	II	2014
TFV-LNG IVR	Anneau vaginal	I/II	–
MIV-150/Zinc acétate	Gel vaginal	I	2013
Tenofovir 1 %	Gel reformulé (réduction de la proportion en glycérine/voie rectale et vaginale)	I	2013
Tenofovir 1 % (plusieurs études)	Gel	I	2013
Tenofovir 1 %	Anneau vaginal	I	2012
Depo-provera/Tenofovir 1%	Gel vaginal	I	2012-2013
Dapavirine 25 mg/Maraviroc 100 mg/Dapavirine+Maraviroc 25+100 mg	Anneau vaginal	I	2013
Placebo	Anneau vaginal	I	2013
Tenofovir 1%/Placebo	Gel rectal	I	Décembre 2012
Amphora/ACIDFORM	Gel vaginal	I	–
TFV/FTC/TFV	Comprimés vaginaux	I	
Tenofovir 1%/Placebo	Gel	I	Fin en Décembre 2012

7. Conclusion

La recherche de formulations innovantes capables de prévenir l'infection par le VIH est en plein essor. Pour autant, il est évident que le chemin à parcourir pour arriver à un microbicide topique efficace reste long. Notre recherche bibliographique nous confirme que les dernières avancées en

matière de développement de nouvelles molécules spécifiques du VIH, telles que le peptide M48U1, restent les plus prometteuses. En parallèle du développement de nouvelles molécules plus actives, le développement de formulations adaptées doit également être poursuivi avec pour objectif de constituer dans la cavité vaginale une véritable barrière à la fois pharmacologique et physique vis-à-vis du VIH. Dans ce domaine, la revue des avantages et inconvénients des différentes formulations proposées dans la littérature nous amène à conclure que les gels thermosensibles et mucoadhésifs constituent des véhicules extrêmement intéressants pour réaliser simultanément ces objectifs.

Pour ces raisons, le travail expérimental présenté dans ce manuscrit de thèse décrit la formulation d'un gel thermosensible et mucoadhésif capable de véhiculer la molécule M48U1 et de former simultanément une barrière contre la diffusion du virus VIH jusqu'aux cellules épithéliales.

8. Références

- ✓ AFSSAPS <http://www.afssaps.fr/Services/Repertoire-des-medicaments> Consulté en 2012.
- ✓ Aka-Any-Grah A., Bouchemal K., Koffi A., Agnely F., Zhang M., Djabourov M., Ponchel G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 76, 296–303.
- ✓ Al-Tahami K., Singh J. Smart polymer based delivery systems for peptides and proteins. *Recent Pat. Drug. Deliv. Formul.* 2007, 1, 65–71.
- ✓ Amaral E., Perdigao A., Souza M.H., Mauck C., Waller D., Zaneveld L., Faundes A. Vaginal safety after use of a bioadhesive, acid-buffering, microbicide contraceptive gel (ACIDFORM) and a 2% nonoxynol-9 product. *Contraception* 2006, 73 (5), 542-547.
- ✓ AMD, Alliance for Microbicides Development. MICROBICIDES ways forward. (Van Damme L). *Health and Sexuality Microbicides. Special report 2002*, 1–8.
<http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/27266> Consulté en 2012
- ✓ AVAC. Advocacy for HIV prevention
<http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/3109Global> ou <http://www.avac.org>
Consulté en 2012.
- ✓ Bakobaki J.M., Lacey C.J., Bukonya M.I. *et al.* A randomized controlled safety and acceptability trial of dextrin sulphate vaginal microbicide gel in sexually active women in Uganda. *AIDS* 2005, 19 (18), 2149–2156
- ✓ Baldacci M. Pharmaceutical compositions for topical use containing hyaluronic acid and Doederlein's bacillus for the treatment of vaginal diseases. EP 769298, 1997.
- ✓ Baleux F., Loureiro-Morais L., Hersant Y., Clayette P., Arenzana-Seisdedos F., Bonnaffé D., Lortat-Jacob H. A synthetic CD4-HS glycoconjugate inhibits both CCR5 and CXCR4 HIV-1 attachment and entry. *Nat. Chem. Biol.* 2009, 5, 743-748

- ✓ Ballagh S.A., Baker J.M., Henry D.M., Archer D.F. Safety of single daily use for one week of C31G HEC gel in women. *Contraception* 2002, 66 (5), 369-375.
- ✓ Barichello J.M., Moroschita M., Takayama K., *et al.* Enhanced rectal absorption of insulin loaded Pluronic F-127 gels containing insaturated fatty acids. *Int. J. Pharm.* 1999a, 183, 125-132.
- ✓ Barichello J.M., Moroshita M., Takayama K., *et al.* Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following administration in rats. *Int. J. Pharm.* 1999b, 184, 189-198.
- ✓ Barnhart K.T., Stolpen A., Pretorius E.S., Malamud D. Distribution of a spermicide containing nonoxynol-9 in the vaginal canal and the upper female reproductive tract. *Hum. Reprod.* 2001, 16, 1151–1154.
- ✓ Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F, Nugéyre M.T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Bin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C. *et al.* Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983, 220, 868–871.
- ✓ Belec L. Transmission sexuelle de l'infection par le VIH. 2007. Edition Libbey Eurotext, Montrouge.
- ✓ Berlier W., Cremel M., Hamzeh H., Lévy R., Lucht R., Bourlet T., Pozzetto B. and Delézay O. Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Hum. Reprod.* 2006, 21 (5), 1135-1142.
- ✓ Bernstein D.I., Stanberry L.R., Sacks S., *et al.* Evaluations of unformulated and formulated dendrimer-based microbicide candidates in mouse and guinea pig models of genital herpes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 3784–3788.
- ✓ Bhardwaj R., Blanchard J. Controlled-Release delivery system for the α -MSH analog melatonin-I using poloxamer 407. *J. Pharm. Sci.* 1996, 85(9), 915-918.

- ✓ Bilensoy E., Curpanh, Y., Sen, M., *et al.* Thermosensitive mucoadhesive gel formulation loaded with 5-Fu-cyclodextrin complex for HPV-induced cervical cancer. *J Incl Phenom Macrocycl Chem.* 2007, 57, 363-370.
- ✓ Bilensoy E., Rouf M.A., Vural I., Sen M., Hincal A.A. Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex. *AAPS PharmSciTech.* 2006, 7 (2), 38, E1-E7
- ✓ Boadi T., Schneider E., Chung S., Tsai L., Gettie A., Ratterree M., *et al.* Cellulose acetate 1,2-benzenedicarboxylate protects against challenge with pathogenic X4 and R5 simian/human immunodeficiency virus. *AIDS* 2005, 19(15), 1587-1594.
- ✓ Bombart F. Aqueous vaginal douche compositions. US Patent n°5, 292,532, 1994.
- ✓ Boris S., Barbés C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2000, 2, 543–546.
- ✓ Bouchemal K, Agnely F, Koffi A, Ponchel G. A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1, 2 on Pluronic F-127 micellization using isothermal titration microcalorimetry. *J. Colloid Interface Sci.* 2009, 338, 169-176
- ✓ Bourne N., Stanberry L.R., Kern E.R., *et al.* Dendrimers, a new class of candidate topical microbicides with activity against herpes simplex virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44, 2471–2474.
- ✓ Briggs J.A.G., Wilk T., Welker R., Krausslich H.-G., Fuller S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 2003, 22 (7), 1707-1715.
- ✓ Bromberg L., Temchenko M., Alakhov V., Hatton T.A. Bioadhesive properties and rheology of polyether-modified poly (acrylic acid) hydrogels. *Int. J. Pharm.* 2004, 282 (1-2), 45-60.
- ✓ Buckheit Jr. R.W., Watson K.M., Morrow K.M., Ham A.S. Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV. *Antiviral Res.* 2010, 85 (1), 142-158.

- ✓ Caillouette J.C., Sharp Jr. C.F., Zimmerman G.J., Roy S. Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1997, 176, 1270–1275.
- ✓ Calado M., Matoso P., Santos-Costa Q., Espirito-santo M., Machado J., (...), Azevedo-Pereira J.M. Coreceptor usage by HIV-1 and HIV-2 primary isolates: The relevance of CCR8 chemokine receptor as an alternative coreceptor. *Virology* 2010, 408,174-182.
- ✓ Carlsson A., Karlström G., Lindman B. Thermal gelation of nonionic cellulose ethers and ionic surfactants in water. *Colloids Surf.* 1990, 47, 147–165.
- ✓ Carlsson A., Karlström G., Lindman B., *et al.* Interaction between ethyl (hydroxyethyl) cellulose and sodium dodecyl sulphate in aqueous solution. *Colloid Polym. Sci.*1988, 266, 1031–1036.
- ✓ Catalone B.J., Kish-Catalone T.M., Budgeon L.R., *et al.* Mouse model of cervicovaginal toxicity and inflammation for preclinical evaluation of topical vaginal microbicides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 1837–1847.
- ✓ Chang J.Y., Oh Y.K., Choi H., *et al.* Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions. *Int. J. Pharm.* 2002a, 241, 155–163.
- ✓ Chang J.Y., Oh Y.K., Kong H.S., *et al.* Prolonged antifungal effect of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis. *J. Control. Release.* 2002b, 82, 39-50.
- ✓ Charrueau C., Tuleu C., Astre V., Grossiord J.-L., Chaumeil J.-C. Poloxamer 407 as a thermogelling and adhesive polymer for rectal administration of short-chain fatty acids. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2001, 27 (4), 351-357.
- ✓ Chien Y.W., Lee C.H. Drug delivery, vaginal route. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* 2nd ed. 2002, pp. 961–985

- ✓ Cho K.Y., Chung T.W., Kim B.C., Kim M.K., Lee J.H., Wee W.R., Cho C.S. Release of ciprofloxacin from poloxamer-graft-hyaluronic acid hydrogels *in vitro*. *Int. J. Pharm.* 2003, 260 (1), 83-91
- ✓ Clavel F., Guyader M., Guetard D. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 1986, 324 (6098), pp. 691-695
- ✓ Cohen J., December 14, 2009. HIV Outwits Yet Another Microbicide. *ScienceNOW Daily News* <<http://sciencenow.sciencemag.org/cgi/content/full/2009/1214/1>>.
- ✓ Cohen M.S., Shaw G.M., McMichael A.J., Haynes B.F. Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364, 1943–1954.
- ✓ Collins K.B., Patterson B.K., Naus G.J., Landers D.V., Gupta P. Development of an *in vitro* organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat. Med.* 2000, 6 (4), 475–479.
- ✓ Cone R.A. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 (2), 75-85.
- ✓ Cong M, Youngpairoj Ae S., Zheng Qi, Aung W., Mitchell J., Sweeney E., Hanson D.L., Hendry R.M, Dobard C., Heneine W. and García-Lerma J.G. Truvada Mutant by Intermittent Prophylaxis with Immunodeficiency Virus SHIV162p3M184V an Emtricitabine-Resistant Simian/Human. *J. Virol.* 2011, 85(15), 7933.
- ✓ CTG: Clinical Trials.gov. US National Institute of Health <http://clinicaltrials.gov/> Consulté en 2012
- ✓ D’Cruz O.J., Samuel P., Uckun F.M. PHI-443: a novel noncontraceptive broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus microbicide. *Biol. Reprod.* 2004, 71, 2037–47.
- ✓ Damian F., Fabian J., Friend D.R., Kiser P.F. Approaches to improve the stability of the antiviral agent UC781 in aqueous solutions. *Int. J. Pharm.* 2010, 396 (1-2), 1-10
- ✓ Das Neves J., Bahia M.F. Gels as vaginal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 2006, 318 (1-2), 1-14

- ✓ De Cock K.M., Adjorlolo G., Ekpini E., Sibailly T., Kouadio J., Maran M., Brattegaard K., (...), Gayle H.D. Epidemiology and transmission of HIV-2: Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA*. 1993, 270 (17), 2083-2086.
- ✓ Dearman R.J., Basketter D.A., Kimber I. Local lymph node assay: Use in hazard and risk assessment. *J. Appl. Toxicol.* 1999, 19 (5), 299-306.
- ✓ Denton P.W. Antiretroviral pre-exposure prophylaxis prevents vaginal transmission of HIV-1 in humanized BLT mice. *PLoS. Med.* 2008, 15, 5(1), e16.
- ✓ Désormeaux A., Omar R.F., Bergeron M.G. topical microbicides for the prevention of STDs/HIV. *Can. J. Infect. Dis.* 1999, 10 suppl C, 41-48.
- ✓ Dey A.K., Burke B, Sun Y., Hartog K., Heeney J.L., Montefiori D., Srivastava I.K., Susan W. Barnett S.W. Use of a polyanionic carbomer, Carbopol®971P, in combination with MF59, improves antibody responses to HIV-1 envelope glycoprotein. *Vaccine* 2012, 30, 2749– 2759.
- ✓ Di Fabio S., Giannini G., Lapenta C., Spada M., Binelli A., Germinario E., Sestili P., (...), Vella S. Vaginal transmission of HIV-1 in hu-SCID mice: A new model for the evaluation of vaginal microbicides. *AIDS* 2001, 15 (17), 2231-2238
- ✓ Dittgen M., Durrani M.T., Lehmann K. Acrylic polymers. A review of pharmaceutical applications. *STP Pharma* 1997, 7, 403-437.
- ✓ Doncel G.F., Chandra N., Fichorova R.N. Preclinical assesment of the proinflammatory potential of microbicide candidates. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2004, 37 suppl3, S174-180.
- ✓ Doncel G.F., Clark M.R. Preclinical evaluation of anti-HIV microbicide products: New models and biomarkers. *Antiviral Res.* 2010, 88S, S10-S18
- ✓ Draize, E.A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1944, 82, 377–390.

- ✓ Dumortier G., Grossiord J.L., Agnely F., Chaumeil J.C. A review of poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharma. Res.* 2006, 23(12), 2709-2728.
- ✓ Edsman K., Hagerstrom H. Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2005, 57, 3-22.
- ✓ Elias C.J., Coggins C., Alvarez F., *et al.* Colposcopic evaluation of a vaginal gel formulation of iota carrageenan. *Contraception*, 1997, 56, 387–389.
- ✓ Elias C.J., Heise L.L. Challenges for the development of female controlled vaginal microbicides. *AIDS*, 1994, 8, 1–9.
- ✓ El-Sadr W.M., Mayer K.H., Maslankowski L., Hoesley C., Justman J., Gai F., Mauck C., Absalon J., Morrow K., Mâsse B., Soto-Torres L., Kwiecien A. Safety and acceptability of cellulose sulfate as a vaginal microbicide in HIV-infected women. *AIDS*. 2006, 20 (8), 1109-1116.
- ✓ Emau P., Tian B., O'keefe B.R., Mori T., McMahon J.B., Palmer K.E., Jiang Y., Bekele G., Tsai C.C. *J. Med. Primatol.* 2007, 36, 4-5, 244–253.
- ✓ Ferir G., Vermeire K., Huskens D., Balzarini J., Van Damme E.J.M., Kehr J.-C., Dittmann E., (...), Schols D. Synergistic *in vitro* anti-HIV type 1 activity of tenofovir with carbohydrate-binding agents (CBAs). *Antiviral Res.* 2011, 90 (3), 200-204.
- ✓ Fichorova R.N., Desai P.J., Gibson F.C., III, Genco C.A. Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect. Immun.* 2001, 69, 5840–5848.
- ✓ Fletcher P., Kiselyeva Y., Wallace G., Romano J., Griffin G., Margolis L., Shattock R. The nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor UC-781 inhibits human immunodeficiency virus type 1 infection of human cervical tissue and dissemination by migratory cells. *J. Virol.* 2005, 79, 11179–11186

- ✓ Gagné N., Cormier H., Omar R.F., Désormeaux A., Gourde P., Tremblay M.J., Juhász J., Beauchamp D., Rioux J.E., Bergeron M. G. Protective Effect of a Thermoreversible Gel Against the Toxicity of Nonoxynol-9. *Sex. Transm. Dis.* March 1999, 26, 3, 177–183.
- ✓ Galen B.T., Martin A.P, Hazrati E., Garin A., Guzman E., Wilson S.S, Porter D.D., Lira S.A., Keller M.J. and Betsy C.A. Comprehensive Murine Model to Evaluate Topical Vaginal Microbicides: Mucosal Inflammation and Susceptibility to Genital Herpes as Surrogate Markers of Safety. *Herold J Infect Dis.* 2007, 195 (9), 1332-1339.
- ✓ Gali Y., Arien K.K., Praet M., Van den Bergh R., Temmerman M., Delezay O., Vanham G. Development of an *in vitro* dual-chamber model of the female genital tract as a screening tool for epithelial toxicity. *J. Virol. Methods.* 2010, 165 (2), 186-197.
- ✓ Garcia-Lerma J.G., Cong M., Mitchell J., Youngpairoj A.S., Zheng Q., Masciotra S., Martin A., Kuklennyik Z., Holder A., Lipscomb J., Pau C.P., Barr J.R., Hanson D.L., Otten R., Paxton L., Folks T.M., Heneine W. Intermittent prophylaxis with oral Truvada protects macaques from rectal SHIV infection. *Sci. Transl. Med.* 2010, 2,14ra4.
- ✓ García-Lerma J.G., Otten R.A., Qari S.H., Jackson E., Cong M-e, *et al.* Prevention of Rectal SHIV Transmission in Macaques by Daily or Intermittent Prophylaxis with Emtricitabine and Tenofovir. *PLoS Med* 2008, 5(2), e28
- ✓ Garg S., Goldman D., Krumme M., Rohan L.C., Smoot S., Friend D.R. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antiviral Res.* 2010, 88 (SUPPL.)
- ✓ Garg S., Tambwekar K.R., Vermani K., *et al.* Development pharmaceuticals of microbicide formulations. Part II. Formulation, evaluation, and challenges. *AIDS Patient Care STDS.* 2003, vol.17, p 377–399.
- ✓ Garg S., Vermani K. Rationalization of selection of polymers in the development of vaginal formulations in terms of their bioadhesion and retention characteristics. *Microbicides*, 13-16 March 2000. Washington DC USA.

- ✓ Genc L., Oguzlar C., Güler E. Studies on vaginal bioadhesive tablets of acyclovir. *Pharmazic*, 2000, 55, 297-299.
- ✓ Girard P.M., Katlama Ch., Pialoux G. VIH. Rueil-Malmaison : DOIN, 6ème ed, 2007 : 729p
- ✓ Gordon-Wright A.P., Elder M.G. The systemic systemic absorption from the vagina of prostaglandin E2 administered for the induction of labour. *Prostaglandins* 1979, vol.18, p 153-160.
- ✓ Grabovac V., Guggi D., Bernkop-Schnurch A. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, vol. 57, p 1713-1723.
- ✓ Greendale G.A., Lee N.P., Arriola E.R. The menopause. *Lancet* 1997.353, 571–580.
- ✓ Greenhead P., Hayes P., Watts P.S., Laing K.G., Griffin G.E., Shattock R.J. Parameters of human immunodeficiency virus infection of human cervical tissue and inhibition by vaginal virucides. *J. Virol.* 2000, 74 (12), 5577–5586.
- ✓ Gupta P.N., , Pattani A., Curran R.M., Kett V.L., Andrews G.P., Morrow R.J., Woolfson A.D., Malcolm R.K. Development of liposome gel based formulations for intravaginal delivery of the recombinant HIV-1 envelope protein CN54gp140. Accepted 6 February 2012. Available online 14 February 2012. <http://dx.doi.org.chimie.gate.inist.fr/10.1016/j.ejps.2012.02.003>
- ✓ Haineault C., Gourde P., Perron S., Désormeaux A, Jocelyne Piret, Rabeea F. Omar, Roland R. Tremblay and Michel G. Bergeron1 Thermoreversible Gel Formulation Containing Sodium Lauryl Sulfate as a Potential Contraceptive Device. *Biol. Reprod.* 2003, 69(2), 687-694.
- ✓ Han L., Lv F, Xu P., Zhang G., Juniper N.S., Wu Z. Microbicide acceptability among female sex workers in Beijing, China: result from a pilot study. *J. Womens Health (Larchmt)* 2009, 18, 1377-1384.

- ✓ Harrison P.F., Rosenberg Z., and Bowcut J. Topical microbicides for disease prevention: Status and challenges. *Clin.Infect. Dis.* 2003, 26, 1290–1294.
- ✓ He C., Kim S.W., Lee D.S. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *J. Control. Release* 2008, 127, 189–207.
- ✓ Heymann E. Studies on sol-gel transformations: I. The reverse sol gel transformation of methylcellulose in water. *Trans. Faraday Soc.*, 1935, vol 31, p 846-864.
- ✓ Hillier S.L., Moench T., Shattock R., Black R., Reichelderfer P., Veronesse F. *In vitro* and *in vivo*: the story of nonoxynol 9. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005, 39(1), 1-8.
- ✓ Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: Host invasion. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8, 447-457.
- ✓ Hladik F., Doncel G.F. Preventing mucosal HIV transmission with topical microbicides: Challenges and opportunities. *Antiviral Res.* 2010, S88, S3-S9.
- ✓ Hoffman A.S., Chen G., Kaang S. New bioadhesive polymer compositions for prolonged drug release in the eye. *Proc Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater* 1995, 22, 159-160.
- ✓ Holt B.Y., Morwitz V.G., Ngo L., Harrison P.F., Whaley K.J., Pettifor A., and Nguyen A-H. *J Womens Health (Larchmt)* 2006, 15(3), 281-294.
- ✓ Howett M.K., Neely E.B., Christensen N.D., Wigdahl B., Krebs F.C., Malamud D., Patrick S.D., Pickel M.D., Welsh P.A., Reed C.A., Ward M.G., Budgeon L.R., and Kreider J.W. A Broad-Spectrum Microbicide with Virucidal Activity against Sexually Transmitted Viruses *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43(2), 314-321.
- ✓ Huang C., Soenen S.J., Van Gulck E, Vanham G, Rejman J., Van Calenbergh S., Vervaet C., Coenye T., Verstraelen H., Temmerman M., Demeester J., De Smedt S.C. Electrospun cellulose acetate phthalate fibers for semen induced anti-HIV vaginal drug delivery. *Biomaterials* 2012, 33(3), 962–969.
- ✓ Huang C.C., Stricher F., Martin L., Decke J.M, Majeed S., Barthe P., Hendrickson W.A., Robinson J., Roumestand C., Sodroski J., Wyatt R., Shaw G.M., Vita C., Kwong P.D.

- Scorpion-Toxin Mimics of CD4 in Complex with Human Immunodeficiency Virus gp120: Crystal Structures, Molecular Mimicry, and Neutralization Breadth. *Structure*, May 2005, 13, 755-768.
- ✓ Huang Y., Leobandung W., Foss A., *et al.* Molecular aspects of muco and bioadhesion: tethered structures and site-specific surfaces. *J. Control. Release* 2000, 65, p 63-71.
 - ✓ Hussain A., Ahsan F. The vagina as a route for systemic drug delivery. *J. Control. Release* 2005, 103, 301–313.
 - ✓ Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. Drug release from biodegradable injectable thermosensitive hydrogel of PEG-PLGA-PEG triblock copolymers. *J. Control. Release* 2000, 63 (1-2), 155-163.
 - ✓ Jeong B., Bae Y.H., Kim S.W. Thermoreversible gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions. *Macromolecules*, 1999, vol. 32, p 7064-7069.
 - ✓ Jeong B., Bae Y.H., Lee D.S., *et al.* Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems. *Nature* 1997, 388, 860-862.
 - ✓ Jeong B., Kim S.W., Bae Y.H. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 1937-1951.
 - ✓ Jeong S.H., Huh K.M., Park K. Hydrogel Drug Delivery systems. *Polymers in drug delivery*, by Taylor & Fancis Group. LLC 2006. pp 49-62
 - ✓ Johnston T.P., Miller S.C. Toxicological evaluation of poloxamer vehicles for intramuscular use. *J. Parent. Sci. Technol* 1985, 39, 83-88.
 - ✓ Jones D.S., Lawlor M.S., Woolfson A.D. Rheological and mucoadhesive characterization of polymeric systems composed of poly (methylvinylether-co-maleic anhydride) and poly(vinylpyrrolidone), designed as platforms for topical drug delivery. *J. Pharm. Sci.* 2003, 92, 995-1007.

- ✓ Junginger H.E., Thanou M., Verhoef J.C. Mucoadhesive hydrogels in drug delivery. J. Swarbrick (Ed.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, Marcel Dekker, New York 2002, 1848–1863.
- ✓ Justin-Temu M., Damian F., Kinget R., *et al.* Intravaginal gels as drug delivery systems. J. Womens Health (Larchmt.), 2004, 13, 834–844.
- ✓ Karim Q.A., Karim S.S., Frohlich J.A. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. Science. 2010, 329 (5996), 1168-1174.
- ✓ Katakam M., Ravis W., Banga A.K. Controlled release of human growth hormone in rats following parenteral administration of poloxamers gels. J. Control. Release 1997, 49, 21-26.
- ✓ Katz M.H, Gerberding J.L., Postexposure Treatment of People Exposed to the Human Immunodeficiency Virus through Sexual Contact or Injection-Drug Use. N. Engl. J. Med. 1997, 336, 1097-1100.
- ✓ Kawasaki N., Ohkura R., Miyazaki S., *et al.* Thermally reversible xyloglucan gels as vehicles for oral drug delivery. Int. J. Pharm. 1999, 181, 227–234.
- ✓ Keeffe J. R., Gnanapragasam P. N. P., Gillespie S. K., Yong J., Bjorkman P. J., and Mayo S. L. Designed oligomers of cyanovirin-N show enhanced HIV neutralization. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011, 108(34), 14079-14084.
- ✓ Khanna K.V., Whaley K.J., Zeitlin J., Moench T.R., Mehrazar K., Cone R.A., Liao Z., Hildreth J.E.K., Hoen T.E., Shultz L. and Markham R.B. Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. J. Clin. Invest. 2002, 2, 205–211.
- ✓ Khanvilkar K., Donovan M.D., Flanagan D.R. Drug transfer through mucus. Adv. Drug Deliv. Rev. 2001, 48, 173–193.

- ✓ Kieweg S.L, Katz D.F. Interpreting Properties of Microbicide Drug Delivery Gels: Analysing Deployment Kinetics due to Squeezing. *J. Pharm. Sci* 2007, 96(4), 835-850.
- ✓ Kim K.W., Thomas R.L., Lee C., *et al.* Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and o-carboxymethylated chitosan. *J. Food Prot.* 2003, 66, 1495-1498.
- ✓ Kim K-A, Yolamanova M., Zirafi O., Roan N.R., Staendker L., Forssmann W-G, Burgener A., Dejuq-Rainsford N., Hahn B.H., Shaw G.M., Greene W.C., Kirchhoff F., Münch J. Research Semen-mediated enhancement of HIV infection is donor-dependent and correlates with the levels of SEVI. *Retrovirology* 2010, 7, 55.
- ✓ Klouda L., Mikos A.G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 68, 34-45.
- ✓ Knysz B., Szetela B., Gladysz A. Pathogenesis of HIV-1 infection – chosen aspects. *HIV&AIDS review*, 2007, 6(7), 7-11
- ✓ Koffi A.A., Agnely F., Ponchel G., Grossiord J.L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur. J. Pharm.Sci.* 2006, 27, 328-335.
- ✓ Koffi, A.A. Développement de formes pédiatriques rectales contenant des sels de quinine et indiquées dans le traitement des accès palustres chez les enfants. Kablan, Brou Jérôme, Grossiord, Jean Louis. 2005.179 f. Thèse de doctorat : Pharmacie : Université de Cocody (RCI)/Paris-Sud 11: 2005.
- ✓ Koffi, A.A., Agnely, F., Besnard M., Kablan brou J., Grossiord J.L. Ponchel G. *In vitro* and *in vivo* characteristics of a thermogelling and bioadhesive delivery system intended for rectal administration of quinine in children. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008, 69 (1), 167-175.
- ✓ Lackner A. and Veazey R.S. Current Concepts in AIDS Pathogenesis: Insights from the SIV/Macaque Model. *Annual Review of Medicine* 2007, 58, 461-476.

- ✓ Lai S.K., Hida K., Shukair S., Wang Y.Y., Cone R., Hope T.J., Hanes J. HIV is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J. Virol.* 2009a, 83, 11196-11200.
- ✓ Lai S.K., O'Hanlon E.D., Harrold S., Man S.T., Wang Y.Y., Cone R., Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in undiluted human cervical vaginal mucus. *Proc Natl Acad Sci US A.* 2007, 104(5),1482-1487.
- ✓ Lai S.K., Wang Y.Y., Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 61(2), 158-171
- ✓ Lai S.K., Wang Y-Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009b, 61,158-171.
- ✓ Langenberg A. Interrupting herpes simplex virus type 2 transmission: the role of condoms and microbicides. *Herpes* 2004, 11, 147A–154A.
- ✓ Lard-Whiteford S.L., Matecka D., O'Rear J.J., Yuen I.S., Litterst C., Reichelderfer P. □ Recommendations for the Nonclinical Development of Topical Microbicides for Prevention of HIV Transmission: An Update. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2004, 36, 541–552.
- ✓ Lawrence P., Zimmer A., Paul S. HIV-1 mucosal infection: Mechanisms, consequences and vaccinal perspectives. *Revue francophone des laboratoires* 2009b, 39 (410), 45-54.
- ✓ Lederman M.M., Offord R.E., and Hartley O. Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV. *Nature Publishing Group* 2006, 6, 371-382.
- ✓ Lee D.S., Shim M.S., Kim S.W., Lee H., Park I., Chang T. Novel Thermoreversible Gelation of Biodegradable PLGA-block-PEO-block-PLGA Triblock Copolymers in Aqueous Solution. *Macromol. Rapid Commun.* 2001, 22, 587-592.
- ✓ Lee K. HIV impact – A Closing the Gap Newsletter, US Dept of Health and Human Services, spring 2000.

- ✓ Liu X, Lagenaur L.A., Simpson D.A., Essenmacher K.P., Frazier-Parker C.L., Liu Y., Tsai D, Rao S.S., Hamer D.H., Parks T.P., Lee P.P., Xu Q. Engineered Vaginal Lactobacillus Strain for Mucosal Delivery of the Human Immunodeficiency Virus Inhibitor Cyanovirin-N. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50(10), 3250-3259.
- ✓ Lyerly A.D, Little M.O., Faden R. The second wave: Toward responsible inclusion of pregnant women in research. *Int J Fem Approaches Bioeth.* 2008, 1(2), 5–22.
- ✓ Malcolm R.K., Edwards K-L, Kiser P., Romano J., Smith T.J. Advances in microbicide vaginal rings. *Antiviral Res.* 2010, 88S, S30-S39. Mantell J.E., Stein Z.A., and Susser I. Women in the time of AIDS: barriers, bargains, and benefits. *AIDS Educ. Prev.* 2008, 20(2), 91–106.
- ✓ Martin G., Burke B., Thai R., Dey A.K., Combes O., Ramos O.H.P., Heyd B., Geonnotti A.R., Montefiori D.C., Kan E., *et al.* Stabilization of HIV-1 envelope in the CD4-bound conformation through specific cross-linking of a CD4 mimetic. *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 21706-21716.
- ✓ Martin L., Stricher F., Missé D., *et al.* Rational design of a CD4 mimic that inhibits VIH-1 entry and exposes cryptic neutralization epitopes. *Nat. Biotechnol.* 2003, 43, 71-76.
- ✓ Mauck C.K., Weiner D.H., Ballagh S., *et al.* Single and multiple exposure tolerance study of polystyrene sulfonate gel: a phase I safety and coloscopy study. *Contraception* 2004a, 70, 77-83.
- ✓ Mauck C.K., Weiner D.H., Creinin M.D., Barnhart K.T., Callahan M.M., Bax R. A randomized Phase I vaginal safety study of three concentrations of C31G vs. Extra Strength Gynol II. *Contraception* 2004b, 70 (3), 233-240
- ✓ Mbopi-Keou F-X, Trottier S., Omar R.F., Nkele N.N., Fokoua S., Mbu E.R., Domingo M-C., Giguère J-F, Piret J., Mwatha A., Mâsse B., Bergeron M.G. A randomized, double-blind, placebo-controlled Phase II extended safety study of two Invisible Condom® formulations in Cameroonian women. *Contraception* 2010, 81, 79-85.

- ✓ McCarthy T.D., Karellas P., Henderson S.A., *et al.* Dendrimers as drugs: discovery and preclinical and clinical development of dendrimerbased microbicides for VIH and STI prevention. *Mol. Pharm.* 2005, 2, 312–318.
- ✓ McGowan I. Microbicides: A new frontier in HIV prevention. *Biologicals* 2006, 34 (4), 241-255.
- ✓ Medaglini D., Rush C.M., Sestini P., Pozzi G. Commensal bacteria as vectors for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: Vaginal colonization with recombinant streptococci induces local and systemic antibodies in mice. *Vaccine* 1997, 15 (12-13), 1330-1337.
- ✓ Meignant C., Vieillard-Baron C., Verdier S. Synergistic pharmaceutical combination containing imidazole derivatives for locally treating vulvovaginitis and vaginosis. WO 99-FR973 1999, p 199.
- ✓ Mesquita P.M.M., Cheshenko N., Wilson S.S., Mhatre M., Guzman E., Fakioglu E., Keller M.J. and Herold B.C. Disruption of Tight Junctions by Cellulose Sulfate Facilitates HIV Infection: Model of Microbicide Safety. *J. Infect. Dis.* 2009, 200 (4), 599-608.
- ✓ Miyazaki S., Suzuki S., Kawasaki N., *et al.* In situ gelling xyloglucan formulations for sustained release ocular delivery of pilocarpine hydrochloride, *Int. J. Pharm.* 2001, 229, 29–36.
- ✓ Montagnier L. 25 years after HIV discovery: Prospects for cure and vaccine. *Virology* 2010, 397, 248-254
- ✓ Montagnier L., Gruest J., Chamaret S., Dauguet C., Axler C., Guetard D., Nugeyre M.T., Barre-Sinoussi F., Chermann J.C., Bruner J.B., Klatzman D, Gluckman J.C. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoïde cell Lines. *Science* 1984, 225, 63-66.
- ✓ Moore J.P., Shattock R.J. Preventing HIV-1 sexual transmission-not sexy enough science, or no benefit to the bottom line? *J. Antimicrob. Chemother.* 2003, 52(6), 890-892.

- ✓ Moroshita M., Barichello J.M., Takayama K. Pluronic® F-127 gels incorporating highly purified unsaturated fatty acids for buccal delivery of insulin. *Int. J. Pharm.*, 2001, 212, 289-293.
- ✓ Morrow K.M., Hendrix C. Clinical evaluation of microbicide formulations. *Antiviral Res.* 2010, 88S, S40-S46.
- ✓ Mumper R.J., Bell M.A., Worthen D.R., Cone R.A., Lewis G.R., and Moench T.R. Formulation of a sulfonated Anti-viral Dendrimer in a Vaginal Microbicidal gel having Dual Mechanisms of Action. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2009, 35(5), 515-524.
- ✓ Ndesendo V.M.K, Pillay V., Choonara Y.E., Buchmann E., Bayever D.N., Meyer L.C.R. A review of current Intravaginal Drug Delivery Approaches employed for the Prophylaxis of HIV/AIDS and Prevention of Sexually Transmitted Infections. *AAPS PharmSciTech.* 2008, 9(2), 505-519.
- ✓ Neyts J., Kristmundsdottir T., De Clercq E., *et al.* Hydrogels containing monocaprin prevent intravaginal and intracutaneous infections with HSV-2 in mice: impact on the search for vaginal microbicides. *J. Med. Virol.* 2000, 61, 107–110.
- ✓ Nuttall J.P., Thake D.C., Lewis M.G., Ferkany J.W., Romano J.W., Mitchnick M.A. Concentrations of Dapivirine in the Rhesus Macaque and Rabbit following Once Daily Intravaginal Administration of a Gel Formulation of [14C]Dapivirine for 7 Days. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008,52(3), 909-914.
- ✓ Offner III M.C., Kleth-Gelotte C.M. Gels and jellies. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 2002. By Marcel Dekker.

Inc.Online:file:///G:/Encyclopedia%20of%20Pharmaceutical%20technology/Articles/Gels%20and%20jellies.pdf Consulté en 2012.

- ✓ Oh Y-K., Park J-S., Yoon H., *et al.* Enhanced mucosal and systemic immune responses to a vaginal vaccine coadministered with RANTES-expressing plasmidDNA using in situ-gelling mucoadhesive delivery system. *Vaccine* 2003, 21, 1980-1988.
- ✓ Omar R. F., Bergeron M. G. Press release: M2010 Researchers present more findings for microbicides, PrEP at M2010 Conference. International Microbicides Conference 2010. Pittsburgh, PA, USA. May 25, 2010. Available at: <http://www.thebody.com/content/news/art56762.html> (accessed May 27, 2010)
- ✓ Omar R.F., Bergeron M.G. The future of microbicides. *Int. J. Infect. Dis.* 2011, 15, e656-e-660.
- ✓ Omar R.F., Trottier S., Brousseau G., Lamarre A., Gagnon A., Bergeron M.G. Distribution of a vaginal gel (Invisible Condom®) before, during and after simulated sexual intercourse and its persistence when delivered by two different vaginal applicators: a magnetic resonance imaging study. *Contraception* 2008, 77, 447-455.
- ✓ OMS Organisation Mondiale de la Santé, <http://www.who.int/hiv/data/en/>
- ✓ Owen D.H., Katz D.F. A review of physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* 2005, 26, 459-469.
- ✓ Owen D.H., Peters J.J., Katz D.F., *et al.* Rheological properties of contraceptive gels. *Contraception* 2000, 62, 321-326.
- ✓ Owen, DH, Katz, DF. A vaginal fluid simulant. *Contraception* 1999, 59 (2), 91–95.
- ✓ Palliser D., Chowdhury D., Wang Q.Y., Lee S.J., Bronson R.T., Knipe D.M., *et al.* An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus2 infection. *Nature* 2006, 439(7072), 89-94.
- ✓ Patton D.L., Cosgrove S.Y.T., Balkus J.E., rohan L.C., Moncla B.J., Parniak M.A., and Hillier S.L. Preclinical Safety Assessments of UC781 Anti-Human Immunodeficiency Virus Topical Microbicide Formulations. *Antimicrob. Agents Chemother.* May 2007, 1608-1615.

- ✓ Patton D.L., Cosgrove S.Y.T., McCarthy T.D., Hillier S.L. Preclinical safety and efficacy assessments of dendrimer-based (SPL7013) microbicide gel formulations in a nonhuman primate model. *Antimicrob. Agents Chemother* May 2006a, 50(5), 1696-700.
- ✓ Patton D.L., Sweeney Y.T.C., Balkus J.E., Hillier S.L. Vaginal and Rectal Topical Microbicide Development: Safety and Efficacy of 1.0% Savvy (C31G) in the Pigtailed Macaque. *Sex. Transm. Dis.* 2006b, 33(11), 691–695.
- ✓ Pavelic Z., Skalko-Basnet N., Filipovic-Grcic J., Martinac A., Jalsenjak I. Development and *in vitro* evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J. Control. Release* 2005, 106 (1-2), 34-43.
- ✓ Perotti M.E., Pirovano A., Phillips D.M. Carrageenan formulation prevents macrophage trafficking from vagina : implications for microbicide development. *Biol. Reprod.* 2003, 69, 933-939.
- ✓ Pifferi, G., Restani, P. The safety of pharmaceutical excipients. *Farmaco*, 2003, 58, 541-550.
- ✓ Pilcher H. Starting to gel. *Nature*, 2004, 430, 138–140.
- ✓ Pirrone V, Wigdahl B., Krebs F.C. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res.* 2011, 90, 168-182.
- ✓ Ponchel G., Irache J-M.. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 34, 191-219.
- ✓ Ponchel G., Montisci M-J., Dembri A., *et al.* Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastro-intestinal tract. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1997, 44, 25-31.
- ✓ Prista L.N., Alves A.C., Morgado R. *Tecnologia Farmacêutica*, vol.III, 4th ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996, 1585–1594.
- ✓ Qiu L.I., Bae Y.H. Polymer Architecture and Drug Delivery. *Pharma. Res.* 2006, 23(1), 1-29.

- ✓ Ramsey P.S., Ogburn P.L., Harris D.Y., Heise R.H., Ramin K.D. Effect of vaginal pH on efficacy of the dinoprostone gel for cervical ripening/labor induction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2002, 187, 843–846.
- ✓ Richardson B.A. Nonoxynol-9 as a vaginal microbicide for the prevention of sexually transmitted infections: it's time to move on. *JAMA* 2002, 287, 1171-1172.
- ✓ Richardson J.L., Illum L. The vaginal route of peptide and protein drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1992, 8, 341–366.
- ✓ Richardson J.L., Trever T.I. Vaginal delivery of calcitonin by hyaluronic acid formulations. *Drugs. Pharm. Sci.* 1999, 98, 563-599.
- ✓ Roddy R.E., Zekeng L., Ryan K.A., Tamoufe U., Tweedy K.G. Effect of nonoxynol-9 gel on urogenital gonorrhea and chlamydial infection: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, 287, 1117–1122.
- ✓ Rodriguez Shaun Kevin, Ph.D. Human immune response correlates of attenuated HIV-2 pathogenesis Harvard University, 2007, 128 p; AAT 3265075.
- ✓ Rohan L.C., Ratner D., McCullough K., Hiller S.L., Gupta P. Measurement of Anti-HIV Activity of Marketed Vaginal Products and Excipients Using a PBMC-Based *in Vitro* assay. *Sex. Transm. Dis.* March 2004, 31(3), 143-148.
- ✓ Rohan L.C., Sassi A.B. Vaginal Drug Delivery for HIV Prevention. *AAPS J.* 2009, 11(1), 78-87.
- ✓ Ron E.S., Bromberg L., Luczak S., *et al.* Hydrogel: a novel mucosal delivery system. *Pro. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 1997, 24, 407-408.
- ✓ Ron E.S., Roos E.J., Staples, A.K., *et al.* Interpenetrating polymer networks for sustained dermal delivery. *Proc. Int. Symp. Control. Rel. Mater.* 1996, 23, 128-129.
- ✓ Roques C., Fattal E., Fromes Y. Comparison of toxicity and transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and polycationic polymers in striated muscles. *J. Gene Med.* 2009, 11(3), 240–249.

- ✓ Rossi L. Using ARVs to prevent VIH could result in drug resistance if routine screening is not done. Press release at the Microbicides 2010 conference, Pittsburgh, PA, USA 24 May 2010. http://www.eurekalert.org/pub_releases/2010-05/m2c-uat052010.php. Page accessed on May 31, 2010
- ✓ Roy, S., Gourde, P., Piret, J., *et al.* Thermoreversible gel formulations containing sodium lauryl sulfate or n-Lauroylsarcosine as potential topical microbicides against sexually transmitted diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, 45, 1671–1681.
- ✓ Ruel-Gariépy E., Leroux J.C. In situ-forming hydrogels – review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 58, 409–426.
- ✓ Ruel-Gariépy, E., Chenite, A., Chaput, C., *et al.* Characterization of thermosensitive chitosan gels for the sustained delivery of drugs. *Int. J. Pharm.* 2000, 203, 89–98.
- ✓ Sandri G., Rossi S., Ferrari F., Bonferoni M.C., Muzzarelli C., Caramella C. Assessment of chitosan derivatives as buccal and vaginal penetration enhancers. *Eur. J. Pharm.Sci.* 2004, 21 (2-3), 351-359.
- ✓ Sarkar, N. Thermal gelation properties of methyl and hydroxypropylmethylcellulose. *J. Appl. Polym. Sci.* 1979, 24, 1073-1087.
- ✓ Scordi-Bello I.A., Mosoian A., He C., Chen Y., Cheng Y., Jarvis G.A., Keller M.J., Hogarty K., Waller D.P., Profy A.T., Herold B.C. and Klotman M.E. Candidate Sulfonated and Sulfated Topical Microbicides: Comparison of Anti-Human Immunodeficiency Virus Activities and Mechanisms of Action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005, 49(9), 3607-3615.
- ✓ Shacklett B.L. Can the New Humanized Mouse Model Give HIV Research a Boost? *PLoS Med.* 2008, 5(1), e13.
- ✓ Sharp P.M., Hahn B.H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspec Med* 2011.doi: 10.1101/cshperspect.a006841.

- ✓ Shattock RJ, Moore JP. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat. Rev. Microbiol.* 2003, 1, 25-34.
- ✓ Simoes J.A., Bahamondes L.G., Camargo R.P.S., Alves V.M.N., Zaneveld L.J.D., Waller D.P., Schwartz J., Callahan M.M., Mauck C.K. A pilot clinical trial comparing an acid-buffering formulation (ACIDFORM gel) with metronidazole gel for the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2006, 61(2), 211–217.
- ✓ Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 2007, 25 (1), 99-121.
- ✓ Skoler-Karpoff S., Ramjee G., Ahmed K., Altini L., Plagianos M.G., Friedland B., Govender S., De Kock A., Cassim N., Palanee T., Dozier G., Maguire R., Lahteenmaki P. Efficacy of Carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008, 372 (9654), 1977–1987.
- ✓ Smart J.D., Kellaway P.W. Worthington H.E.C. An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36, 295-299.
- ✓ Smart, J.D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57, 1556-1568.
- ✓ Srivastava I.K., Stamatatos L., Kan E., et al. Purification, Characterization, and Immunogenicity of a Soluble Trimeric Envelope Protein Containing a Partial Deletion of the V2 Loop Derived from SF162, an R5-Tropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolate. *J. virol.* 2003, 77(20), 11244-11259.
- ✓ Stenchever, M.A., Droegemueller, W., Herbst, A.L., Mishell Jr., D.R. *Comprehensive Gynecology*, 4th ed. Mosby, St. Louis, MO, 2002. p 43–44.
- ✓ Stricher F. Développement d'inhibiteurs peptidiques de l'interaction CD4-GP120, exposant des épitopes neutralisants du VIH-1. Vita, Claudio. 2004.190 f. Thèse de doctorat: Sciences. : Paris-Sud 11: 2004.

- ✓ Stricher, F., Martin, L., Barthe, P., *et al.* A high-throughput fluorescence polarization assay specific to the CD4 binding site of VIH-1 glycoproteins based on a fluorescein-labelled CD4 mimic. *Biochem. J.* 2005, 390, 29-39.
- ✓ Tabet S.R., Callahan M.M., Mauck C.K. *et al.* Safety and acceptability of penile application of 2 candidate topical microbicides: BufferGel and PRO 2000 gel: 3 randomized trials in healthy low-risk men and HIV-positive men. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2003, 33, 476–83.
- ✓ Takahashi, A., Suzuki, S., Kawasaki, N., *et al.* Percutaneous absorption of non-steroidal anti-inflammatory drugs from in situ gelling xyloglucan formulations in rats. *Int. J. Pharm.* 2002, 246, 179–186.
- ✓ Tang B.T., Dawson M., Lai S.K., Wang Y.Y., Suk J.S., Yang M., Zeitlin P.L., Boyle M.P., Fu J., Hanes J. Biodegradable polymer nanoparticles that rapidly penetrate the human mucus barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009, 106 (46), 19268-73
- ✓ Tevi-Bénissan C., Bélec L., Lévy M., Schneider-Fauveau V., Si Mohamed A., Hallouin M.C., Matta M., Grésenguet G. *In vivo* semen-associated pH neutralization of cervicovaginal secretions. *Clin Vaccine Immunol.* 1997,4(3), 367-374.
- ✓ Thormar H., Bergsson G., Gunnarsson E., *et al.* Hydrogels containing monocaprin have potent microbicidal activities against sexually transmitted viruses and bacteria *in vitro*. *Sex. Transm. Infect.* 1999, 75, 181–185.
- ✓ Trottier S., Omar R.F, Désormeaux A., Drouin J., Gagnon M.T., *et al.* Safety, tolerance and acceptability of the Invisible Condom and its vaginal applicator in healthy women and their male sexual partners. *Contraception* 2007, 76(2), 117-125.
- ✓ Tsai C.C., Emau P., Jiang Y., Agy B.M., Shattock R.J., Schmidt A., Morton W.R., Gustafson K.R., and Boyd M.R. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2004, 20(1), 11-18.

- ✓ Tsai C.C., Emau P., Jiang Y., Tian B., Morton W.R., Gustafon K.R., *et al.* Cyanovirin-N gel as a topical microbicide prevents rectal transmission of SHIV89.6P in macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 2003, 19(7), 535-541.
- ✓ Valenta C. The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005, 57(11), 1692-1712.
- ✓ Valenta C., Kast C.E., Harich I., *et al.* Development and *in vitro* evaluation of a mucoadhesive vaginal delivery system for progesterone. *J. Control. Release*, 2001, 77, 323-332.
- ✓ Van Damme L., Adriens E. and Ramjee G. The evaluation of the local tolerance of vaginal formulations with or without nonoxynol-9 using the slug mucosal irritation test. *Contraception* 2002a, 66(5), 369–375.
- ✓ Van Damme L., Govinden R., Mirembe F.M., Guedou F., Salomon S., Becker M.L., *et al.* Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *N. Engl. J. Med.* 2008, 359, 463-472.
- ✓ Van Damme L., Ramjee G., Alary M., Vuylsteke B., Chandeying V., Rees H., *et al.* Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002b, 360, 971-977.
- ✓ Van Damme P., Martens L., Van Damme J., Hugelier K., Staes A., Vandekerckhove J., Gevaert K. Caspase-specific and nonspecific *in vivo* protein processing during Fas-induced apoptosis. *Nat. Methods* 2005, 2, 771 – 777.
- ✓ Van Herrewege Y., Michiels J., Waeytens A., De Boeck G., Salden E., Heyndrickx L., van den Mooter G., (...), Vanham G. A dual chamber model of female cervical mucosa for the study of HIV transmission and for the evaluation of candidate HIV microbicides. *Antiviral Res.* 2007a, 74 (2), 111-124.

- ✓ Van Herrewege Y., Morellato L., Descours A., Aerts L., Michiels J., Heyndrickx L., Martin L., Vanham G. CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides. *Journal of antimicrobial therapy* 2007b, 61,818-826.
- ✓ Veazey R.S. Microbicide Safety/Efficacy studies in animals-macaques and small animal models. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2008, 3(5), 567-573. Available in PMC 2009 september 1.
- ✓ Veazey R.S., Ling B., Green L.C., Ribka E.P., Lifson J.D., Michael Piatak Jr.M., Lederman M.M., Mosier D., Offord R. and Hartley O. Topically Applied Recombinant Chemokine Analogues Fully Protect Macaques from Vaginal Simian-Human Immunodeficiency Virus Challenge. *J. Infect. Dis.* 2009, 199 (10), 1525-1527.
- ✓ Vermani K., Garg, S. The scope and potential of vaginal drug delivery. *Pharm. Sci. Technol*, 2000, vol. 3, p 359–364.
- ✓ VIDAL <http://www.vidal.fr/> Consulté en 2012.
- ✓ Vita C., Drakopoulou E., Vizzavona *et al.*. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with VIH-1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96(23), 13091-6.
- ✓ Wang Y., Lee C.H. Characterization of a female controlled drug delivery system for microbicides. *Contraception* 2002, 66, 281–287.
- ✓ Wang Y., Lee C.H. Effects of intrinsic variables on release of sodium dodecyl sulfate from a female controlled drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 2004, 282 (1-2), 173-181.
- ✓ Wasan K.M, Subramanian R, Kwong M., Goldberg I.J, Wright T., Johnston T.P., Poloxamer 407-mediated alterations in the activities of enzymes regulating lipid metabolism in rats. *J. Pharm. Sci.* 2003, 6(2), 189–197.
- ✓ Watson K.M., Buckheit C.E., Buckheit Jr. R.W. Comparative evaluation of virus transmission inhibition by dual-acting pyrimidinedione microbicides using the microbicide transmission and sterilization assay. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008. 52 (8), 2787–2796.

- ✓ Weber J., Desai K., Darbyshire J.. The development of vaginal microbicides for the prevention of HIV transmission. *PLoS Med* 2005, 2, e142.
- ✓ Weeks MR, Mosack K.E., Abbott M., Sylla L.N., Valdes B., Prince M. Microbicide acceptability among high-risk urban U.S. women: experiences and perceptions of sexually transmitted HIV prevention. *Sex. Transm. Dis.* 2004, 31, 682-690.
- ✓ Wege A.K., Melkus M.W., Denton P.W., Edteset J.D., Garcia J.V. Functional and Phenotypic Characterization of the Humanized BLT Mouse Model. *Humanized mice. Curr Top Microbiol Immunol.* 2008, 324, 149-165.
- ✓ Wenzel J.G., Balaji K.S., Koushik K., Navarre C., Duran S.H., Rahe C.H., Kompella U.B. Pluronic F127 gel formulations of deslorelin and GnRH reduce drug degradation and sustain drug release and effect in cattle. *J. Control. Release* 2002, 85 (1-3), 51-59.
- ✓ Whaley K.J, Hanes J., Shattock R., Cone R.A., Friend D.R. Novel Approaches to vaginal Delivery and Safety of Microbicides: Biopharmaceuticals, Nanoparticles, and Vaccines. *Antiviral Res.* 2010, 88S, S55-S66.
- ✓ Wilkinson D. Nonoxynol-9 fails to prevent STDs, but microbicide research continues. *Lancet*, 2002, vol. 360, p 962–963.
- ✓ Witvrouw M., Declercq E. Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs. *Gen. Pharmacol.*, 1997, vol. 29, p 497-511.
- ✓ Woolfson A.D., Malcolm R.K., Morrow R.J., Toner C.F., McCullagh S.D. Intravaginal ring delivery of the reverse transcriptase inhibitor TMC 120 as an HIV microbicide. *Int. J. Pharm.* 2006, 325,82–89.
- ✓ Woolfson A.D., Umrethia M.L., Kett V.L., Malcolm R.K. Freeze-dried, mucoadhesive system for vaginal delivery of the HIV microbicide, dapivirine: Optimisation by an artificial neural network. *Int. J. Pharm.* 2010, 388 (1-2), 136-143.

- ✓ Yun, M-O., Choi, H-G., Jung, J-H., *et al.* Development of a thermo-reversible insulin liquid suppository with bioavailability enhancement. *Int. J. Pharm.*, 1999, vol. 189, p 137-145.
- ✓ Zaneveld L.J., Waller D.P., Anderson R.A., *et al.* Efficacy and safety of a new vaginal contraceptive antimicrobial formulation containing high molecular weight poly(sodium 4-styrenesulfonate). *Biol. Reprod.* 2002, 66, 886–894

Travaux Expérimentaux

Chapitre II

Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids

(Eur. J. Pharm. Biopharm. 2010, 76, 296–303)

FORMULATION OF MUCOADHESIVE VAGINAL HYDROGELS INSENSITIVE TO DILUTION WITH VAGINAL FLUIDS

Armelle AKA-ANY-GRAH^{a,b}, Kawthar BOUCHEMAL^{a*}, Armand KOFFI^a, Florence AGNELY^a,
Min ZHANG^c, Madeleine DJABOUROV^c, Gilles PONCHEL^a

a. Université Paris-Sud 11, UMR CNRS 8612 « Physicochimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie », Faculté de Pharmacie, 5, Rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France.

b. Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacocinétique, UFR des sciences pharmaceutiques et Biologiques d'Abidjan, 01 BP V 34 Abidjan 01, Téléx 26138 Côte d'Ivoire.

c. Laboratoire de Physique Thermique, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231 Paris cedex 05, France.

*Corresponding author: kawthar.bouchemal@u-psud.fr

France. Tel : +33 (0)1 46 83 55 81. Fax : +33 (0)1 46 61 93 34.

Abstract

The main objective of this work was to design thermosensitive and mucoadhesive vaginal hydrogels able to keep their rheological and mucoadhesive properties after dilution with vaginal fluids. Formulations were composed of pluronic F127 or a mix of two pluronics F127 and F68. Both formulations contained hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as mucoadhesive polymer. The determination of gelling temperature (T_{gel}) after dilution with simulated vaginal fluid (SVF) demonstrated that hydrogels were resistant to dilution and T_{gel} values were close to 30°C. *Ex vivo* mucoadhesion experiments conducted on porcine vaginal mucosa founded on the technique of traction of the adhesive/adherent joint allowed the characterization of mucoadhesive properties of hydrogels by measuring work of adhesion (W) and maximum force of detachment (F_{max}). In the case of F127-based hydrogels, W and F_{max} were lowered after dilution with SVF. However, in the case of F127/F68-based hydrogels, W , F_{max} and mucoadhesion profiles were weakly affected by dilution. These differences could be attributed to the higher elasticity of F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 % w/w) hydrogel in comparison with F127/HPMC one (20/1 % w/w). Indeed, rheological analyses of the formulations showed that, both elastic (G') and viscous moduli (G'') were higher for F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 % w/w) than for F127/HPMC hydrogel (20/1 % w/w). However, we demonstrated that the higher elasticity of the hydrogel was due to the higher total pluronic concentration and not to the presence of F68 in the formulation.

Keywords: Thermogelling system, vaginal hydrogels, mucoadhesion, pluronic.

1. Introduction

The presence of dense network of blood vessels, the avoidance of the first-pass effect and the relatively high permeability to a wide range of drugs such as peptides and proteins [1-3] have made the vagina as excellent route of drug delivery for both systemic and local applications [4-7]. The vaginal route offers a favorable alternative to the parenteral route for some drugs such as bromocriptine [8, 9], propranolol [10], oxytocin [11, 12], and hormones [13-15]. Furthermore, vaginal administration of hydrogels can exhibit a local action in the case of vaginal microbicides. These hydrogels containing the active drug can be self-administered by women before intercourse. They can form a barrier against pathogen entry. It has been demonstrated that the vaginal administration of gels allowed the prevention of infection with viruses such as the human immunodeficiency virus (HIV-1) and other sexually transmitted infections [16-17].

However, despite all these advantages, vaginal gels will be diluted with vaginal fluids after their *in vivo* administration resulting in a modification of rheological and mucoadhesive properties [19, 20]. The residence time in the genitourinary tract of these formulations is hence shortened owing to the self-cleansing action of the vagina and the dilution with vaginal fluids. The efficacy of the formulations could be limited making a frequent dosing regimen necessary. In this context, it is believed that vaginal therapy can be significantly improved by increasing the residence time of the formulation in the vagina. This can be achieved by the development of mucoadhesive gels able to keep their rheological and mucoadhesive behaviours even after dilution with vaginal fluids. The adhesion of pharmaceutical formulations to the mucosal tissue offers the possibility of creating an intimate and prolonged contact to the vagina and to improve patient compliance by reducing the frequency of administration.

Particularly, vaginal hydrogels based on block copolymers are receiving a great deal of interest as vaginal delivery systems [6, 21, 22]. Among block copolymer-based hydrogels, pharmaceutical

formulations composed of (ethylene oxide)_a(propylene oxide)_b(ethylene oxide)_a block copolymers known under the generic name of poloxamers and the trade name of pluronics, present both thermosensitive and mucoadhesive properties which make them very interesting for the development of vaginal delivery devices. By contrast, most of previous research works have developed pluronic-based hydrogels intended for vaginal drug delivery without considering the effect of dilution with vaginal fluids on the variation of gelling temperature, rheological and mucoadhesive properties of pluronic-based hydrogels.

The main objective of this work was to formulate vaginal delivery device based on thermosensitive and mucoadhesive pluronic hydrogels and to investigate the effect of dilution with vaginal fluids on gelling temperature, rheological behaviours and mucoadhesive properties. In the work to be presented here, formulations were composed of pluronic F127 (poloxamer P407, a: 97, b: 69) or a mix of two pluronics F127 and F68 (poloxamer P188, a: 80, b: 27). Gelling temperature can be modulated by changing F127 concentration or by varying the proportion between the two pluronics F127 and F68. Both formulations contained hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) as mucoadhesive polymer.

2. Experimental section

2.1. Materials

Pluronics F127 and F68 (European Pharmacopoeia 6th Edition 6.7) of pharmaceutical grade were a gift from BASF. According to the supplier, the weight average molecular weights (M_w) were about 13,500 g.mol⁻¹ (9,840-14,600 g.mol⁻¹) and 8,400 g.mol⁻¹ (7,680-9,510 g.mol⁻¹) for pluronic F127 and F68 respectively. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (Methocel[®] K4M series MM87091702 K) was a gift from Colorcon. All other reagents were supplied by Sigma-aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were of analytical grade.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of citrate buffer

One of the exigencies of the vaginal formulations is the pH. The pH of vaginal hydrogels has to be in the range of 4-5. For this purpose, we make choice to use citrate buffer prior to distilled water in the aim to prevent pH variation of the formulations. Citrate buffer solution 5 mM at pH 4.5 was prepared by dissolving citric acid monohydrate (42 mg) and trisodium citrate dihydrtate (59 mg) in about 900 mL of distilled water. The volume of the solution was then completed to 1 L by distilled water.

2.2.2. Preparation of simulated vaginal fluid (SVF)

Vaginal fluid is the resultant of fluids that comes from several sources such as uterus, cervix, and sometimes menstrual secretions and sperm [19, 23]. Noteworthy, due to the limited quantity of human vaginal fluid, and its rapid degradation once collected from its source, researchers have developed a simulated vaginal fluid (SVF) [23]. SVF was prepared as previously described [23]. To 900 mL of distilled water contained in a beaker, NaCl (3.51 g), KOH (1.4 g), Ca(OH)₂ (0.22 g), bovine serum albumin (0.018 g), lactic acid (2.00 g), acetic acid (1.00 g), glycerol (0.16 g), urea (0.4 g), and glucose (5.00 g) were added and stirred mechanically until complete dissolution. The pH of the mixture was then adjusted to 4.5 using HCl and the final volume was adjusted to 1 L.

2.2.3. Preparation of hydrogels

Hydrogels were prepared by weight according to the so-called “cold method” by using a mixer equipped with a turbine adapted to the mixing of viscous preparations (Rayneri-turbotest, Rayneri, France) [24-26].

- For the preparation of pluronic-based hydrogels, the pluronic powders were gradually added under agitation (1000 rpm) at 4°C to a liquid phase which consisted on citrate buffer. For formulations containing F127 alone, the final concentration of pluronic in the hydrogel was varied as 15, 16, 17 and 20 % w/w. For the preparation of hydrogels composed of F127 and F68 mixture, the final concentration of pluronic was kept constant (20 % w/w) while the proportion of F127/F68 in the formulation was varied as 0/20, 10/10, 17/3, 18/2, 19/1 and 20/0 % w/w. The different preparations were denominated by two numbers indicating the w/w percentage of pluronic F127 and pluronic F68 respectively.
- For the preparation of formulations composed of F127/HPMC and F127/F68/HPMC, HPMC powder was gradually added under agitation (1000 rpm) at 4°C to a liquid phase which consisted on citrate buffer. After complete dissolution of HPMC, the pluronic powders were gradually added to this phase under the same conditions (agitation speed: 1000 rpm at 4°C). Preparations composed of F127/HPMC were denominated by two numbers indicating the % w/w of F127 and HPMC respectively. Preparations composed of F127/F68/HPMC were denominated by three numbers indicating the w/w percentage of pluronic F127, F68 and HPMC respectively.
- HPMC at a concentration of 1 % w/w was used as a control. The formulation was prepared by progressive solubilization of HPMC powder in citrate buffer solution at 4°C.

In all cases, after complete dissolution of pluronic and/or HPMC powders, each formulation was equilibrated 48 h at 4°C to eliminate foam and air bubbles.

2.2.4. Preparation of diluted hydrogels

Generally, current topical vaginal products are applied in volumes in the range of 2–5 mL. The volume of ambient fluid present in the vagina (vaginal fluid transudate and mucus) is approximately 0.5–0.75 mL [23]. To simulate the dilution of formulations that might occur after

application, we mixed 2 mL of each formulation with 0.25, 0.5 and 0.75 mL of SVF or citrate buffer, and tested the influence of the dilution on thermogelling, rheological and mucoadhesive properties of pluronic-based hydrogels.

2.2.5. Rheological evaluation of hydrogels

All rheological measurements were carried out on a CSL 100 controlled stress rheometer (Carri-Med, Rhéo Champlan, France) [24,25]. The geometry was a stainless steel cone/plate (diameter 40 mm, angle 2° and gap 54 μm), which provided a homogeneous shear of the sample. The cone was equipped with a solvent trap to limit evaporation during measurement. Thanks to Pelletier diodes which were placed in the lower plate, it was possible to perform temperature sweeps from 0 to 80°C with a precision of 0.1°C. Oscillatory (or dynamic) experiments were carried out. A sinusoidal shear was applied to the sample where the stress $\tau(t)$ and the strain $\gamma(t)$ were defined as follows:

$$\tau(t) = \tau_0 \cos(\omega t) \quad \text{Eq.1}$$

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cos(\omega t - \delta) \quad \text{Eq.2}$$

τ_0 and γ_0 are, respectively, the maximal amplitudes of the stress and strain, $\omega = 2\pi N$, with N the frequency and ω the shear pulsation, and δ is the phase angle stress/strain.

From the phase angle, one could define various dynamic viscoelastic quantities, and especially the elastic (or storage) modulus G' (Eq. 3) and the viscous (or loss) modulus G'' (Eq. 4).

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos \delta \quad \text{Eq.3}$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin\delta \quad \text{Eq.4}$$

The higher the G' value, the more pronounced the elastic character and conversely, the higher G'' , the more pronounced the viscous properties. The elastic modulus is a measure of the energy stored and recovered per cycle of deformation and reflects the solid-like component of elastic behaviour.

The oscillatory experiments were used mainly in order to determine the sol–gel transition temperature, by measuring the temperature for which G' underwent a critical variation and to characterize the gel texture beyond the gel point, by recording the G' variations as a function of the shear frequency N . These latter experiments were carried out under a stress value which belonged to the viscoelastic linear regime where G' remained invariant and where the sample did not undergo irreversible structural modifications.

All rheological results are the means of $n = 3$ experiments.

2.2.6. Micro-DSC

The measurements of micro-DSC were carried out with a calorimeter Micro-DSC III Setaram in the aim to determine the critical micellization temperature (CMT). The cells used to deposit the sample and the reference (distilled water) were the type batch (1 mL). Two empty cells with the caps were weighed after complete drying and the joints were chosen to obtain the same mass (± 0.2 mg). The sample and the reference should be introduced to the cells at room temperature and weighed for the identical mass (± 0.3 mg). After their insertions into the oven at room temperature, the temperature of the oven was reduced until 5°C with $1^\circ\text{C}/\text{min}$, and then we waited one hour at this constant temperature to equilibrate the thermal flow. The scan of temperature was performed at $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ until 70°C . After this, the oven should stay one hour at 70°C to balance the thermal flow before the beginning of fusion with $-0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ to 5°C .

The analysis of the enthalpograms led to the determination of the CMT according to the previously described and well known method [26].

2.2.7. Mucoadhesion experiments

a. Animals

The ethical and practical problems of using human tissues to study the mucoadhesion of therapeutic agents on genital mucosa have led to the development of a variety of model systems including *ex vivo* animal tissues. Among the larger experimental animals, the pig has the advantage of being remarkably similar to human in terms of anatomy, physiology, metabolism, and histology. Furthermore, many research works have reported that excellent correlation was found between human and porcine vaginal tissues [27, 28].

Experiments were carried out on female pigs (INRA Jouy en Josas - France) weighing between 60 and 63 kg in average. The animals were fasted for 24 hours but had free access to tap water. All experiments on animals adhered to the Communities Commission Directive (DE/86/609/CEE) and were performed in conformance with the French Ministry of Agriculture Permission No. 78-16.

Pigs were sacrificed by intravenous injection (20 mL) of overdosed sodium phenobarbital (Dolethal, Vetoquinol Laboratory, Lure, France) and the vaginal mucosa was taken over a 10 cm length. The mucosa was placed in SVF and stored at -20°C immediately after sacrifice of the animal and kept at this temperature until use. It has been shown that porcine mucosa can be frozen during storage without affecting the mucus layer [for review see 28]. Samples were defrosted before experiments at ambient temperature in the presence of SVF.

b. Mucoadhesion experimental procedure

The experimental procedure used for determining the mucoadhesion of hydrogels has been derived from a previously published method [24, 25]. Briefly, a hydrogel layer (10 mm in height) was placed in contact with a fragment of pig vaginal mucosa under thermostated conditions, thus forming an adhesive joint between the two surfaces. On one hand, a mucosal fragment was placed at the surface of a metallic plot. The external wall of the vaginal mucosa was secured on the muscular side with cyanoacrylate glue on a 14 mm in diameter metallic support. Finally, this metallic plot supporting the vaginal mucosal fragment was fasten to the mobile traverse of a texture analyzer (TAXT2, Rhéo distributor, Champlan, France).

On the other hand, a hollow plastic support (10 mm in depth) was filled with a preset amount of 3 g of the hydrogel to be studied and was used to maintain the thermogelified preparation during the experiment. Further, this support was immobilized in the texture analyzer apparatus and placed in such a position that a perfect contact could be created between the surface of the hydrogel and the mucous membrane. The whole system was then heated to 37°C thanks to a Pelletier diod, which ensured the gelation of the system.

After a preset contact time (2 min) under an initial contact strength (0.5 N) which were determined during preliminary experiments, the two surfaces were separated at a constant rate of displacement. The strength was recorded as a function of the displacement, which allowed to determine the maximal detachment force (F_{\max}), the work of adhesion (W) and other mucoadhesion parameters: deformation to failure (C), deformation to peak (A), and deformation peak to failure (B). These parameters were calculated from the force–elongation curve [29, 30] and considered as indicators of the mucoadhesive potential of the samples.

Finally, HPMC solution at a concentration of 1 % w/w was used as control.

All mucoadhesion results are the mean of $n=6$ experiments.

2.2.8. Statistical analysis

The results obtained were statistically analysed by using Mann–Whitney's t-test with a 95% confidence level ($p=0.05$).

3. Results and discussion

3.1. Effect of dilution of hydrogels with SVF on gelling temperature and re-formulation of hydrogels

Usually, the gelling temperatures of vaginal hydrogels are considered to be suitable if they were lower than human vaginal temperature (37.2 °C). If gelling temperature is higher than 37.2 °C, hydrogels will lose their gelling properties resulting in a leakage of the formulations from the vagina. In the present work, two strategies have been investigated to modulate gelling temperature. The first one consisted on the variation of F127 concentration in the formulations (15, 16, 17 and 20 % w/w) and the second one consisted on the variation of the proportion of F127 and F68 in the formulations (0/20, 10/10, 17/3, 18/2, 19/1, 20/0 % w/w).

The thermosensitive properties of hydrogels were evaluated by sol/gel transition temperature. The curve obtained with the different preparations is presented in figure 1. This curve is typical for pluronic systems because the elastic modulus, G' was very low at solution stage but increased drastically when gelling temperature is reached. As can be seen from the results in table 1, gelling temperature is monotonically decreased when the concentration of F127 was increased from 15 to 20 % w/w or when the proportion of F68 in the hydrogel is decreased from 20 to 0 % w/w. The two formulations which gelled in the desired temperature range were F127 (16 % w/w) and F127/F68 (18/2 % w/w).

The two previously selected formulations F127 (16 % w/w) and F127/F68 (18/2 % w/w) were diluted with SVF according to protocol described in section 2.2.4. However, as shown in figure 2, both formulations showed no gelation ($T_{gel} > 60^{\circ}\text{C}$) after their dilution. Dilution of F127 and F127/F68 formulations (16 % w/w and 18/2 % w/w respectively) with 0.75 mL of SVF resulted in a decrease of the total concentration of pluronics and consequently, a dramatic increase of gelling temperature. The two formulations of F127 at 16 % and F127/F68 at 18/2 % w/w were thus re-formulated in such a way they remain in the form of gel even after dilution with SVF. The calculation of pluronic concentrations after re-formulation considering dilution with SVF were 20 % and 22.5/2.5 % w/w for F127 and F127/F68 respectively. The two re-formulated hydrogels were prepared and diluted according to the same protocol. As expected, gelling temperatures of these formulations after dilution with SVF were about 30°C (figure 2).

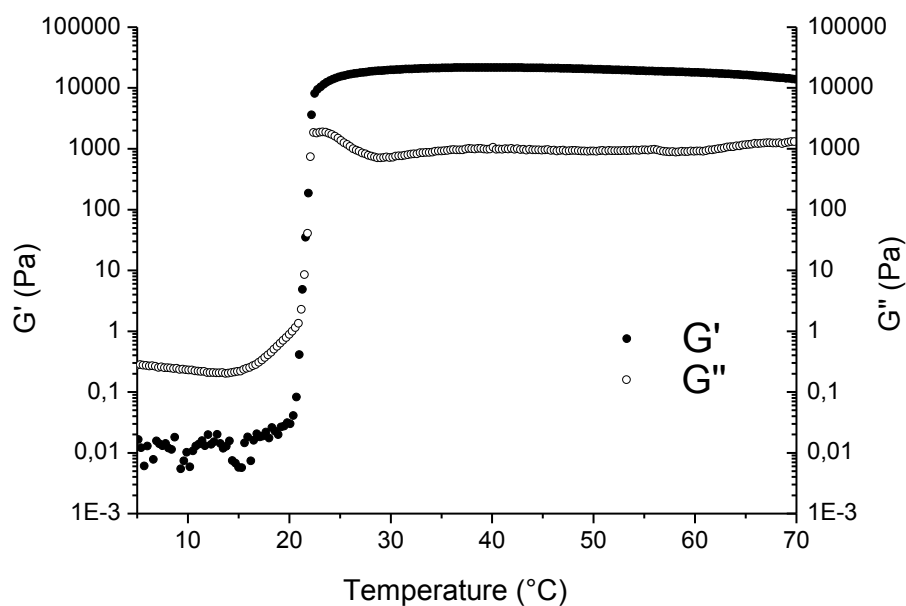


Figure 1: Typical profile of variations of the elastic (G') and viscous (G'') moduli, as function of temperature. Experiments performed with a pluronic hydrogel of F127 at a concentration of 20% w/w

Table 1. Gelling temperature, T_{gel} (\pm standard deviation, $n=3$) and elastic G' and viscous modulus G'' (\pm standard deviation, $n=3$) ($N=1$ Hz, $T=37^{\circ}C$) for different pluronic-based formulations.

	Formulation (% w/w)	T_{gel} ($^{\circ}C$)	G' (10^3 Pa)	G'' (Pa)	δ ($^{\circ}$)
Effect of F127 concentration (% w/w)	15	67 ± 1	0	0	88.85
	16	28 ± 1	11.0 ± 0.2	2.2 ± 0.1	11.5
	17	26 ± 1	12.4 ± 1.6	1.5 ± 0.2	6.91
	20	22 ± 1	22.8 ± 2.8	0.5 ± 0.1	1.35
Effect of F127/F68 proportion (% w/w)	0/20	59 ± 2	0	0	81.25
	10/10	54 ± 3	0	0	85.94
	17/3	35 ± 1	3.7 ± 0.4	1.6 ± 0.1	23.07
	18/2	30 ± 1	15.4 ± 0.2	1.5 ± 0.1	5.75
	19/1	25 ± 1	17.0 ± 0.7	1.0 ± 0.2	3.41
	20/0	22 ± 1	22.8 ± 2.8	0.5 ± 0.1	1.35

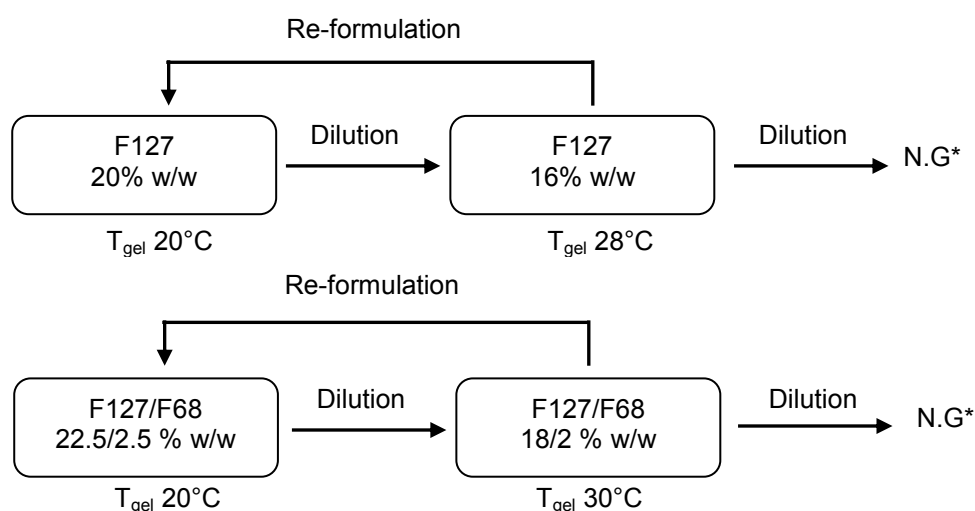


Figure 2: Initial formulations and iterative formulation process. *NG= no gelation

Finally, HPMC as mucoadhesive polymer has been incorporated into hydrogels at a concentration of 1 % w/w. After incorporation of HPMC, final formulations have been progressively diluted with SVF and gelling temperatures were determined after each dilution. As reported in table 2, progressive dilution of formulations resulted in a progressive increase of gelling temperature. About 10°C of difference was observed before and after dilution of 2 mL of hydrogel with 0.75 mL of SVF. For both formulations, the final gelling temperatures were around 30°C.

It is noteworthy that the variation of gelling temperature is not only due to the decrease of copolymer concentration after the dilution of the formulations, but also caused by a modification of the physicochemical properties of the hydrogels. As exposed in figure 3 and table 2, gelling temperature is lower when the formulations were diluted with SVF than with citrate buffer. These results can be explained by the presence of co-solutes, e.g., ions, proteins, electrolytes in the SVF medium which could interact with pluronics [31]. As demonstrated by previous works [32], in the case of pluronics, the gelation and micellization processes are strongly connected. The decrease of gelling temperature results from the decrease of the critical micelle concentration (CMC) or a decrease of the critical micelle temperature (CMT).

This was confirmed by Micro-DSC experiments (figure 3 and table 2). For the same composition of the hydrogel, the CMT was slightly lower when the formulation was diluted with SVF than with citrate buffer. The decrease of the CMT when adding salt to the copolymer solution results from the rearrangement of water molecules which are bound to the propylene oxide or the ethylene oxide residues. Water content in the micellar core decreases and the micellization is favoured resulting in a significant decrease of the CMT, and in turn, a decrease of gelling temperature (figure 3 and table 2).

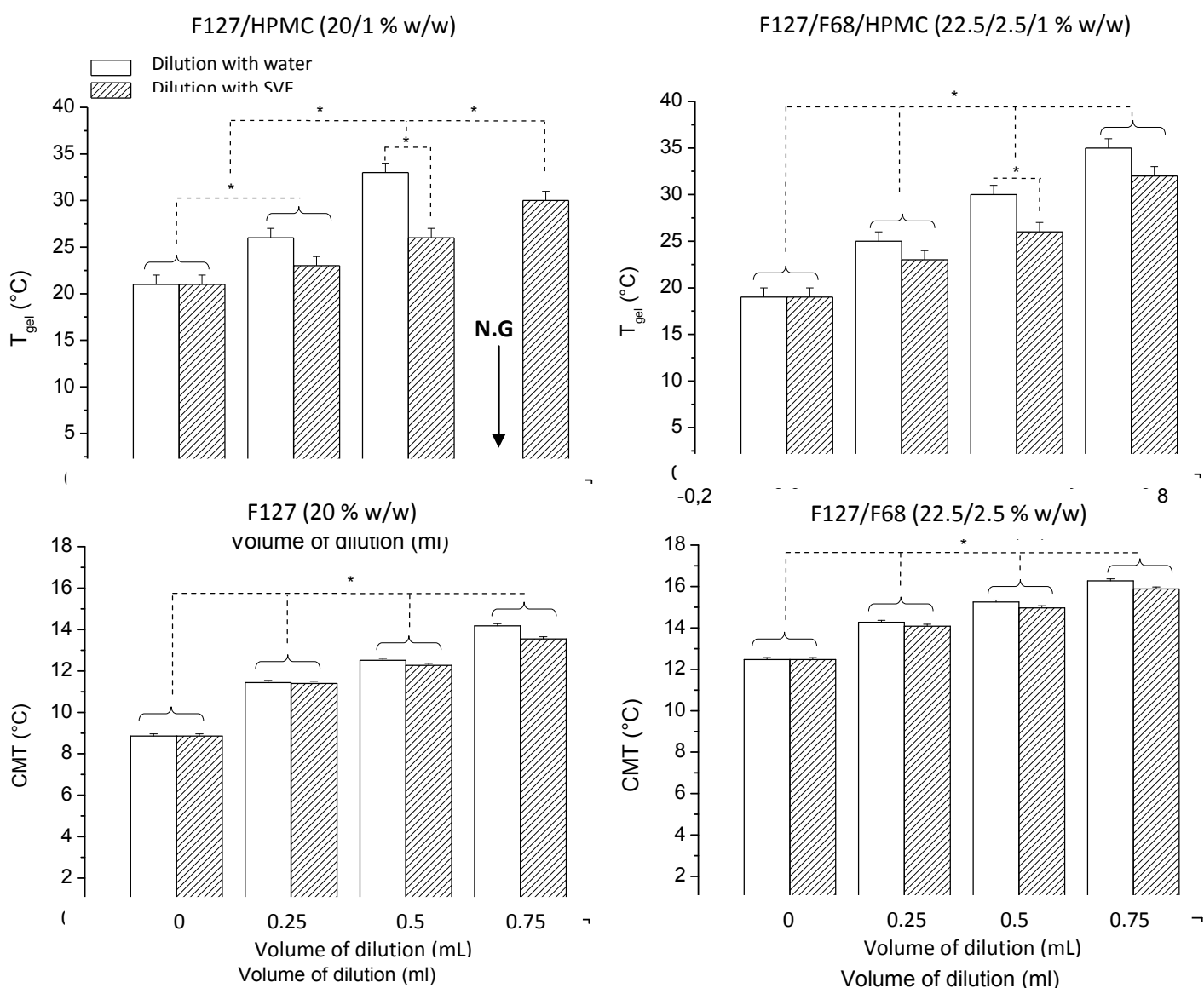


Figure 3: Effect of dilution with water and SVF on variation of T_{gel} and CMT* for F127 and F127/F68-based hydrogels. Dilutions were conducted by mixing 2ml of formulations with 0.75 mL of water or SVF. n=3. NG: no gelation. *CMT: critical micelle temperature. (*) represents significant difference (P<0.05).

Table 2. Effect of progressive dilution of F127/HPMC and F127/F68/HPMC formulations with SVF^a and water volume on the variation of rheological parameters of. T_{gel} (\pm standard deviation, n=3), elastic modulus G' , and viscous modulus G'' (N=1 Hz, T=37°C). n = 3.

	Formulation (% w/w)	Volume of Dilution (mL)	CMT^b μ DSC (°C)	T_{gel} (°C)	G' (10 ³ Pa)	G'' (10 ³ Pa)	δ (°)
SVF^a	F127/HPMC (20/1)	0	12.47	21 \pm 1	24.0 \pm 1.3	1.0 \pm 0.1	2.38
		0.25	14.08	23 \pm 1	18.5 \pm 2.6	1.2 \pm 0.1	3.73
		0.5	14.97	26 \pm 1	9.9 \pm 1.4	1.7 \pm 0.2	9.74
		0.75	15.88	30 \pm 1	2.9 \pm 1.0	2.0 \pm 0.1	34.59
	F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1)	0	8.86	19 \pm 1	37.0 \pm 3.7	1.1 \pm 0.1	1.70
		0.25	11.40	23 \pm 1	23.4 \pm 0.4	0.6 \pm 0.1	1.46
		0.5	12.27	26 \pm 2	17.8 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	4.81
		0.75	13.55	32 \pm 1	9.6 \pm 1.7	1.4 \pm 0.1	45.83
Citrate buffer	F127/HPMC (20/1)	0	12.47	21 \pm 1	24.0 \pm 1.3	1.0 \pm 0.1	2.38
		0.25	14.27	26 \pm 1	13.8 \pm 0.1	1.8 \pm 0.1	7.61
		0.5	15.25	33 \pm 1	4.8 \pm 0.5	1.7 \pm 0.1	19.71
		0.75	16.27	NG ^b	-	-	
	F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1)	0	8.86	19 \pm 1	37.0 \pm 3.7	1.1 \pm 0.09	1.70
		0.25	11.44	25 \pm 1	22.5 \pm 2.5	1.0 \pm 0.1	2.55
		0.5	12.51	30 \pm 1	15.0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	5.77
		0.75	14.18	35 \pm 1	3.2 \pm 1.9	1.5 \pm 0.2	25.25

a. SVF: simulated vaginal fluid. b. NG: no gelation.

b. CMT: critical micelle temperature

3.2. Effect of dilution with SVF on viscoelastic properties of hydrogels

The viscoelastic properties of the selected formulations F127/HPMC (20/1 % w/w) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 % w/w) at 37°C (above their gelling temperature) were then compared. The frequency sweep was varied from 0.01 to 10 Hz under a constant shear stress (60 Pa). It was checked that under the selected frequency range and a stress of 60 Pa, all the investigated samples remained in the linear domain and underwent reversible structural modification.

As expected for physical hydrogels, the elastic modulus, G' slightly increased with the frequency whatever the formulation used (figure 4). More precisely, oscillatory measurements by varying the frequency showed that the elastic modulus of the hydrogels was higher than the viscosity modulus, G'' over almost all the frequency range ($G' > G''$ and $0^\circ < \delta < 45^\circ$). For the reminder, the elasticity of a hydrogel is higher when the elastic modulus increased and when viscous modulus and phase angle stress/strain were decreased.

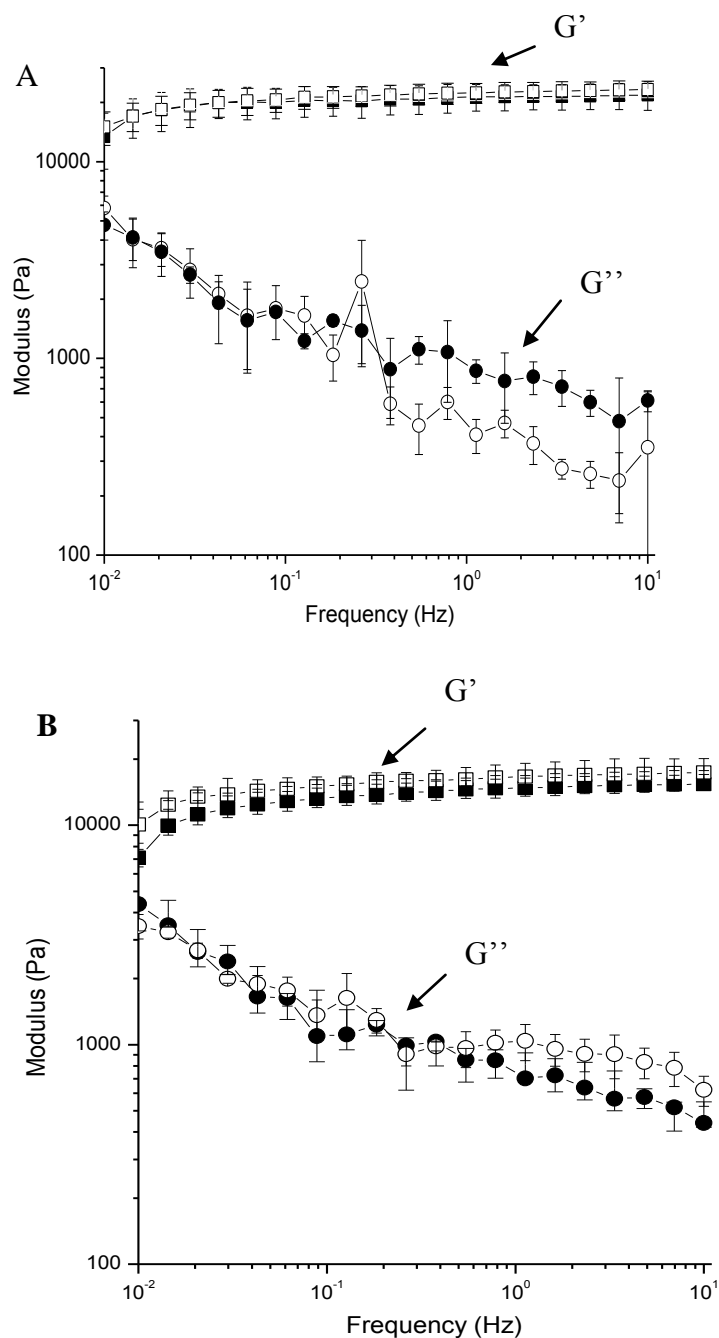


Figure 4: Variations of the elastic (G') and viscous moduli (G'') as a function of the shear frequency, N ($\tau_0 = 60$ Pa, $T = 37^\circ\text{C}$) for F127 (20% w/w) (A) and F127/F68 (22.5/2.5 w/w) (B), before (dark symbols) and after (open symbols) addition of HPMC at a concentration of 1% w/w.

From the results presented in table 1, when the concentration of F127 was increased, the elasticity of the hydrogel increased as exemplified by an increase of G' from 11 to 22.8 kN/m² when the percentage of F127 was increased from 16 to 20 % w/w. Evidence that G' and G'' were near-zero

when gelling temperature was higher than 37°C. In that case, hydrogels conserved their viscous character at 37°C. This was exemplified by a phase angle stress/strain (δ) values higher than 45° (table 1).

Concerning rheological evaluation of re-formulated hydrogels F127/HPMC (20/1 % w/w) and F127/F68 (22.5/2.5/1 % w/w), as we can see from figure 4, both elastic and viscous moduli were higher for F127/F68-based hydrogel at a concentration of 22.5/2.5 % w/w than the modulus of hydrogel based on F127 alone at a concentration of 20 % w/w. It is worth to note that the elastic behaviour is not due to the presence of F68 in the formulation because as we can see from the results in table 1, for the same total concentration of pluronic, the addition of F68 to hydrogels resulted in a decrease of elastic modulus. This parameter decreased from 22.8 to 3.7 kN/m² when the percentage of F68 in the formulation was increased from 0 to 3 % w/w (table 1). One could conclude that the elasticity of the hydrogel composed of F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 % w/w) was higher than the one composed of F127/HPMC (20/1 % w/w) because the total amount of pluronic is higher in the first case.

Dilution of F127/HPMC (20/1 % w/w) and F127/F68 (22.5/2.5/1 % w/w) hydrogels with SVF or citrate buffer resulted in a decrease of the elasticity of the hydrogels. As we can see from table 2, whatever the formulation, when hydrogels were diluted, elastic modulus was decreased. This could be attributed to the decrease of total pluronic concentration in the formulations. It is noteworthy that the variation of the elasticity of the hydrogels is not affected only by pluronic concentration but also by medium composition. As exposed in figure 3 and table 2, formulations diluted with SVF had an elastic modulus higher than the one obtained for the formulations diluted with citrate buffer.

The decrease of the elasticity of the hydrogels was compensated by a gain in the viscosity modulus. It is expected that the gain in the viscosity modulus will result in an increase of the spreading of the hydrogel over the vaginal mucosa after its *in vivo* administration.

3.3. Effect of dilution on hydrogels' mucoadhesion

After the *in vivo* administration of mucoadhesive hydrogels, the first step in mucoadhesion process is the creation of intimate contact between the dosage form and the mucosa. The intimate contact is believed to be a result of wetting and spreading of the hydrogel, which increases the area of contact. The interpenetrated chains can then interact, resulting in entanglements and weak chemical bonds (electrostatic attraction, hydrophobic interactions, van der Waals' forces and hydrogen bonds).

Mucoadhesion parameters can be evaluated by several *in vitro* and *in vivo* methods [4]. The majority of the methods were based on an *in-vivo*-like situation, usually measuring the contact time or the force required to separate the formulation from the tissue [33-35]. In the detachment-force method, when conducting tensile adhesion tests, the formulation is brought into contact with a biological substrate and the force or the work that is required to break the adhesive bond is measured [29,36]. Interestingly, more information about mucoadhesion parameters can be accumulated using this method, because it not only provides a value for the work of adhesion or the maximal force of detachment, but also gives other deformation parameters (figure 5). In the present work, tests on pig vaginal mucous membrane, founded on the technique of traction of the adhesive/adherent joint, made it possible to characterize the bioadhesive properties of the hydrogels by measuring mucoadhesion parameters of the formulation before and after dilution with SVF. Typical force versus elongation graph is presented in figure 5. This curve led to characterize the bioadhesive properties of the hydrogels by measuring deformation to peak (A),

deformation peak to failure (B), deformation to failure (C), maximal force of detachment F_{max} (D) and work of adhesion W (E).

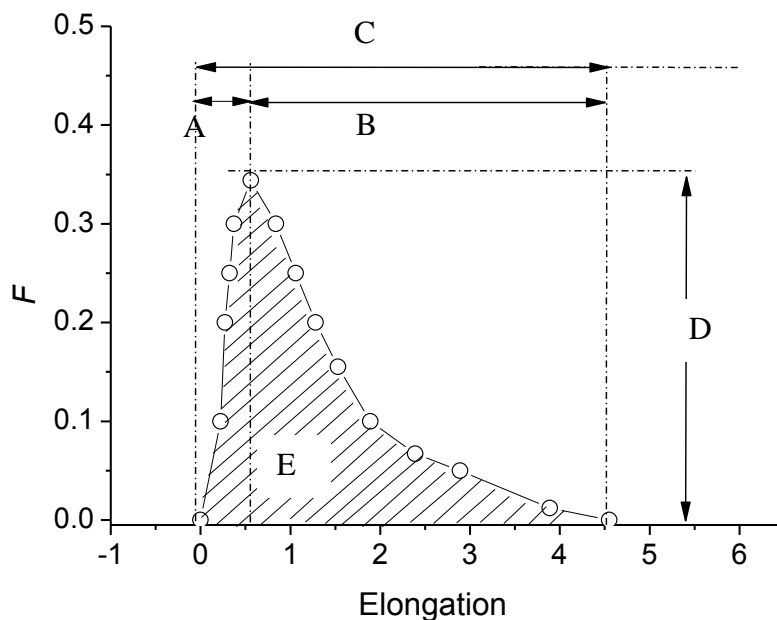


Figure 5: Typical force versus elongation curve for pluronic-based hydrogels. The analysis of the curve led to the determination of the following mucoadhesion parameters: maximal force of detachment F_{max} (D), work of adhesion W (E) and other mucoadhesion parameters: deformation to failure (C), deformation to peak (A) and deformation peak to failure (B).

Deformation to peak (A), deformation peak to failure (B) and deformation to failure (C) gave insight into the elasticity of the adhesion. Materials exhibiting large deformation peak, deformation peak to failure and deformation to failure, produce adhesive interactions which are more compliant and less susceptible to disrupt from outside forces. Maximal force of detachment F_{max} (D) corresponds to the force necessary to the detachment of the hydrogel from vaginal mucosa while work of adhesion W (E) is the work done in separating the two surfaces and is the area between the positive portion of the tensile curve and the zero load line.

From the results in figure 6, whatever the formulation, mucoadhesive properties after dilution with SVF were decreased as exemplified by a significant decrease of F_{max} and W because dilution with vaginal fluids resulted in a decrease of polymer concentration. At low concentrations, there are not enough chains available for interaction with mucus gel layer. Furthermore, the lubricant effect of the immersion fluids makes difficult the contact between mucosa and semisolid formulation, and in turn, affects the mucoadhesive potential of the hydrogels. From a practical point of view, it is noteworthy that the much higher mucoadhesive potential of formulations without dilution with SVF should be taken into account particularly when considering products for women with poor or scarce vaginal lubrication, as for example, during menopause.

We noted that before dilution, F_{max} was higher for pluronic F127-based hydrogel, while work of adhesion was higher for hydrogels composed of a mix of two pluronics in comparison with F127-based hydrogels. However, after dilution, the two types of formulations F127/HPMC and F127/F68/HPMC responded differently. Indeed, in the case of F127-based hydrogels, F_{max} , W and mucoadhesion profiles were affected by dilution with SVF. However, in the case of F127/F68-based hydrogels, F_{max} , W and mucoadhesion profile were not significantly affected by dilution (figure 6).

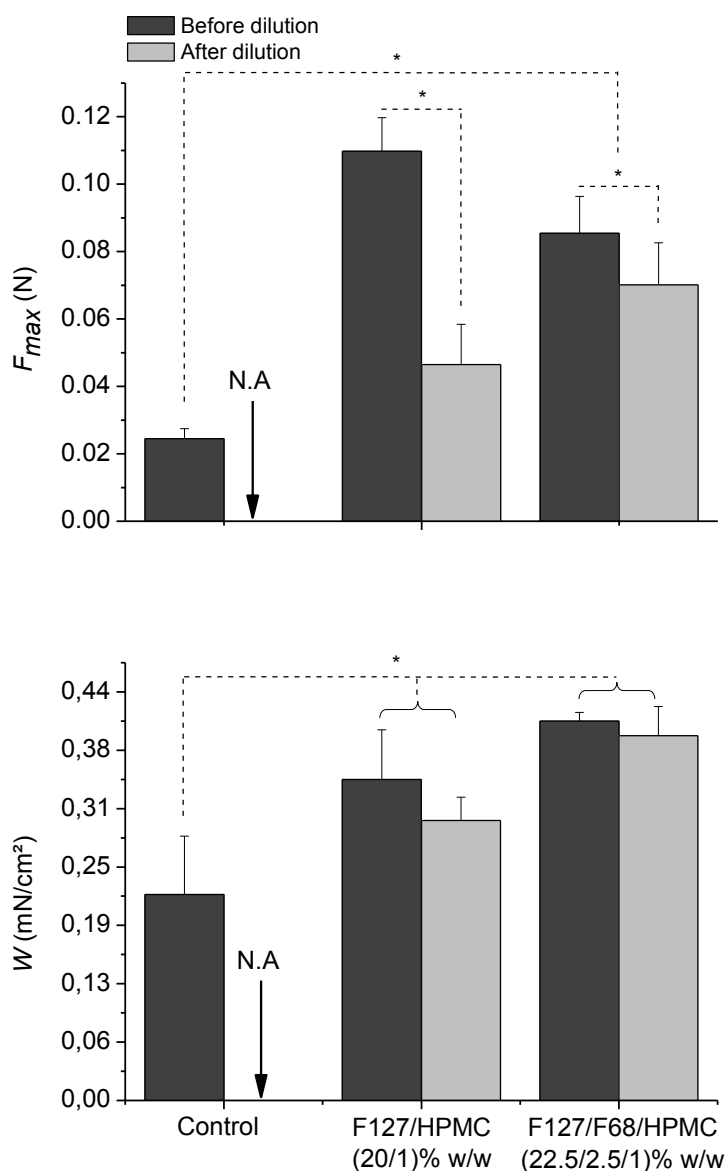


Figure 6: Effect of dilution with SVF on variation of F_{max} (Higher panel) and W (lower panel) for F127/HPMC (20/1% w/w) and for F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1% w/w) hydrogels. Dilutions were conducted by mixing 2 mL of formulations with 0.75 mL of SVF. Control consist on a solution of HPMC at a concentration of 1% W/W. N=6. NA: no adhesion. (*) represents significant difference ($P < 0.05$).

As exposed in figure 7, the general shape of the tensile experiments is different depending on the formulation used. In the case of F127/F68 mixture, the shape of the curve is similar before and after dilution with SVF. However, F127 hydrogel tensile curve exhibited significant difference after dilution. For both formulations the parameters A, B and C (deformation to peak, deformation peak to failure and deformation to failure respectively), were similar before dilution with SVF

(figure 7). However, after dilution, hydrogels based on F127 exhibited a brittle fracture (small value of A) while, in the case of F127/F68 mixture, all parameters A, B and C were larger than the one reported for F127 hydrogels after dilution.

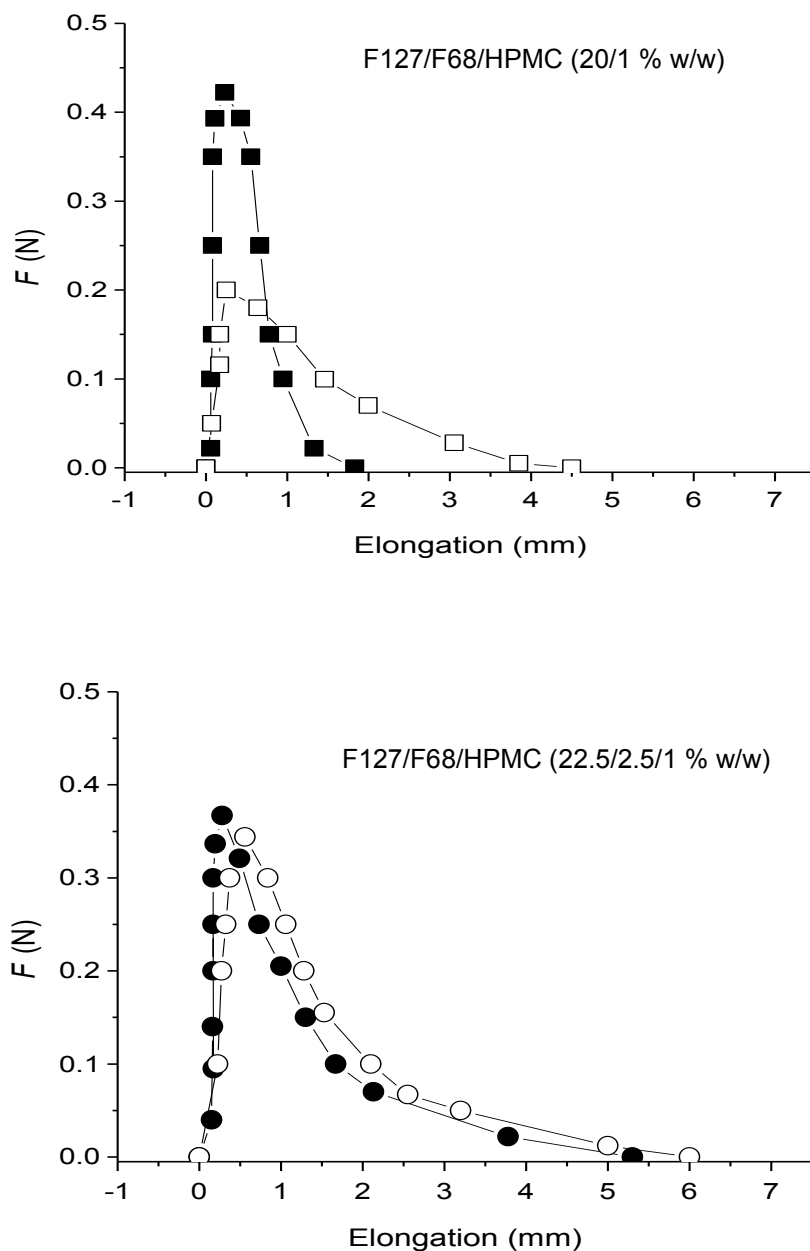


Figure 7: Force-elongation curves for F127/F68/HPMC hydrogels before (■ and ●) and after dilution with SVF (□ and ○). Dilutions were conducted by mixing 2mL of formulations with 0.75 mL of SVF.

These results can be due to the difference between the elasticity of the two types of hydrogels. Indeed, we demonstrated that elasticity of F127/F68-based hydrogel was higher than the one composed of F127. The higher elasticity of F127/F68 hydrogels will increase the possibilities of micelle interpenetration with mucus. Furthermore, F127 (20 % w/w) and F127/F68 (22.5/2.5 % w/w) contained 42 mM and 32 mM of hydroxyl groups respectively. It is well known that polymers possessing hydrophilic functional groups such as hydroxyls are susceptible to interact more favorably with mucus gel layer. Consequently, mucoadhesion was stronger in the case of F127/F68-based hydrogels due to numerous hydrogen bonds generated by hydroxyl groups.

In conclusion, mucoadhesion process of pluronic hydrogels was affected by *(i)* the rheological properties of the hydrogels, *(ii)* polymer concentration and *(iii)* its chemical composition.

4. Conclusions

In this work, we developed pluronic hydrogels able to keep their thermosensitive and mucoadhesive properties after their dilution with vaginal fluids. The formulated hydrogels were composed of F127 (20 % w/w) or a mix of two pluronics F127 and F68 (22.5/2.5 % w/w). Both formulations contained HPMC as mucoadhesive polymer at a concentration of 1 % w/w. Interestingly, little variation of mucoadhesion parameters were observed in the case of hydrogels composed of F127/F68 mixtures. These differences were attributed to the higher elasticity of the hydrogel composed of F127/F68 mixture and to the stronger interaction of hydroxyl groups with mucous gel layer. The combination of all results showed that hydrogels composed of F127/F68 exhibited interesting rheological and mucoadhesive properties making them promising formulations for the vaginal administration of drugs.

5. Acknowledgements

Authors want to thank the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Commissariat à l'énergie Atomique (CEA) team (Institut National de Recherche Agronomique and Commissariat à l'Energie Atomique) of Jouy en Josas – France for their help concerning animal tests.

6. References

- [1] D.P. Benzinger, J. Edelson, Absorption from the vagina, *Drug. Metab. Rev.* 14 (1983) 137--168.
- [2] S. Muranishi, A. Yamamoto, H. Okada, Rectal and vaginal absorption of peptides and proteins, *Pharm. Biotech.* 4 (1993) 199--227.
- [3] M. Bourin, J. Guenzet, G. Pradal, Vaginal absorption of drugs, *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.* 12 (1983) 717– 726.
- [4] K. Edsman, H. Hagerstrom, Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes, *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 3--22.
- [5] C. Valenta, The use of mucoadhesive polymers in vaginal delivery, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 57 (2005) 1692--1712.
- [6] J. das Neves, M.F. Bahia, Gels as vaginal drug delivery systems, *Int. J. Pharm.* 318 (2006) 1--14.
- [7] K. Vermani, S. Garg, The scope and potential of vaginal drug delivery, *P.S.T.T.* 3 (2000), 359--364.
- [8] M. Vermesh, G.T. Fossum, O.A. Kletzky, Vaginal bromocriptine: pharmacology and effect on serum prolactin in normal women, *Obstet. Gynecol.* 72 (1988) 693--698.
- [9] V.M. Jasonni, R. Raffelli, A. de March, G. Frank, C. Flamigni, Vaginal bromocriptine in hyperprolactinemic patients and puerperal women, *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* 70 (1991) 493--495.

- [10] L.G. Patel, Propanolol concentration in plasma after insertion into the vagina, *Br. Med. J.* 287 (1984) 1247--1248.
- [11] F.C. Christensen, M. Tehranifar, J.L. Gonzales, C.R. Qualls, V.J. Rappaport, W.F. Rayburn, Randomized trial of concurrent oxytocin with a sustained-release dinoprostone vaginal insert for labor induction at term, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 186 (2002) 61--65.
- [12] N. Agarwal, A. Gupta, A. Kriplani, N.P. Bhatla, Six hourly vaginal misoprostol versus intracervical dinoprostone for cervical ripening and labor induction, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 29 (2003) 147--151.
- [13] K. Han, J.S. Park, Y.B. Chung, N.J.P. Jeong, H.B. Park, J.R. Robinson, Development of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) delivery systems for vaginal mucosal route, *Arch. Pharm. Res.* 18 (1995) 325--331.
- [14] J.B. Livingston, S. Lu, H. Robinson, D.J. Anderson, Immunization of the female genital tract with a DNA-based vaccine, *Infect. Immun.* 66 (1998) 322--329.
- [15] R.K. Malcolm, The intravaginal ring, *Drugs Pharm, Sci.* 126 (2003) 775--790.
- [16] MM. Lederman, R.E. Offord, O. Hartley, Microbicides and other topical strategies to prevent vaginal transmission of HIV, *Nature reviews.* 6 (2006) 371--382.
- [17] H. Pilcher, Starting to gel, *Nature.* 430 (2004) 138--140.
- [18] V.MK. Ndesendo, V. Pillay, Y.E. Choonara, E. Buchmann, D.N. Bayever, L.C.R. Meyer, A review of current intravaginal drug delivery approaches employed for the prophylaxis of HIV/AIDS and prevention of sexually transmitted infections, *AAPS PharmSciTech.* 9(2) 2008 505--520.

- [19] A.B. Sassi, C.E. Isaacs, B.J. Moncla, P. Gupta, S.L. Hillier, L.C. Rohan, Effects of physiological fluids on physical-chemical characteristics and activity of topical vaginal microbicide products, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 3123--3139.
- [20] B.E. Lai, Y.Q. Xie, M.L. Lavine, A.J. Szeri, D.H. Owen, D.F. Katz, Dilution of microbicide gels with vaginal fluid and semen: effect on rheological properties and coating flow, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 1030--1038.
- [21] J. Y. Chang, Y-K. Oh, H-S. Kong, E-J. Kim, D.D. Jang, K.T. Nam, C-K. Kim, Prolonged antifungal effects of clotrimazole-containing mucoadhesive thermosensitive gels on vaginitis, *J. Control. Release.* 82 (2002) 39--50.
- [22] E. Bilensoy, M.A. Rouf, I. Vural, M. Sen, A.A. Hincal, Mucoadhesive, thermosensitive, prolonged-release vaginal gel for clotrimazole: β -cyclodextrin complex, *AAPS PharmSciTech.* 7(2) (2006) e1--e7.
- [23] D.H. Owen, D.F. Katz, A vaginal fluid stimulant, *Contraception*, 59 (1999) 91--95.
- [24] A.A. Koffi, F. Agnely, G. Ponchel, J-L. Grossiord, Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine, *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 328--335.
- [25] A.A. Koffi, F. Agnely, M. Besnard, J. Kablan Brou, J-L. Grossiord, G. Ponchel, In vitro and in vivo characteristics of a thermogelling and bioadhesive delivery system intended for rectal administration of quinine in children, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 167--175.
- [26] K. Bouchemal, F. Agnely, A. Koffi, G. Ponchel, A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1,2 on pluronic F127 micellization using isothermal titration microcalorimetry, *J. Colloid. Interf. Sci.* 338 (2009) 169--176.

- [26] L.C. Pham Trong, M. Djabourov, A. Ponton, Mechanisms of micellization and rheology of PEO-PPO-PEO triblock copolymers with various architectures, *J. Colloid. Interf. Sci.* 328 (2008) 278--287.
- [27] A. van Eyk, P. van der Bijl, Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa, *Int. J. Pharm.* 305 (2005) 105--111.
- [28] C.A. Squier, M.J. Mantz, P.M. Schlievert, C.C. Davis. Porcine Vagina Ex Vivo as a Model for Studying Permeability and Pathogenesis in Mucosa, *J Pharm Sci-US.* 97 (2008) 9--21.
- [29] G. Ponchel, F. Touchard, D. Duchêne, N.A. Peppas, Bioadhesion analysis of controlled-release systems. I. Fracture and interpenetration analysis in poly(acrylic acid)-containing systems, *J. Control. Release*, 5 (1987) 129--141.
- [30] N.A. Peppas, G. Ponchel, D. Duchêne, Bioadhesion analysis of controlled-release systems. II. Time-dependent bioadhesive stress in poly(acrylic acid)-containing systems, *J. Control. Release*, 5 (1987) 143--149.
- [31] C. Roques, K. Bouchemal, G. Ponchel, Y. Fromes, E. Fattal, Parameters affecting organization and transfection efficiency of amphiphilic copolymer/DNA carriers, *J. Control. Release.* 138 (2009) 71--77.
- [32] M. Scherlund, A. Brodin, M. Malmsten, Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics, *Int. J. Pharm.* 211 (2000) 37--49.
- [33] M. Ishida, N. Nambu, T. Nagai, Highly viscous gel ointment containing carbopol for application to the oral mucosa, *Chem. Pharm. Bull*, 31 (1983) 4561--4564.

[34] R. Gurny, J.M. Meyer, N.A. Peppas, Bioadhesive intraoral release systems : design, testing and analysis, *Biomaterials*. 5 (1984) 336--340.

[35] J.D. Smart, I.W. Kellaway, H.E.C. Worthington, An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* 36 (1984) 295--299.

[36] G. Ponchel, F. Touchard, D. Woussidjewe, D. Duchêne, N.A. Peppas, Bioadhesion analysis of controlled-release systems. III. Bioadhesive and release behavior of mitronidazole-containing poly(acrylic acid) hydroxypropyl methylcellulose systems, *Int. J. Pharm.* 38 (1987) 65--70.

Chapitre III

Formulation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal hydrogels containing the CD4 miniprotein M48U1 as a novel anti-HIV-1 microbicide

**FORMULATION OF THERMOSENSITIVE AND MUCOADHESIVE VAGINAL HYDROGELS
CONTAINING THE CD4 MINIPROTEIN M48U1 AS A NOVEL ANTI-HIV-1 MICROBICIDE**

Justyna FRELICHOWSKA^a, Kawthar BOUCHEMAL^{a*}, Loïc MARTIN^b, Vanessa LIEVIN-
LE MOAL^c, Roger LEGRAND^d, Nathalie BOSQUET^d, Armelle AKA-ANY-GRAH^{a,e},
Armand KOFFI^c, Gilles PONCHEL^a

a. Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612 “Physicochimie – Pharmacotechnie –
Biopharmacie”, Faculté de Pharmacie. 5, Rue J.B. Clément. 92296 Châtenay-Malabry cedex,
France.

b. CEA, iBiTecS, Service d’Ingénierie Moléculaire des Protéines (SIMOPRO), Gif sur
Yvette. France.

c. Université Paris-Sud, UMR CNRS 8076 “Biomolécules : Conception, Isolement,
Synthèse » Groupe Chimiothérapie Antiparasitaire”, Faculté de Pharmacie. 5, Rue J.B.
Clément. 92296 Châtenay-Malabry cedex, France.

d. CEA, iMETI, Division of Immuno-Virology, Fontenay-aux Roses, France.

e. Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacocinétique, UFR des sciences pharmaceutiques
et Biologiques d’Abidjan, 01 BP V 34 Abidjan 01, Téléx 26138 Côte d’Ivoire.

*Corresponding author: kawthar.bouchemal@u-psud.fr

France. Tel: +33 (0)1 46 83 55 81. Fax: +33 (0)1 46 61 93 34.

Abstract

The peptide M48U1 is a novel CD4 mimic molecule with high specificity and affinity towards HIV-1 envelope gp-120. The main objective of the present work is to develop thermosensitive and mucoadhesive pluronic hydrogels containing M48U1 as novel anti-HIV-1 microbicide. The two formulations used were composed of pluronics F127 or a mixture of F127/F68 and hydroxypropylmethycellulose (HPMC) (F127/HPMC 20/1 wt%, F127/F68/HPMC 22.5/2.5/1 wt%). Hydroxyethylcellulose (HEC) hydrogel at a concentration of 1.5 wt% was used as control. Interestingly, toxicological studies carried on HeLa cells showed no significant difference in the cell viability of the pluronic hydrogels in comparison with HEC and water. More than 80 % viability was found for all formulations. The stability of the peptide was checked in all hydrogel formulations during 3 months at 4 °C. The concentration of M48 in the formulations was determined by using plasmon surface resonance technique (Biacore® T100) after immobilization of IgG R24 on a CM5 chip surface. The release kinetics of peptide M48U1 from the different formulations studied during 24 hours by using Franz diffusion cell system showed that after 24 hours of release experiments, significant differences were observed for the three studied formulations. Indeed, HEC hydrogel released all the peptide to the receiver fluid. In the case of hydrogels composed of F127/HPMC and F127/F68/HPMC, about 25 % of M48U1 remained in the formulations. Finally, the formulation of the peptide M48U1 in the hydrogel ensures a local delivery because no diffusion of the peptide was detected through vaginal *Cynomolgus macaque* mucosa.

Keywords: Pluronic, anti-HIV-1 microbicides, M48U1, toxicological evaluation, release profiles.

1. Introduction and objectives of the work

With regard to the prevalence of the infection by the human immunodeficiency virus (HIV-1), there is an urgent need to develop novel strategies to block HIV-1 transmission. Considering that women are more susceptible to be infected with HIV than men, a huge effort has been devoted to develop formulations that prevent vaginal acquisition of HIV-1. More specifically, researches were oriented towards the design of microbicide formulations self-administered by women before intercourse.

The first strategy for the development of anti-HIV microbicide was to inactivate the virus by disrupting its envelope. The first microbicide candidate was Nonoxynol-9, which has been used in the USA as spermicide showed anti-HIV activity *in vitro* (Polsky *et al.*, 1988). However, the *in vivo* evaluation of formulations containing Nonoxynol-9 was disastrous because in the final phase III trial undertaken by the United Nation Programme showed that the transmission rate was higher in the Nonoxynol-9 group in comparison with placebo one (Van Damme *et al.*, 2002). These results were related to the local vaginal toxicity and non-specificity of this molecule because Nonoxynol-9 damaged the vaginal lipid membrane, an important barrier to HIV entry. After that, attention has been focused on the development of more specific microbicides and less toxic.

The first step in HIV infection involves the attachment of the envelope protein gp120 with its receptor, CD4, on the surface of the host cell. This is followed by a series of events that lead to the entry of the viral RNA and the confiscation of the metabolic machinery of the host cell. In this context, the group of Martin *et al.*, has developed a novel CD4 mimic as a potential HIV-1 microbicide (Martin *et al.*, 2003, Van Herrewege *et al.*, 2008, Stricher *et al.*, 2008). This peptide named M48U1 presented a high specificity and affinity towards HIV-1 envelope protein gp120. Thanks to the small size, M48U1 binding to gp-120 was too much stronger

than the interaction with native CD4. Furthermore, inhibition of the interaction of HIV-1 with CD4 cells *in vitro* has been demonstrated (Van Herrewege *et al.*, 2008). Despite these exciting results, *in vivo* vaginal administration of a solution containing M48U1 should result in a leakage of the solution and total inefficiency.

M48U1 has to be formulated in a suitable delivery device. Ideally, the vaginal microbicide containing M48U1 (i) should be adapted to the hydrophilic nature of the peptide, (ii) should be non-toxic towards the vaginal mucosa. (iii) To form a barrier against HIV-1 entry, the hydrogels containing M48U1 should remain as long as possible in the vaginal mucosa, releasing progressively the peptide.

To reach these objectives, we designed thermosensitive and mucoadhesive hydrogels based on (ethylene oxide)_m(propylene oxide)_n(ethylene oxide)_m ((EO)_m(PO)_n(EO)_m) block copolymers composed of pluronics F127 ((OE)₉₉(OP)₆₉(OE)₉₉) or a mixture of F127/F68 (F68: (EO)₈₀(PO)₂₇(EO)₈₀) and hydroxypropyl methycellulose (HPMC) (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010). Hydroxyethylcellulose (HEC) hydrogel at a concentration of 1.5 wt% was used as control. Noteworthy, HEC is usually used as a reference in the clinical studies of vaginally applied drugs (Tien *et al.*, 2005).

In the present work, the toxicity of pluronic hydrogels will be evaluated on human HeLa carcinoma cells. If no toxicity was detected, the peptide M48U1 will be then formulated into pluronic hydrogels and the stability and the release profiles of the peptide from different formulations will be evaluated. Finally, when foreseen a local application, we have to check that no drug will cross the vaginal mucosa. Evidence that high molecular weight and hydrophilic peptide M48U1 does not cross the vaginal membrane. Nevertheless, the permeation of M48 through *Cynomolgus macaque* vaginal mucosa will be studied by using Ussing diffusion chamber.

2. Materials and methods

2.1. Materials

M48U1 synthesis: The M48U1 peptide containing a *p*-(cyclohexylmethoxy)phenylalanine residue at position 23 was synthesized at Pepscan Presto Inc. (Lelystad, The Netherlands) by solid phase peptide synthesis and purified after refolding by reverse-phase high performance liquid chromatography as described elsewhere (Martin *et al.*, 2011). The peptide was stored at a temperature of -18 °C until use.

Pluronic F127 (poloxamer P407) and pluronic F68 (Poloxamer P188) (European Pharmacopea 6th Edition 6.7) of pharmaceutical grade were a gift from BASF. According to the supplier, the weight average molecular weights M_w were about 13,500 g/mol (9,840-14,600 g/mol) and 8,400 g/mol (7,680-9,510 g/mol) for F127 and F68 respectively. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (Methocel[®] K4M series MM87091702 K) was a gift from Colorcon. Glycerol was purchased from Fluka. Hydroxyethylcellulose was from Natrosol, USA. All other reagents were supplied by sigma-aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and Prolabo (Paris, France) and were of analytical grade.

Citrate buffer solution (5 mM at pH 4.5) was prepared by dissolving citric acid monohydrate and trisodium citrate dihydrate in MilliQ[®] water. The volume of the solution was then completed to 1 L by MilliQ[®] water. The final preparation was filtrated through a 0.22 μ m filter.

Simulated vaginal fluid (SVF) was prepared as previously described (Owen & Katz, 1999). To 900 mL of MilliQ[®] water contained in a beaker, NaCl (3.51 g), KOH (1.4 g), Ca(OH)₂ (0.22 g), bovine serum albumin (BSA) (0.018 g), lactic acid (2.00 g), acetic acid (1.00 g), glycerol (0.16 g), urea (0.4 g), and glucose (5.00 g) were added and stirred mechanically until

complete dissolution. The pH of the mixture was then adjusted to 4.5 by using HCl. The final preparation was filtrated through a 0.22 μm filter. The volume of the solution was then completed to 1 L by MilliQ[®] water.

2.2. Formulations of gels and controls

Gels were prepared by weight according to the so-called “cold method” by using a mixer equipped with a turbine adapted to the mixing of viscous preparations (Rayneri-turbotest, Rayneri, France) (Koffi et al., 2006, Bouchemal et al., 2009, Aka-Any-Grah et al., 2010).

For the preparation of formulation composed of F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 % wt), HPMC powder was gradually added under mechanic agitation (1000 rpm) at 4 °C to a liquid phase which consisted citrate buffer containing 2.5 wt% of glycerol. Noteworthy, glycerol was added to formulations in order to achieve the physiological osmotic pressure. Vaginal gels have to be in the range of pH of 4-5.

After complete dissolution of HPMC, the pluronic powders were gradually added to this phase under the same conditions (mechanic agitation speed: 1000 rpm at 4 °C). Preparations composed of F127/HPMC were denominated by two numbers indicating the w/w percentage of F127 and HPMC respectively. The ternary systems F127/F68/HPMC were denominated by three numbers indicating the weight percentage of F127, F68 and HPMC respectively. In all cases, after complete dissolution of pluronic powders, each gel was equilibrated 48 h at 4 °C to eliminate foam and air bubbles.

After 48 h of storage at 4 °C for the pluronic gels, the peptide M48U1 was immediately incorporated (when the formulation is in the form of solution), under vigorous magnetic stirring. The concentration of the peptide was 3 mg/g in all formulations.

Controls were composed of a solution of peptide in citrate buffer pH 4.5 (5 mM) and a gel containing HEC at a concentration of 1.5 wt%.

Cell lines and culture conditions

HeLa cells were grown in DMEM with l-glutamine (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen) and 1 % Amino-Acid Non Essential (AANE 100X, Gibco, France), at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Cell lines were harvested from the flask using trypsin (0.5 mg.mL⁻¹) or EDTA (0.2 mg.mL⁻¹), washed once with culture medium, and seeded into culture plates (TPP, Dutscher, France) at the appropriate cell densities (150000 cell/well), before being incubated at 37 °C in an atmosphere containing 5 % CO₂ before experiments began.

2.3. Evaluation of the toxicity of HEC and pluronic hydrogels

The evaluation of the toxicity of the formulations was achieved by exposing HeLa cells to pluronic hydrogels F127/HPMC 20/1 wt%, F127/F68/HPMC 22.5/2.5/1 wt% after 24 h. The results were compared to HEC 1.5 wt% and distilled water. HeLa cells were seeded in a 24-well culture plate at 1×10^5 cells and incubated for 24 h at 37 °C in 5 % CO₂ prior to the test. Prior to contact, the confluent HeLa cells were washed twice with PBS, and then contact with gels at appropriate concentration. The plates were incubated 24H at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. At the end of the contact period, the cells were washed two times with sterile PBS to remove non-adhering gels, and then processed for analysis.

Quantitative viables HeLa cells was conducted with Trypan blue numeration (VWR, France) in Malassez cell.

For statistical analysis t student test was applied (p = 0.05).

2.4. Determination of the concentration of M48U1

The concentration of M48U1 was determined using plasmon surface resonance technique (BIAcore® T100, GE Healthcare Sweden, series number 1356434). First, the rat monoclonal IgG R24 were immobilized on a CM5 chip surface (dextran-COOH from GE Healthcare). Peptide binding efficacy and reproducibility were tested with respect to the constant baseline. Desorption of peptide was obtained with 0.25 M formic acid. Then, the “concentration analysis” wizard procedure was performed. The samples were not filtered prior to BIAcore analysis, but only diluted in the running buffer 100 or 1000 times (HBS-EP+, BIAcore, containing 0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM ethylene diamine tetraacetate (EDTA), 0.5 % w/v surfactant P20 yielding pH 7.4 after 10 x dilution). It is noteworthy that the most reproducible results were obtained after about 100 cycles of adsorption-desorption of a known peptide concentration. La sensibilité était de 39 à 900 ng/mL.

The concentration of unknown samples was then determined using at least 2 calibration curves in the same run, and every sample was analyzed twice (two consecutive injections).

It is noteworthy that the presence of BSA makes the determination of peptide concentration in the sample impossible (the results are not reproducible, probably because of the interaction of BSA with Ig G and/or because of the adsorption of M48U1 on the BSA. This has been observed for a series of sample dilutions (10x; 100x; 1 000x; 10 000x).

Furthermore, the presence of the polymers (HEC or pluronics) in the analyzed samples influences the peptide detection depending on the polymer concentration in the sample. After 100x and 1000x dilution, the polymers do not influence the peptide concentration determination.

In the case of samples containing physiological fluids and tissue fragments where the presence of other peptides or proteins was highly possible, we choose to perform the mass spectroscopy analysis (samples were send to the CEA for analysis). It concerned the samples with the mucosa cells and with the deep layers if vaginal tissue. Mass spectroscopy spectra were registered with a 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, USA) using an internal standard consisting of M48U3 (similar peptide with a slight difference of residue at position 23) (Van Herrewege *et al.*, 2008).

2.5. Stability of M48U1 in formulations

The stability of peptide in the hydrogels (HEC, F127/HPMC and F127/F68/HPMC) was studied during 3 months at 4 °C and 37 °C. The dosages were done with BIAcore at t_0 , after 3 weeks and after 3 months.

2.6. Release experiments

The release experiments were performed using a Franz diffusion cell system, thermoregulated at 37 °C. Polymer membranes (Millipore, Durapore[®] HVLP 0.45 μm , made of PVDF polymer characterized by low protein binding) were used as a mechanical support for the formulations. The SVF without BSA was used as receiver fluid (13 mL). About 400 mg of each formulation was deposited on the membrane uniformly (the contact surface was 2 cm^2). It corresponds to a dose of 600 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. In the case of hydrogels, the thickness of formulation layer on the support membrane surface was 2 mm. After t_0 , 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h and 24 h, 1 mL of each receptor liquid were taken (and the exact mass of sample was noticed) and replaced by 1 mL of fresh liquid (this dilution was taken into account for peptide cumulated content calculations). (n=3)

2.7. Permeation of the peptide through *Cynomolgus macaque vaginal mucosa*

The aim of the presented study was to observe the influence of formulation composition on the permeation of minipeptide M48U1 through macaque vaginal mucosa. Macaque vaginal mucosa was used within an hour after animal sacrifice. The vaginal tissue was delivered in RPMI medium survival fluid and in ice. Then it was rinsed with Ringer solution (pH 6) and the oxygenating system was connected (O₂ and CO₂). The tissue was cut into pieces using a scalpel. The layers corresponding to the internal part of the body (external from the vaginal lumen) were cut off as much as possible (the final tissue thickness was 1.5 – 2 mm). The pieces were then immediately mounted in Ussing diffusion chambers thermoregulated at 37 °C. The simulated vaginal fluid without BSA was placed in the donor compartment (2 mL). Ringer solution (pH 6) was used as a receiver fluid (2 mL). (n=3).

Then, 0.1 mL of each pluronic gel were taken at the liquid state (at 4 °C) and deposited on the tissue as uniformly as possible (the surface was 21.58 mm²) using a syringe with a long needle (total syringe volume: 1 mL). The chamber was kept at 37 °C until the gelification of F127/HPMC and F127/F68/HPMC formulations. Then, the donor and receiver compartments were filled with the corresponding fluids. The oxygenation system was placed only from the receiver side (it produces too much foam on the donor side in the presence of pluronics).

The same experiment was conducted on a solution of peptide M48U1 in citrate buffer. The Ussing chamber was firstly filled with donor and receiver fluids, and then 0.1 mL of a solution containing the peptide was added to the donor compartment. The oxygenation system was then placed in the Ussing chamber.

The applied dose corresponds to 13.9 µg of peptide for 1 mm² of mucosal tissue.

After t_0 , 30 min, 60 min, 90 min and 120 min, 0.1 mL of each sample were taken from the receiver and the donor sides and replaced with fresh Ringer solution.

After 120 min of experience, the receptor and donor liquids were removed and the tissue was rinsed from the donor side with 1 mL of Ringer solution. The most external tissue layer containing the mucosal cells were removed with a sharp edge (the edge of scissors) and put in 1 mL of Ringer solution. The underlying layer of tissue corresponding to the deeper vaginal tissue was cut into small pieces with scalpel and put in 1 mL of Ringer solution. In order to extract the peptide from the tissue, the samples were put into ultrasound bath with ice during 15 min. The samples were conserved at a temperature of $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. The concentration of the peptide in the samples was evaluated by using mass spectroscopy analysis.

3. Results and discussion

In the present work, we formulated the anti-HIV-1 peptide M48U1 into thermosensitive and mucoadhesive pluronic hydrogels. According to our previous work, we make choice to formulate the peptide M48U1 into two pluronic hydrogels F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%). These two formulations were insensitive to dilutions with SVF. Both hydrogels kept their rheological and mucoadhesive characteristics after dilution (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010).

Actually, the universal placebo used for clinical tests is composed of HEC. Even though this hydrogel showed a lack anti-HIV activity using *in vitro* assays and macaque models (Tien *et al.*, 2005), the safety of this hydrogel was proven (Buckheit *et al.*, 2010, Tien *et al.*, 2005). We sought to use HEC as a control to investigate the toxicity of pluronic hydrogels. The eventual toxicity of the pluronic hydrogels was studied *in vitro* using human HeLa cells, derived from a cervical cancer. As we can observe from Figure 1, the two pluronic hydrogels

showed no toxicity of HeLa cells after 24 h. The cell viability was found more than 80 % for all samples. Based on student test, results were not significantly different indicating that the gels can therefore be considered as non toxics on HeLa cells. These results were in accordance with data from the literature on the toxicity of pluronic hydrogels. Pluronic F127 has been approved by the FDA for use as food additives and pharmaceutical ingredients (Xiong et al., 2006, Wittemann et al., 2007, Lee et al., 2004). Moreover, anticancer drugs encapsulated in pluronic micelles have entered the stage of phase II clinical trial by the intravenous route (Valle, et al., 2010, Davis et al., 2008, Armstrong et al., 2006, Minko et al., 2005, Danson et al., 2004, Alakhov et al., 1999). A previous study showed that the immediate viability dropped to below 95 % when exposing mammalian cells to thermally responsive nanocapsules (1 mg/mL) made of Pluronic F127 and polyethylenimine (Zhang et al., 2009) which further indicates the superior biocompatibility of the pluronic F127-based hydrogels reported here.

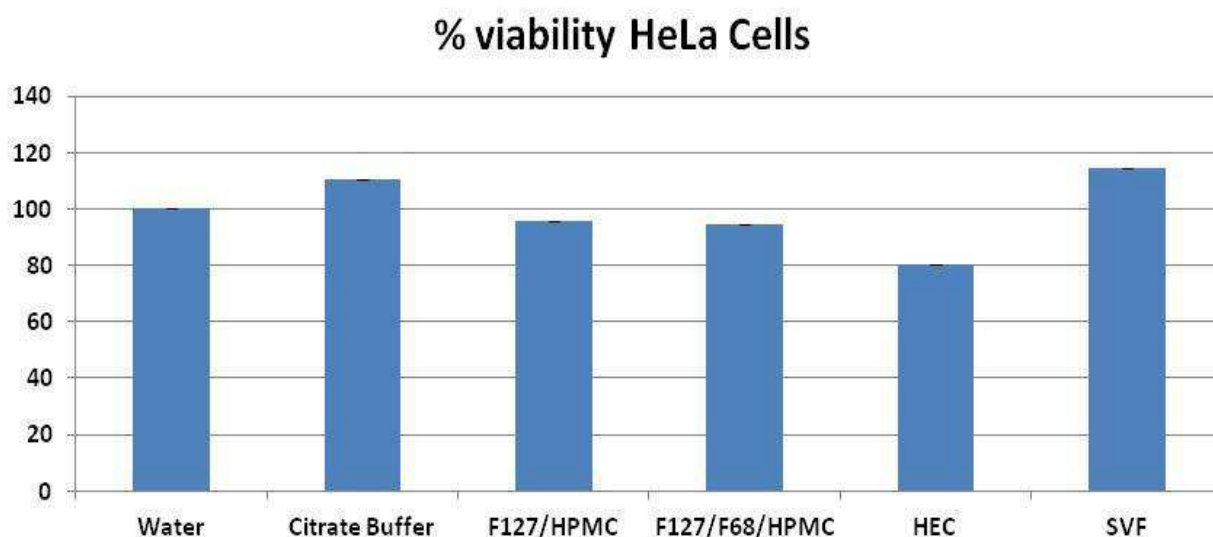


Figure 1: HeLa cell viability after 24 h of contact with F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%) hydrogels, in comparison with HEC and water.

The nontoxic nature, the thermal responsiveness and excellent mucoadhesion of hydrogels composed of F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%) make them extremely interesting as delivery device for the peptide M48U1. The formulation of this peptide was thus achieved. The peptide was stable in all hydrogel formulations during 3 months at 4 °C; 100 % of peptide was detected in the formulation. At 37 °C, M48U1 was stable only after 3 weeks (100 % of the peptide was detected). However, the peptide was sensitive to the temperature because after 3 months, only 20 % of peptide was detected in all the formulations.

The release kinetics of peptide M48U1 from the hydrogels was then studied during 24 hours by using Franz diffusion cell system. From the results on figure 2A, during the first 4 hours, no significant differences in the release kinetics were detected. Indeed, about 40 % of peptide was released in the case of HEC, F127/HPMC and F127/F68/HPMC hydrogels after 4 hours. It is worth to note that within these 4 hours the hydrogels composed of F127/HPMC and F127/F68/HPMC conserved their rheological properties and remained in the form of gels. They were well gelled and they did not flow in comparison with HEC hydrogel.

After 24 hours of release experiments, significant differences were observed for the three studied formulations. Indeed, HEC hydrogel released all the peptide to the receiver fluid. In the case of hydrogels composed of F127/HPMC and F127/F68/HPMC, about 25 % of M48U1 contained in the formulations did not diffuse to the receptor fluid (Figure 2).

These results are of utmost importance when foreseen *in vivo* applications of the pluronic/HPMC hydrogels containing M48U1. Indeed, an important amount of the drug released during the first hours is available to interact with HIV, while 25 % of the drug remaining in the formulation may constitute a permanent barrier preventing HIV-1 diffusion through vaginal mucosa (Figure 2.B).

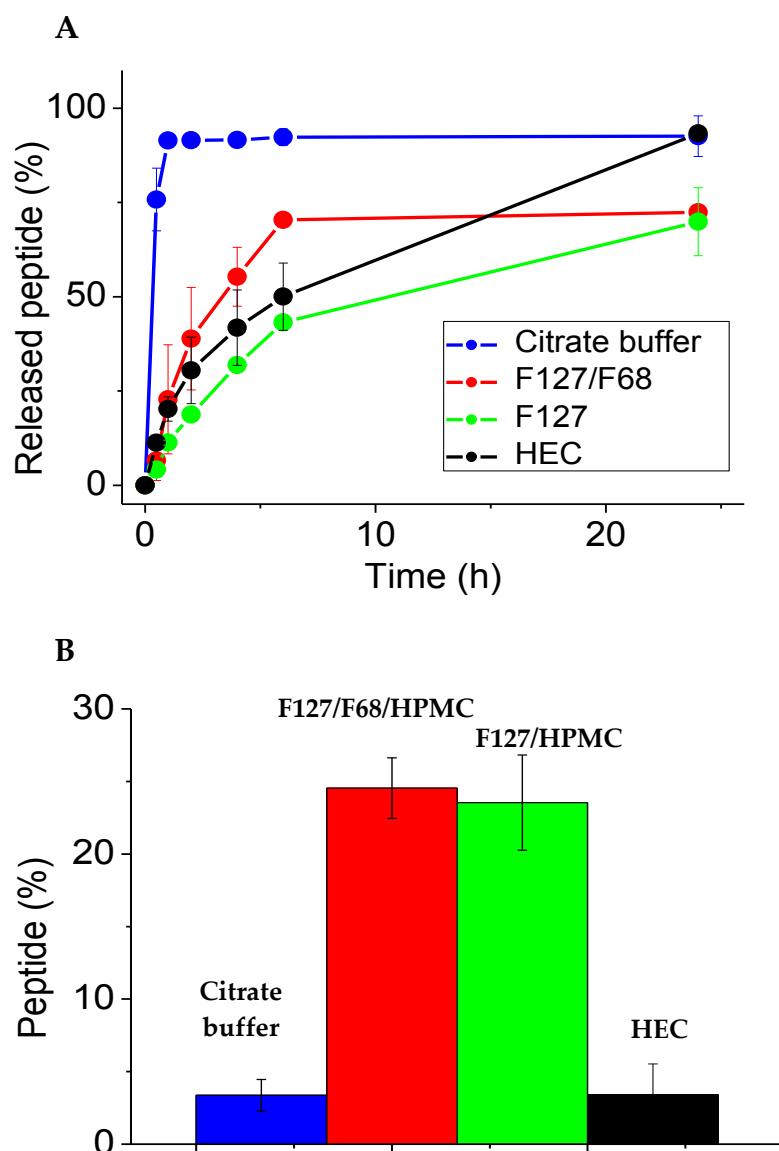


Figure 2. (A) *in vitro* release kinetic profiles of the peptide M48U1 during 24 hours from F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%) hydrogels, in comparison with HEC and citrate buffer. (B) The amount of peptide remaining at the membrane surface after the 24 hours of release in Franz diffusion cells. Results are expressed as percentages of applied dose.

Finally, the permeation of minipeptide M48U1 through vaginal macaque mucosa was evaluated using Ussing chamber device. The permeation was evaluated for all the formulations containing the peptide M48U1 through the macaque vaginal tissue. No peptide

was detected, using surface plasmon resonance technique, in the receiver compartment during the experiment. After the experiment, the peptide content has been also determined in the superficial mucosa and in the deeper tissue layers by mass spectroscopy technique, due to the presence of other protein/peptides in the samples. From the results and in our analysis conditions, the peptide does not cross the vaginal macaque mucosa.

4. Conclusions

Besides their interesting rheological and mucoadhesive properties, the non-toxicity of the pluronic-based hydrogels was proved in the present work. The pluronic hydrogels were adapted to the hydrophilic nature of the peptide M48U1, which was successfully formulated in F127/HPMC and HPMC/F68/HPMC hydrogels. We also demonstrated that these two hydrogels were able to sustain the release of the peptide during 24 hours. These results are of utmost importance when considering *in vivo* applications of the pluronic/HPMC hydrogels containing M48U1. Indeed, an important amount of the drug released during the first hours was available to interact with HIV-1, while 25 % of the drug remaining in the formulation could constitute a barrier for preventing HIV-1 diffusion through vaginal mucosa.

These formulations are promising formulations for helping to the prevention of HIV-1 sexual transmission. Indeed, the thermosensitive and mucoadhesives gels may act as a barrier against the HIV entry by the vaginal mucosa which needs to be evaluated *in vivo*.

5. References

- ✓ Aka-Any-Grah A., Bouchemal K., Koffi A., Agnely F., Zhang M., Djabourov M., Ponchel G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 76, 296-303.
- ✓ Alakhov V., Klinski E., Li S.M., Pietrzynski G., Venne A., Batrakova E., Bronitch T., Kabanov A. Block Copolymer-Based Formulation of Doxorubicin. From Cell Screen to Clinical Trials. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 1999, 16, 113-134.
- ✓ Armstrong A., Brewer J., Newman C., Alakhov V., Pietrzynski G., Campbell S., Corrie P. M. R., Valle J.W. Sp1049c as First-Line Therapy in Advanced (Inoperable or Metastatic) Adenocarcinoma of the Oesophagus: A Phase II Window Study. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 4080.
- ✓ Bouchemal K., Agnely F., Koffi A., Ponchel G. A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1,2 on Pluronic F-127 micellization using isothermal titration microcalorimetry. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2009, 338, 169-176.
- ✓ Danson S., Ferry D., Alakhov V., Margison J., Kerr D., Jowle D., Brampton M., Halbert G., Ranson M. Phase I Dose Escalation and Pharmacokinetic Study of Pluronic Polymer-Bound Doxorubicin (Sp1049c) in Patients with Advanced Cancer. *Br. J. Cancer* 2004, 90, 2085-2091.
- ✓ Davis M.E., Chen Z.G., Shin D.M. Nanoparticle Therapeutics: An Emerging Treatment Modality for Cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2008, 7, 771-782.
- ✓ Koffi A.A., Agnely F., Ponchel G., Grossiord J-L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006, 27, 328-335.
- ✓ Lee S. H., Lee J. E., Baek W. Y., Lim J. O. Regional Delivery of Vancomycin Using Pluronic F-127 To Inhibit Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

- Growth in Chronic Otitis Media In Vitro and In Vivo. *J. Control. Release* 2004, 96, 1–7.
- ✓ Martin L., Stricher F., Missé D., Sironi F, Pugnieri M, Barthe P, Prado-Gotor R, Freulon I, Magne X, Roumestand C, Menez A, Lusso P, Veas F, Vita, C. Rational design of a CD4 mimic that inhibits VIH-1 entry. and exposes cryptic neutralization epitopes. *Nat. Biotechnol.* 2003, 43, 71-76.
 - ✓ Martin, G., Burke, B., Thai, R., Dey, A.K., Combes, O., Ramos, O.H.P., Heyd, B., Geonnotti, A.R., Montefiori, D.C., Kan, E., *et al.* 2011. Stabilization of HIV-1 envelope in the CD4-bound conformation through specific cross-linking of a CD4 mimetic. *J Biol Chem* 286:21706-21716.M
 - ✓ Minko, T.; Batrakova, E. V.; Li, S.; Li, Y.; Pakunlu, R. I.; Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V. Pluronic Block Copolymers Alter Apoptotic Signal Transduction of Doxorubicin in Drug-Resistant Cancer Cells. *J. Control. Release* 2005, 105, 269–278.
 - ✓ Owen, DH, Katz, DF. A vaginal fluid simulant. *Contraception* 1999, 59 (2), 91–95.
 - ✓ Polsky B., Baron P.A., Gold J.W.M, Smith J.L., Rodney H.J., Armstrong D *et al.* In vitro inactivation of HIV-1 by contraceptive sponge contains nonoxynol-9. *Lancet* 1988, 331(8600), 1456.
 - ✓ Stricher F, Huang C. C, Descours A, Duquesnoy S, Combes O, Decker J. M, Kwon Y. D, Lusso P, Shaw G. M, Vita C, Kwong P. D, Martin L. *J Mol Biol.* 2008, 382, 510-24.
 - ✓ Valle J. W., Armstrong A., Newman C., Alakhov V., Pietrzynski G., Brewer J., Campbell S., Corrie P., Rowinsky E.K., Ranson M. A Phase 2 Study of Sp1049c, Doxorubicin in P-Glycoprotein-Targeting Pluronic, in Patients with Advanced Adenocarcinoma of the Esophagus and Gastroesophageal Junction. *Invest. New Drugs* 2010, ePub: Feb. 24, 2010.

- ✓ Van Damme L., Ramjee G., Alary M., Vuylsteke B., Chandeying V., Rees H., et al. Effectiveness of COL-1492, a nonoxynol-9 vaginal gel, on HIV-1 transmission in female sex workers: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002b, 360, 971-977.
- ✓ Van Herrewege Y., Morellato L., Descours A., Aerts L., Michiels J., Heyndrickx L., Martin L., Vanham G. CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides. *J Antimicrob Chemother.* 2008, 61, 818-826.
- ✓ Wittemann A., Azzam T., Eisenberg A. Biocompatible Polymer Vesicles from Biamphiphilic Triblock Copolymers and Their Interaction with Bovine Serum Albumin. *Langmuir* 2007, 23, 2224–2230.
- ✓ Xiong X.Y., Tam K.C., Gan L. H. Synthesis and Thermally Responsive Properties of Novel Pluronic F87/Polycaprolactone (PCL) Block Copolymers with Short PCL Blocks. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006, 100, 4163–4172.
- ✓ Zhang W., Rong J., Wang Q., He X. The Encapsulation and Intracellular Delivery of Trehalose Using a Thermally Responsive Nanocapsule. *Nanotechnology* 2009, 20, 275101.

Chapitre IV

Synthetic nanoparticles were better immobilized into thermosensitive pluronic hydrogels than in macaque cervico-vaginal mucus

SYNTHETIC NANOPARTICLES WERE BETTER IMMOBILIZED INTO THERMOSENSITIVE PLURONIC HYDROGELS THAN IN MACAQUE CERVICO-VAGINAL MUCUS

Armelle AKA-ANY-GRAH^{a,b}, Kawthar BOUCHEMAL^{a*}, Valérie NICOLAS^c, Christian POÛS^d,
Armand KOFFI^b, Nathalie BOSQUET^e, Loïc MARTIN^f, Roger LEGRAND^e, Gilles PONCHEL^a

a. Université Paris-Sud, UMR CNRS 8612 « Physicochimie - Pharmacotechnie - Biopharmacie »,
Faculté de Pharmacie, 5, Rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France.

b. Laboratoire de Pharmacologie et de Pharmacocinétique, UFR des sciences pharmaceutiques et
Biologiques d'Abidjan, 01 BP V 34 Abidjan 01, Téléx 26138 Côte d'Ivoire.

c. Université Paris-Sud, Unit of cellular Imagery, IFR 141- IPSIT, Faculté de Pharmacie, 5, Rue
J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France.

d. Biochimie et Biologie Cellulaire – JE2493, Université Paris Sud, IFR 141, Faculté de
Pharmacie, 5, Rue J.B. Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex, France.

e. CEA, iMETI, Division of Immuno-Virology, Fontenay-aux Roses, France

f. CEA, iBiTecS, Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines, Gif sur Yvette, France

*Corresponding author: kawthar.bouchemal@u-psud.fr

France. Tel : +33 (0)1 46 83 55 81. Fax : +33 (0)1 46 61 93 34.

Abstract

To be efficient, vaginal microbicide hydrogels should form a barrier against viral infections and prevent virus spreading through the mucus. The aim of the present work was to evaluate the mobility of carboxylate-modified polystyrene nanoparticles, which are close to the mature HIV-1 size, into thermosensitive hydrogels composed of pluronic F127 (EO₉₉PO₆₉EO₉₉) alone or in mixture with F68 (EO₈₀PO₂₇EO₈₀), in presence of mucoadhesive hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) polymer (F127/HPMC 20/1 wt%; F127/F68/HPMC 22.5/2.5/1 wt%). Here, EO and PO denote the hydrophilic oxyethylene block and the hydrophobic oxypropylene block respectively. The analyses of the trajectories, the calculation of the geometric ensemble-average mean square displacement (MSD) and the average diffusivity (D_{eff}) of carboxylate-modified polystyrene nanoparticles in the samples were achieved using videomicroscopy. The results showed that the nanoparticle mobility was 1321 and 593-fold slower into the two pluronic hydrogels in comparison with hydroxyethylcellulose (HEC) 1.5 wt% hydrogel, which is usually used as a reference in the clinical studies of vaginally applied drugs. Furthermore, the mobility of these particles was more hindered in the pluronic hydrogels in comparison with *Cynomolgus macaque* cervico-vaginal mucus.

Keywords: pluronic hydrogels, video microscopy, particle tracking, HIV-1.

1. Introduction

According to the latest estimations of the World Health Organization, more than 448 million of new cases of sexually transmitted infections are reported annually throughout the world. Particularly, vaginal infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is a worldwide problem with more than 40 million people infected. This pandemic infection is particularly acute in some developing countries including those of sub-Saharan Africa. Condom use remains the most effective protection against sexual transmission of HIV, but, women are often not empowered to negotiate that use. With regard to the prevalence of the infection, different strategies were investigated to block HIV transmission. Among these strategies, efforts were stressed on the design of vaginal microbicide formulations self-administered by women before intercourse. In this context, the aim of this work is to design mucoadhesive hydrogels to prevent sexually-transmitted HIV. This mucoadhesive hydrogel could be able to form a barrier against viral infections. This barrier could act like a “trap” able to immobilize the viruses and avoid their attachment to the vaginal mucosal surfaces.

Among the different strategies employed to form a barrier against HIV-1 and or HSV vaginal infections, including, semi-solid gels, creams, vaginal rings and vaginal films (Garg & Vermani, 2000, Rohan & Sassi., 2009), thermosensitive hydrogels, represents an extremely interesting strategy. Particularly, $(EO_{98}PO_{69}EO_{98})$, denoted F127 in the pluronic grid and P407 in the poloxamer grid, is of utmost interest in drug pharmaceutical formulation. Indeed, under certain concentration, these systems are fluid at room temperature (25 °C) facilitating their administration (for instance, via syringes or adequate device), and in the form of gel above sol-gel transition temperature promoting prolonged release of active drugs at body temperature (37 °C). Here, EO denotes hydrophilic oxyethylene $[OCH_2CH_2]$; PO denotes hydrophobic oxypropylene $[OCH_2-CH(CH_3)]$, and the subscripts denote the number-average block length in repeat units.

Contrarily to semi-solid hydrogels, the administration of the formulation in the form of solution facilitates its spreading on the mucosa, while the formation of hydrogel layer on the mucosa could allow the formation of a physical barrier against virus diffusion. However, despite these advantages of pluronic hydrogels, they were not explored until now as vaginal microbicides.

The principal objective of this work was to show that measuring the barrier effect of hydrogels is possible with “soft techniques”. We will try to correlate this barrier effect with the intrinsic structure of our formulation versus controls composed *Cynomolgus macaque* cervico-vaginal mucus (CVM), hydroxyethylcellulose (HEC) and water. For the reminder, HEC is used as a universal placebo control for clinical studies because of its safety (Buckheit *et al.*, 2010, Tien *et al.*, 2005).

Previous works reported different techniques for the investigation of this barrier effect by using viruses or virus-like particles. Diffusion chambers and theirs derivatives like Transwell-Snapwell chambers were deeply used for hydrogel samples. The principle is based on donor-receptor duality. The sample containing tracking substance, such as polystyrene particles, is placed in a donor chamber and we observe their passage in a receiver chamber filled with an appropriate liquid media (Miyazaki *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2000). However, this technique did not allow controlling parameters such as the thickness and the uniformity of the sample layer, the influence of preparation and handling on the structure of the sample and optimal diameter of pore to prevent blockage with the hydrogel sample (Lai *et al.*, 2009). Fluorescently-labeled probe observations using fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), Single or Multiple Particle Tracking (SPT/MPT) and Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) are other techniques that present the advantage of being “soft techniques” without effect on the structure of the sample (Braeckmans *et al.*, 2010). These methods demonstrated the utility of using fluorescence-techniques to study transport and stability of particles in different media. Particularly, Single or Multiple Particle Tracking can give information at individual particle scale, while fluorescence microscope

equipped with laser (FRAP) method gives ensemble-average data. These techniques are based on FRAP or photo diodes (FCS) as light source and acousto-optic filters or modulators. For SPT a fast and sensitive camera is added to the system. This camera permits to analyze dynamic phenomena like particle movements in a medium by showing each particle by a dot. The size of the dot is related to the resolution of the objective and it is possible to calculate the positions of particles with sub-resolution precision using algorithms that can calculate the centers of the dots (Sbalzarini & Koumoutsakos *et al.*, 2005).

Using polystyrene particles to mimic the size of HIV-1 can help understanding their behavior in our formulations. The size of HIV-1 virions ranges from 120 to 180 nm, while mature HIV-1 size ranges from 140 to 220 nm (Briggs *et al.*, 2003). HIV-1 particles are known to be entrapped in human cervico-vaginal mucus (Cone *et al.*, 2009, Boukari *et al.*, 2009, Lai *et al.*, 2009). Indeed, the negatively charged virus envelope is composed of a lipidic bilayer. This hydrophobic surface leads to adhesive interaction with mucus. However, these bonds are weak and are continuously broken resulting in virus diffusion to reach epithelium surface. The virus envelope contains proteins and is consequently charged. The COOH-modified polystyrene nanoparticles (COOH-PS) can mimic virus because of they are hydrophobic and charged surface. In the literature 200 nm COOH-PS show similar transport rate to HIV in non ovulatory mucus (Lai *et al.*, 2007, 2009).

In the present work, we used multiple particles tracking to quantify the mobility of 170 nm fluorescently-labeled COOH-PS nanoparticles into pluronic-based hydrogels. The results compared to the nanoparticle mobility in HEC hydrogel and in *Cynomolgus macaque* CVM, showed that with 170 nm COOH-PS were immobilized by pluronic-based hydrogels than macaque CVM. The mechanistic reasons of this immobilization were discussed and compared with the data in the literature.

2. Materials

Pluronic F127 and F68 (European Pharmacopea 6th Edition 6.7) of pharmaceutical grade were a gift from BASF. According to the supplier, the weight average molecular weights (M_w) were about 13,500 g.mol⁻¹ (9840–14,600 g.mol⁻¹) and 8400 g.mol⁻¹ (7680–9510 g.mol⁻¹) for pluronic F127 and F68, respectively. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) (Methocel[®] K4M series MM87091702 K) was a gift from Colorcon and hydroxyethylcellulose (HEC) was from Natrosol, Aqualon, USA. Metacryloxyethylthiocarbamoyl-rhodamine B was from Polysciences Inc. Biovalley. Fluorescent polystyrene nanoparticles (PS-SpeckTM Microscope Point Source Kit yellow-green fluorescent beads were from InvitrogenTM, Molecular Probes[®] Eugene, Oregon, USA). The particles size was 170 ± 5 nm as provided by the manufacturer. Citric acid monohydrate was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and trisodium citrate dehydrate was from Prolabo (Paris, France).

Macaque CVM was collected from 24 naïve female *Cynomolgus macaque* (*Macaca fascicularis*).

3. Methods

3.1. Preparation of citrate buffer

The pH of vaginal hydrogels has to be in the range of 4–5. For this purpose, we make choice to use citrate buffer prior to distilled water in the aim to prevent pH variation of the formulations. Citrate buffer solution 5 mM at pH 4 to 4.5 was prepared by dissolving citric acid monohydrate and trisodium citrate dihydrate in distilled water.

3.2. Preparation of hydrogels

Hydrogels were prepared by weight according to the so-called “cold method” (Koffi *et al.*, 2006, Aka-Any-Grah *et al.*, 2010, Bouchemal *et al.*, 2009), but by using a magnetic stirrer instead of mechanical one.

For the preparation of pluronic-based hydrogels (F127 wt% and F127/F68 22.5/2.5 wt%), the pluronic powders were gradually added under agitation (1000 rpm) at 4 °C to a liquid phase, which consisted on citrate buffer. The different preparations were denominated by two numbers indicating the w/w percentage of pluronic F127 and pluronic F68, respectively.

For the preparation of formulations composed of F127/HPMC (20/1 wt%) and F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%), HPMC powder was gradually added under magnetic agitation (1000 rpm) at 4 °C to citrate buffer solution. After complete dissolution of HPMC, the pluronic powders were gradually added to this phase under the same conditions (magnetic agitation speed: 1000 rpm at 4 °C). Preparations composed of F127/F68/HPMC were denominated by three numbers indicating the w/w percentage of pluronic F127, F68 and HPMC, respectively.

In all cases, after complete dissolution of pluronic and/or HPMC powders, each formulation was equilibrated 48 h at 4 °C to eliminate foam and air bubbles.

3.3. Observation in glass vial system

Approximately 5 g of hydrogel was reversed in liquid form in a vial. Using a micropipette 100 microliters of rhodamine B solution were introduced to approximately one cm in-depth of hydrogel contained in a 10 mL vial. The vial was placed in a thermostated bath at 37 °C. The system was observed after 5 min, 30 min, 3 h, 24 h, 48 h and 72 h.

3.4. Videomicroscopy and multiple particles tracking

Particle transport rates were measured by analyzing trajectories of fluorescent particles in the hydrogels (F127/HPMC 20/1 wt%, F127/F68/HPMC 22.5/2.5/1 wt%, HEC 1.5 wt%) and in macaque CVM. The results were compared to the particle trajectories in water. Microscopic observations were made using an inverted AxioObserver Z1-Colibri (Zeiss, Germany) videomicroscope equipped with a CCD HS_m camera (9.9 μm pixel size) under optimal incubation conditions provided by a XL incubator. Time lapse images were acquired with a Plan-Apochromat 63X/1.4 NO oil-immersion objective lens, a 470nm LED for excitation and a BandPass 505-550 nm filter to collect the emission of fluorescence. The data sets were processed using ImarisTrack 7.1.1 (Bitplane AG, Zurich) and excel software. Experiments were carried out in 8-well glass chambers (Labtek, Campbell, CA), where 10 μL of 1/10 diluted particles solutions were added to 250 μL of hydrogel, macaque CVM or water and incubated for 2 h at 37 °C before microscopy. Trajectories of n=10 particles were analysed. Movies were captured with Axiovision 4.8 (Zeiss, Germany) software at a temporal resolution of 210 ms for 30 s. The coordinates of nanoparticle centroid were transformed into time-averaged MSD (Equation 1 and 2), from which distributions of MDSs were calculated as demonstrated (Schweizer., 2007).

Equation 1
$$\Delta x_1 (\Delta t) = x_2 - x_1$$

where $x_1 = x(t_1)$ $x_2 = x(t_1 + \tau)$ and τ is a fixed time lag

Equation 2
$$(\Delta r_1(\tau))^2 = (\Delta x_1(\tau))^2 + (\Delta y_1(\tau))^2$$

4. Results

4.1. Macroscopic observations of the diffusivity of fluorescent dye into the hydrogels

We first sought to use rhodamine as a fluorescent dye to investigate its diffusivity in the hydrogels. As we can observe in Figure 1, a clear difference in the distribution of rhodamine was observed between HEC and pluronic hydrogels. In the first 3 h rhodamine was localized in a confined zone in the pluronic hydrogels, while rhodamine spreads on the surface of the HEC (1.5 wt%). Qualitatively speaking, we did not observe any difference between the two pluronic samples, F127 (20 wt%) and F127/F68 (22.5/2.5 wt%). After 24 h, rhodamine had reached all the volume of HEC sample in contrast with pluronics hydrogels. Even after 72 h, rhodamine did not reach all the volume of the pluronic hydrogels (Figure 1).



Figure 1a: 0-5 min

Figure 1b: 30 min

Figure 1c: 3 h



Figure 1d: 24 h

Figure 1e: 48 h

Figure 1f: 72 h

Figure 1: Macroscopic observation of free rhodamine diffusion through formulations with HEC (1.5 wt%) (vial 1), F127 (20 wt%) (vial 2), de F127/F68 (22.5/2.5 wt%) (vial 3).

4.2. Multiple particles tracking using videomicroscopy

We next studied, using high-resolution multiple particle tracking, the transport of fluorescently-labeled carboxylate-modified polystyrene particles (COOH-PS, 170 nm size) in pluronic hydrogels. Two different formulations based on pluronic hydrogels were used F127/HPMC 20/1 wt% and F127/F68/HPMC 22.5/2.5/1 wt%. Noteworthy, F68 was added to modulate the T_{gel} , while HPMC at a concentration of 1 wt% was added to improve the mucoadhesion of these hydrogels (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010).

The results were compared to the movements of COOH-PS nanoparticles in the HEC 1.5 wt%, water and fresh undiluted macaque CVM. As we can see in 2D trajectories in Figure 2.A, nanoparticles in water exhibited a typical trajectory profile of the Brownian motion. We quantified the transport rates of different particle formulations in mucus by their time scale-dependent geometric ensemble-average mean square displacement (MSD) (Figure 3).

The slope α of each MSD curve was determined by fitting MSD to the equation $MSD = 4 D_0 \tau^\alpha$, where D_0 is the time scale-independent diffusion coefficient, τ is the time scale. For the reminder, α ranges from 0 for completely immobile particles, to 1 for unobstructed Brownian diffusion, such as that of particles in water. Thus, a decrease of α value indicates increasing obstacle to particle movement. The slope of the MSD curves α presented in Table 1 showed that $\alpha=1$ as expected for pure unobstructed Brownian diffusion of particles in water.

However, the analysis of the nanoparticle trajectories in macaque CVM indicates that their mobility appears to be more complicated than in water. Indeed, the mucus immobilized a part of the nanoparticles, while another part of the nanoparticles exhibited a Brownian or near-Brownian trajectories (Figure 2.A). These results were in accordance with those reported by the literature (Lai *et al.*, 2007).

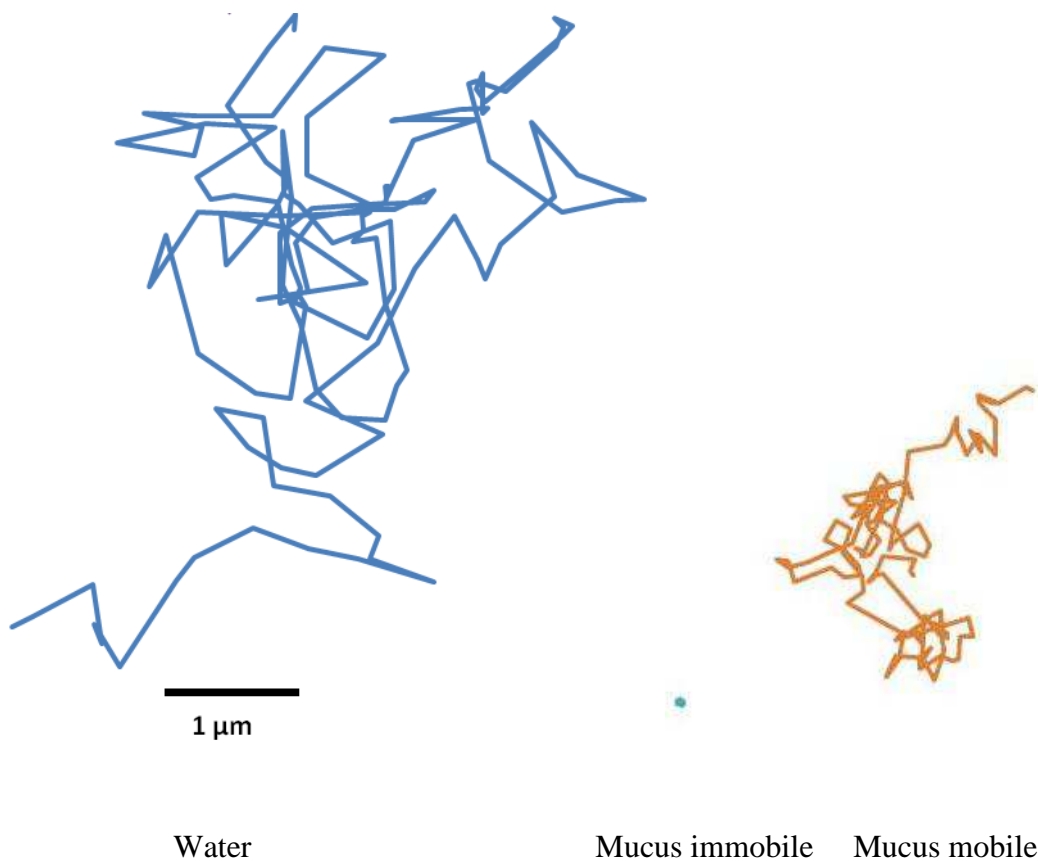


Figure 2.A: The mobility of the nanoparticles in the mucus exhibited two different trajectories.

Qualitatively, we observed that particle motion decreased in HEC in comparison with their mobility in water and that COOH-PS nanoparticles seem to be better immobilized in the macaque CVM than in HEC. Interestingly, the nanoparticles were also strongly immobilized in pluronic hydrogels F127/HPMC and F127/F68/HPMC, as evidenced by the highly constrained, non-Brownian time-lapse traces of typical particles in Figure 2.B.

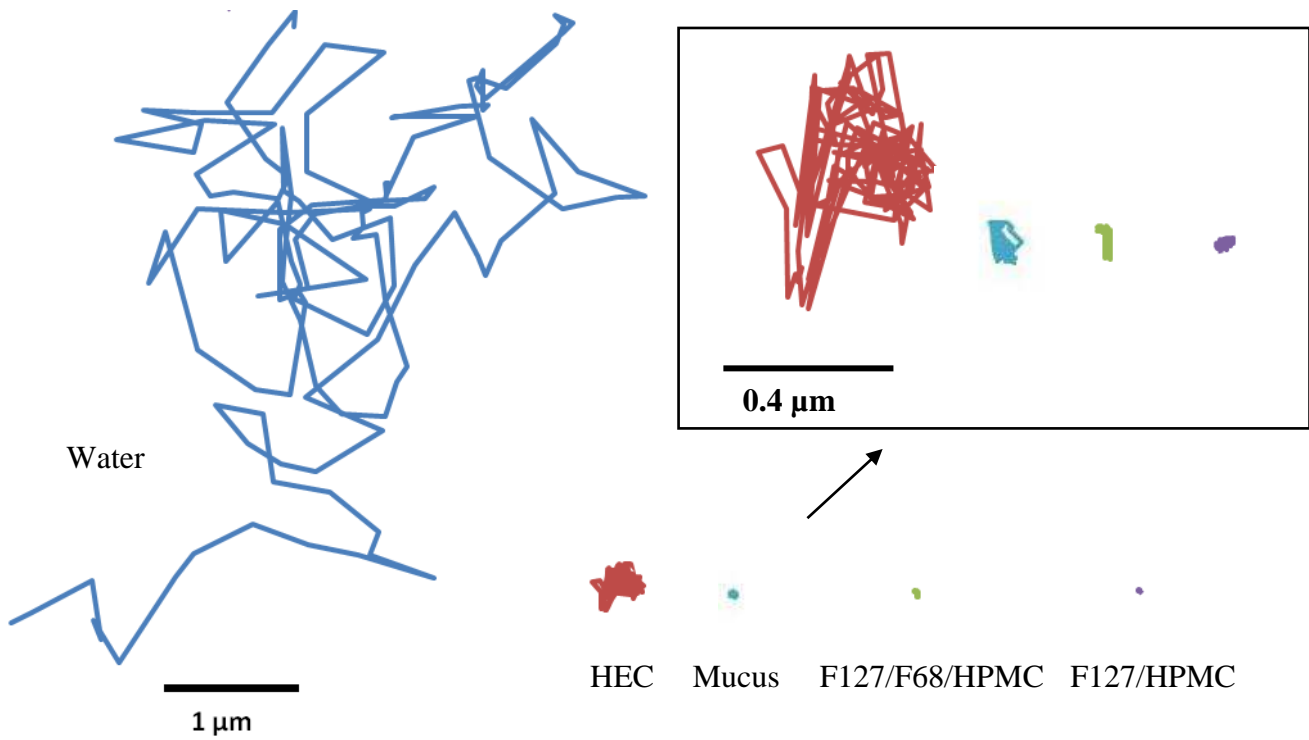


Figure 2.B: Nanoparticle trajectories in HEC 1.5 wt%, macaque CVM, F127/F68/HPMC 22.5/2.5/1 wt%, F127/HPMC 20/1 wt% and water.

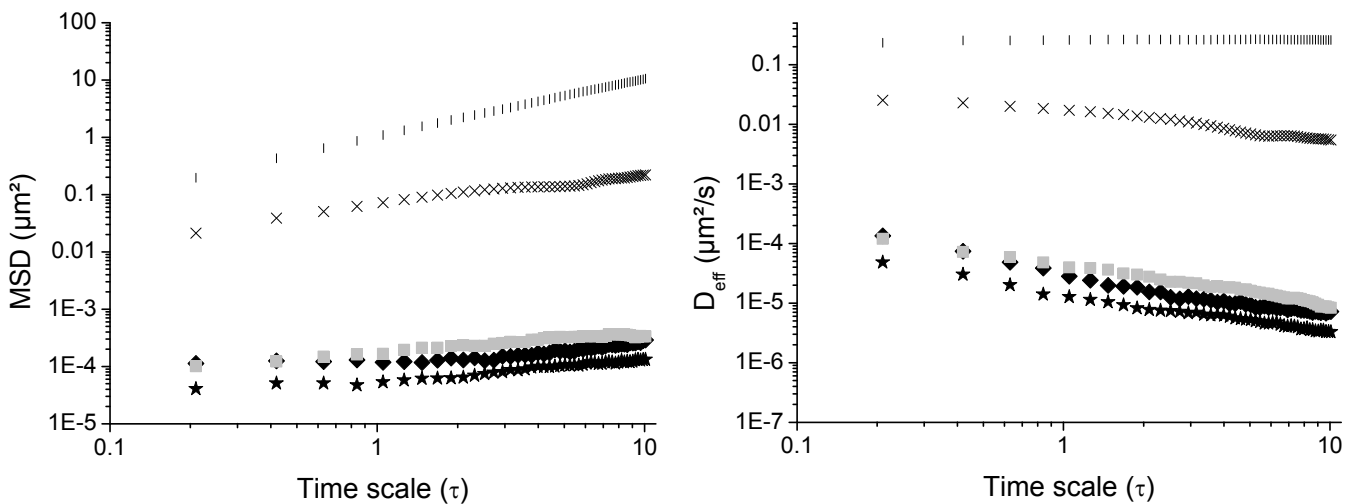


Figure 3: Comparison of the average mean square displacements (MSD) as a function of time scale of COOH-PS particles in (-) water, (×) HEC 1.5 wt% and (■) macaque CVM, (★) F127/HPMC 20/1 wt% and (◆) F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%). (n = 10).

At a time scale of 1 s, the MSD and the average diffusivity for the nanoparticles in pluronic hydrogels (D_{eff}) F127/HPMC and F127/F68/HPMC were 1321 and 593-fold slower respectively than in HEC, and only 3 and 1.4-fold slower than in macaque CVM (Table 1). The combination of all the results allows to conclude that, contrarily to F127/HPMC hydrogel, the pluronic mixture of F127/F68/HPMC is more favorable to the diffusion of the nanoparticles.

Table 1: Values of MSD, α and D_{eff} of COOH-PS nanoparticles in different media.

Sample	MDS μm^2 at 1 s	α	D_{eff} ($\mu\text{m}^2/\text{s}$) at 1 s	D_{eff}/D_w
Water	1.09	1	0.26	1
HEC 1.5 wt%	0.07	$56 \cdot 10^{-3}$	0.017	0.065
macaque CVM	$1.66 \cdot 10^{-4}$	$0.070 \cdot 10^{-3}$	$3.95 \cdot 10^{-5}$	$15.19 \cdot 10^{-5}$
F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%)	$1.18 \cdot 10^{-4}$	$0.020 \cdot 10^{-3}$	$2.80 \cdot 10^{-5}$	$10.76 \cdot 10^{-5}$
F127/HPMC 20/1 wt%	$0.53 \cdot 10^{-4}$	$0.009 \cdot 10^{-3}$	$1.27 \cdot 10^{-5}$	$4.88 \cdot 10^{-5}$

5. Discussion

The first step in viral infection by the vaginal route involves the virus diffusion through the vaginal mucus, followed by its attachment through its envelope proteins with their receptors on the surface of the vaginal host cell. Mucus is an entangled viscoelastic gel (Carlstedt & Sheehan., 1989, Cone., 1999, Forstner *et al.*, 1995, Amerongen *et al.*, 1998) that coats the surfaces of the vaginal tract provides the outermost barrier against viral infections. Previous articles have demonstrated, using multiple particle tracking, that mucus barrier was able to slow-down virus movements. The HSV (180 nm) movement in mucus was decreased 200-fold compared to water (Olmsted *et al.*, 2001), while the HIV movements were 15-fold and 1000-fold slower in normal

mucus and in acidic mucus respectively than in water (Lai *et al.*, 2009). However, the situation is, unfortunately, different when foreseen an *in vivo* situation because the vaginal viral infections continue to wreak havoc, and viruses are not hindered anymore, nor by the mucus layer, neither by the acidic solutions! This could be related to the surface properties of the viruses and to the mucus components (lipids, salts, macromolecules, cellular debris, and water) that work together with mucins to form a nanoscopically heterogeneous environment for virus transport. The combination of biochemical analysis (Yurewicz *et al.*, 1987) of the sugars attached to mucins predicts to electron microscopy (Slayter *et al.*, 1991) and AFM (McMaster *et al.*, 1999) of purified individual mucins indicate that the diameter of mucin fibers is 3–10 nm.

Actually, the “universal placebo” used for microbicide clinical trials is composed of HEC, that has been shown to lack anti-HIV activity *in vitro* assays and macaque models (Tien *et al.*, 2005). On a population of 10 particles, we noted that COOH-PS displacement is 16-fold lower in HEC than in water. The viscosity of HEC hydrogel, which is higher than water could partly explain this reduced mobility. According to the literature, the aqueous gel containing 1 wt% of HEC has a viscosity of 3500 – 5500 mPa.s, and a viscosity of 100 000 mPa.s for a concentration of 2 wt% (data from Natrosol technical data sheet), while water viscosity is 1 mPa.s.

In this context, our strategy consists on the design of a physical barrier composed of thermosensitive and mucoadhesive hydrogels, able to better immobilize the viruses, limiting thus their diffusion through the mucus and reach the epithelial cells. The ability of the hydrogel to hinder viral movements was estimated from the analysis of COOH-PS nanoparticles in the hydrogels and to compare the results obtained with their movements in mucus.

From our experiments presented in Figures 2 and 3, we observed that COOH-PS nanoparticles are strongly slowed-down in mucus in comparison with water or HEC hydrogel. This immobilization in the macaque CVM mucus results from the adhesive interaction of COOH-PS nanoparticles to

mucus. However, as we can see from Figure 2.A, a part of the nanoparticles was not immobilized by the mucus and exhibited a Brownian or near-Brownian trajectories. These findings are in accordance with those described in the literature (Lai *et al.*, 2007).

The first, and the simplest, theory to understand the diffusion mechanism of nanoparticles through the mucus is related to their size; small particles are small enough to diffuse through the large pores of the mucus. Collected data from the literature allows to conclude that this size pore is heterogeneous varying from 20 to 3000 nm. Depending on the technique used, the mucus pore size was evaluated at 650 ± 150 nm using freeze substitution and transmission electron microscopy (Yudin *et al.*, 1989), while scanning and transmission electron microscopy after dimethylsulfoxide-mediated glutaraldehyde fixation evaluated the mesh spacing between the mucin fibers at 20-200 nm (Saltzman *et al.*, 1994, Olmsted *et al.*, 2001). More recently, these pore size was estimated to 340 nm by multiple particle tracking (Lai *et al.*, 2010).

Due to its complex structure, a direct correlation between the size of the mucus pore and the diffusion of the nanoparticles is not obvious to establish. In contrast to large viruses (120-180 nm) which are trapped by the mucus, small virus-like particles consisting of the capsids of Norwalk virus (38 nm) and Human papillomavirus (59 nm), diffuse through human ovulatory cervical mucus (OCM) as fast as they diffuse through water (Olmsted *et al.*, 2001). It is worth to note that the viscosity of OCM is as much as 100-fold lower than that of CVM (Cone., 1999). However, the other results obtained by the same group suggest that the surface structure of the particles is of utmost importance for their mobility through the mucus. These results showed that even if the nanoparticle size is as small as HPV, which is lower than the mucus pore size, these particles were immobilized by the mucus. The low mobility of polystyrene particles was also observed for other ranges of sizes from 59 to 1000 nm (Olmsted *et al.*, 2001, Lai *et al.*, 2010). The immobilization of the hydrophobic COOH-PS nanoparticles in the mucus could be attributed to the adhesive and

hydrophobic interactions of the polystyrene nanoparticles with mucus hydrophobic domains (Lai *et al.*, 2007).

Coming back to our experiments conducted on pluronic hydrogels. The results at a time scale of 1 s, showed that the MSD and the average diffusivity of nanoparticles were 1321 and 593-fold slower in F127/HPMC and F127/F68/HPMC hydrogels than in HEC. The structure of HEC, which is uncharged linear polymer as ether cellulose hydrogels, is made by polymer chains forming a network characterized by a mesh pore size (Baumgartner *et al.*, 2002b, Baumgartner & Kristl., 2002a). However, pluronic gels are composed of micelles, which are organized in a crystalline structure as demonstrated by Zhang *et al.* (2012). This organization results from the high spreading of molecules such as rhodamine (Figure 1) and high mobility of nanoparticles (Figure 2.B) through HEC in comparison with pluronic-based hydrogels. At a time scale of 1 s, the MSD and the average diffusivity for the nanoparticles in pluronic hydrogels F127/HPMC and F127/F68/HPMC were only 3 and 1.4-fold slower than in macaque CVM. Due to its complex constitution, mucus can interact with a large variety of molecules.

The explanation of these results comes from the understanding of pluronic structure. Pluronic hydrogels at physiological temperatures are composed of a cubic compact phase arrangement of micelles. Small Angle X-Ray diffraction experiments have showed that the diameter of each micelle was about 22 nm, and the distance between the F127 20 wt% micelles was about 21 nm at a temperature higher than the T_{gel} (Zhang *et al.*, 2012). We propose to schematize the micellar arrangement of F127 20 wt% hydrogel at temperature above the T_{gel} in Figure 4.

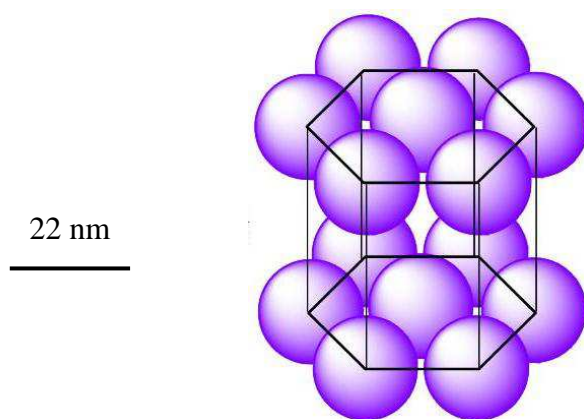


Figure 4: Schematic representation of the structure of F127 hydrogel.

The hindrance of the mobility of the COOH-PS nanoparticles in pluronic F127-based hydrogels could be thus attributed to: *(i)* the high viscosity of the hydrogel, *(ii)* the small pore size of the hydrogel due to the organization of the micelles, and *(iii)* to its adhesive nature as demonstrated in our previous work in Chapter 2 of this manuscript (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010).

We also noted that the two types of pluronic hydrogels F127/HPMC and F127/F68/HPMC exhibited different behaviors regarding the mobility of the nanoparticles. Surprisingly, this mobility was 2-fold slower in the F127/HPMC hydrogel than the F127/F68/HPMC hydrogel suggesting better mobility of the nanoparticles in the presence of F68.

This result is unexpected because we demonstrated in our previous work that the hydrogel composed of pluronic mixture F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 wt%) (700 Pa.s at 17 °C) was more viscous than the hydrogel F127/HPMC (20/1 wt%) (200 Pa.s at 17 °C) (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010).

Furthermore, the measurement of the adhesion properties of our formulations (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010) showed that F127/F68/HPMC had best adhesive properties than F127/HPMC demonstrating that adhesion is not the only parameter allowing the immobilization of the COOH-PS nanoparticles.

Although the micellization and the gelation of individual pluronic copolymers were extensively investigated, far fewer studies are known on mixtures of pluronics. Basically, two opposing views have been supported: either cooperative micellization of the two copolymers (mixed micelle formation) through favorable interactions between the unlike components or the coexistence of two distinct populations of micelles assembling each component independently. To investigate the mechanistic reasons that account for the difference in transport of nanoparticles in F127/HPMC and F127/F68/HPMC hydrogels, Zhang *et al* (2012), in our research group in collaboration with the group of Djabourov, have studied the effect of F68 on the molecular organization of the micelles. The combination of rheology and MicroDSC experiments obtained by Zhang *et al* (2012) showed that the two mixed pluronics F127 and F68 did not form mixed micelles but results on a segregation of the two kinds of pluronics. F127 formulations are more stable and more homogenous, while the presence of F68 results in a disruption of the crystalline structure of F127 micelles. This disorganization due to F68 seems to promote the mobility of the COOH-PS nanoparticles.

6. Conclusion

We demonstrated in the present work that pluronic hydrogels can be used as a barrier against nanoparticle diffusion in comparison with conventional placebo HEC hydrogel and macaque CVM. We also demonstrated that the barrier effect is intimately linked to the molecular structure and the physico-chemical properties of pluronic hydrogels. Particularly, the presence of F68 results from a disorganization of hydrogel structure promoting thus nanoparticle mobility.

This work constitutes a starting point towards the investigation of the barrier effect of pluronic hydrogels against HIV sexual transmission. Our preliminary results could be completed by an evaluation of the virus passage through the pluronic hydrogels to conclude whether the barrier effect is efficient against HIV diffusion.

7. References

Aka-Any-Grah A., Bouchemal K., Koffi A., Agnely F., Zhang M., Djabourov M., Ponchel G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2010, 76, 296-303.

Amerongen A.V.N., Bolscher J.G., Bloemena E., Veerman E. C. Sulfomucins in the human body. *Biol. Chem.* 1998, 379, 1-18.

Baumgartner S., Kristl J. Network structure of cellulose ethers used in pharmaceutical applications during swelling and at equilibrium. *Pharm. Res.* 2002a, 19(8), 1084-1090.

Baumgartner S., Lahjnar G., Sepe A., Kristl J. Investigation of the state and dynamics of water in hydrogels of cellulose ethers by ^1H NMR spectroscopy. *AAPS. Pharmscitech.* 2002b, 3(4), 86-93.

Bouchemal K., Agnely F., Koffi A., Ponchel G. A concise analysis of the effect of temperature and propanediol-1,2 on Pluronic F-127 micellization using isothermal titration microcalorimetry. *J. Colloid. Interf. Sci.* 2009, 338, 169-176.

Boukari H., Brichtacek B., Stratton P., Mahoney S.F., Lifson J.D., Margolis L., Nossal R. Movements of HIV-virions in human cervical mucus. *Biomacromolecules.* 2009, 10, 2482-2488.

Braeckmans K., Buyens K., Naeye B., Vercauteren D., Deschout H., Raemdonck K., Remaut K., Sanders N.N., Demeester J., De Smedt S.C. Advanced fluorescence microscopy methods illuminate the transfection pathway of nucleic acid nanoparticles. *J. Control. Release.* 2010, 148(1), 69-74.

Briggs J.A.G., Wilk T., Welker R., Kräusslich H-G., Fuller S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 2003, 22(7), 1707-1715.

Buckheit Jr. R.W., Watson K.M., Morrow K.M., Ham A.S. Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV. *Antiviral Res.* 2010, 85(1), 142-158.

Carlstedt I., Sheehan J. K. Structure and macromolecular properties of cervical mucus glycoproteins. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 1989, 43, 289-316.

Cone R. 1999. Mucus. In *Mucosal Immunology*. P. Ogra, J. Mesteky, M. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, and J. McGhee, editors. 2nd ed. Academic Press, San Diego. 43-64.

Cone R.A. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug. Deliv Rev.* 2009, 61(2), 75-85.

Forstner J., Oliver M., Sylvester F. 1995. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In *Infections of the Gastrointestinal Tract*. M. Blaser, P. Smith, J. Ravdin, H. Greenberg, and R. Guerrant, editors. Raven Press, Ltd., New York. 71-88.

Garg S., Vermani K. Rationalization of selection of polymers in the development of vaginal formulations in terms of their bioadhesion and retention characteristics. *Microbicides*, 13-16 March 2000. Washington DC USA.

Koffi A.A., Agnely F., Ponchel G., Grossiord J-L. Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006, 27, 328-335.

Lai S.K., O'Hanlon E.D., Harrold S., Man S.T., Wang Y.Y., Cone R., Hanes J. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in undiluted human cervical vaginal mucus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007, 104(5), 1482-1487.

Lai S.K., Hida K., Shukair S., Wang Y.Y., Cone R., Hope T.J., Hanes J. HIV is trapped by acidic but not by neutralized human cervicovaginal mucus. *J. Virol.* 2009, 83, 11196-11200.

Lai S.K., Wang Y-Y, Hanes J. Mucus-penetrating nanoparticles for drug and gene delivery to mucosal tissues. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2009, 61,158-171.

Lai S.K., Wang Y-Y., Hida K., Cone R., Hanes J. Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc Natl Acad Sci U.S. A.* 2010, 107(2), 598-603.

McMaster T.J., Berry M., Corfield A.P., Miles M.J. Atomic force microscopy of the submolecular architecture of hydrated ocular mucins. *Biophys. J.* 1999, 77, 533-541.

Miyazaki M., Maeda H. Microchannel enzyme reactors and their applications for processing. *Trends Biotechnol.* 2006, 24 (10), 463-470.

Olmsted, S. S., Padgett, J. L., Yudin, A. I., Whaley, K. J., Moench, T. R., Cone R. A. Diffusion of Macromolecules and Virus-Like Particles in Human Cervical Mucus. *Biophys. J.* 2001, 81, 1930-1937.

Rohan L.C., Ratner D., McCullough K., Hiller S.L., Gupta P. Measurement of anti-HIV activity of marketed vaginal products and excipients using a PBMC-based in vitro assay. *Sex. Transm. Dis.* 2004, 31(3), 143-148.

Saltzman W., Radomsky M. L., Whaley K. J., Cone R. A. Antibody diffusion in human cervical mucus. *Biophys. J.* 1994, 66, 508-515.

Sanders N.N, De Smedt S.C., Van Rompaey E., Simoens P., De Baets F., Demeester J., Cystic fibrosis sputum: a barrier to the transport of nanospheres. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, 162, 1905-1911.

Sbalzarini I.F., Koumoutsakos P. Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology. *J. Struct. Biol.* 2005, 151(2), 182-195.

Schweizer J.C. Practical course. Single particle tracking. Biophysics - Schwille Lab
Biotechnological Center of the Technical University Dresden 2007, 5p.

Slyter H. S., Wold J. K., Midtvedt T. Intestinal mucin of germ-free rats. Biochemical and
electron-microscopic characterization. Carbohydr. Res. 1991, 222, 1-9.

Tien D., Schnaare R.L., Kang F.R., Cohl G., McCormick T.J., Moench T.R., Doncel G., Watson
K., Buckheit R.W., Lewis M.G., Schwartz J., Douville K., Romano J.W. *in vitro* and *in vivo*
characterization of a potential universal placebo designed for use in vaginal microbicide clinical
trials. AIDS Res. Hum. Retrovirus. 2005, 21, 845-853.

Yudin A.I., Hanson F.W., Katz D.F. Human cervical mucus and its interaction with sperm: A fine-
structural view. Biol Reprod 1989, 40,661-671.

Yurewicz E. C., Matsuura F., and Moghissi K. S. Structural studies of sialylated oligosaccharides
of human midcycle cervical mucin. J. Biol. Chem. 1987, 262, 4733- 4739.

Zhang M, Djabourov M, Bourgaux C, Bouchemal K. Nanostructured fluids from pluronic
mixtures. J. Therm. Anal. Calorim. 2012, Submitted.

Discussion générale

DISCUSSION GENERALE

1. Introduction

La pandémie due au VIH demeure encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Malgré les progrès thérapeutiques importants pour lutter contre cette pandémie, depuis l'identification du VIH, le SIDA a fait près de 30 millions de morts selon l'OMS. Les pays sous-développés notamment ceux d'Afrique sub-saharienne sont les plus touchés. En effet, 60 % des personnes vivant avec le VIH sont originaires de cette région de l'Afrique (OMS, 2012). La transmission du virus par la voie sexuelle est la principale voie de contamination dans ces pays (Sharp & Hahn, 2011, Hladik & McElrath, 2008, Cohen *et al.* 2011). Les femmes sont plus vulnérables que les hommes hétérosexuels car, le plus souvent, elles n'ont malheureusement pas le choix en matière de prévention (Lee K, 2000, Rohan & Sassi, 2009).

A ce jour, aucun vaccin contre la transmission du VIH n'existe sur le marché. Il est donc impérieux de développer des moyens efficaces de prévention destinés à la voie vaginale, faciles d'utilisation et à faible coût. Depuis plusieurs années déjà les chercheurs se sont orientés vers la mise au point de microbicides topiques anti-VIH destinés à la voie vaginale. Ces formulations contiennent ou non un principe actif et permettent d'empêcher ou de réduire la transmission de l'infection par le VIH (AMD, 2012). Ces microbicides topiques existent sous diverses formes (Garg *et al.* 2010) :

- Les formes coïto-dépendantes : telles que les gels
- Les formes non coïto-dépendantes : telles que les anneaux ou les films vaginaux

Malheureusement, à ce jour aucun microbicide topique vaginal n'a validé la phase clinique de son développement. Des substances prometteuses lors de la dernière décennie telles que le nonoxynol-

9, le cellulose sulfate ou le Carraguard[®] n'ont pas abouti à des résultats positifs (Buckheit *et al.*, 2010). La principale raison de ces échecs était la survenue de manifestations de toxicité lors des essais cliniques (Pirrone *et al.*, 2011).

Récemment, les résultats encourageants obtenus avec le gel CAPRISA contenant du ténofovir en Afrique du Sud avec près de 40 % de protection ont ravivé l'espoir de voir la mise au point d'un gel topique efficace (Karim *et al.*, 2010). Cependant, des efforts restent à faire pour arriver à la commercialisation du produit. De plus, le développement des dernières générations de substances actives microbicides doit tenir particulièrement compte de la notion de résistance. Ceci amène les chercheurs à développer des substances à activité anti-VIH plus spécifiques (Van Herrewege *et al.*, 2007). Toutefois, malgré leur efficacité *in vitro*, l'administration de telles substances sous forme de solution ou suspension montre une efficacité moins grande que celle escomptée en raison d'un temps de résidence faible au niveau du site d'application, lié aux spécificités de la voie vaginale (fluides, enzymes, pH...).

Dans ce contexte, une formulation efficace doit respecter plusieurs exigences :

- Une fois administrée, elle doit tapisser aisément les muqueuses,
- Elle doit rester en place le plus longtemps possible par un phénomène de mucoadhésion, ce qui permettrait une libération prolongée dans le temps de l'agent anti-VIH à une concentration efficace,
- Elle doit empêcher le virus de diffuser jusqu'aux cellules épithéliales vaginales,
- Elle doit être peu toxique vis-à-vis du tissu vaginal,
- Lorsqu'une application locale est visée, il est préférable que le principe actif ne diffuse pas vers la circulation sanguine.

Pour atteindre ces objectifs **nous avons utilisé deux principales stratégies :**

- Nous nous sommes orientés vers les molécules anti-VIH et plus spécifiques la miniprotéine M48U1 développée par l'équipe du Dr. Loïc MARTIN du commissariat à l'énergie atomique (CEA).
- Nous avons formulé des gels thermosensibles et mucoadhésifs capables de tapisser les muqueuses colonisées de façon à ce que la rémanence du principe actif à la surface des muqueuses soit la plus longue possible.

Compte tenu du fait qu'un bon développement préclinique contribue largement à éviter un échec clinique précoce, nous avons choisi d'effectuer une caractérisation approfondie de nos formulations avec ou sans principe actif. En effet, une telle approche est nécessaire afin d'amorcer le développement d'une forme microbicide topique efficace, non toxique et bien tolérée. Nous nous sommes donc fixés **les objectifs suivants** :

1/ Formuler et caractériser d'un point de vue rhéologique les hydrogels thermosensibles et mucoadhésifs tout en tenant compte de l'influence de la dilution par les fluides vaginaux sur ces propriétés.

2/ Evaluer d'un point de vue physico-chimique et mécanistique la capacité de nos hydrogels à limiter physiquement la mobilité de particules de taille comparable aux particules virales, en comparaison avec du mucus cervico-vaginal.

3/ Evaluer la toxicité de nos formulations avant l'introduction du principe actif (peptide M48U1 du CEA).

4/ Formuler le peptide M48U1 dans les hydrogels et étudier *in vitro* son profil de libération à partir de nos formulations.

5/ Vérifier *in vitro* l'absence de passage du peptide M48U1 à travers la muqueuse vaginale.

2. Formulation et caractérisation physico-chimique et rhéologique des hydrogels insensibles à la dilution par le fluide vaginal simulé

Les pluronics, également appelés poloxamers forment un groupe important de tensioactifs non ioniques de haute masse molaire et faiblement toxiques. Ils sont constitués d'une partie centrale hydrophobe de poly(oxyde de propylène) (POP) et de deux parties latérales hydrophiles de poly(oxyde d'éthylène) (POE communément appelés PEG).

Nous avons mené une étude de caractérisation rhéologique et physico-chimique des hydrogels à base de pluronic F127 ((EO)₉₇(PO)₆₉(EO)₉₇). Les résultats de la caractérisation des propriétés rhéologique qui sont décrits dans le chapitre 2 de ce manuscrit ont été combinés aux résultats de la caractérisation physico-chimique par Micro-DSC. Les expériences de Micro-DSC ont été réalisées dans le cadre du stage de Master 2 de Min ZHANG en 2010 au sein de notre équipe de recherche en collaboration avec Pr. Madeleine DJABOUROV du Laboratoire de Physique Thermique, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie pour l'Industrie de Paris ES-PCI Paris Tech, Paris et Dr. Claudie BOURGAUX de l'équipe de Dr. Sylviane LESIEUR de l'UMR CNRS 8612 pour la caractérisation de ces hydrogels en utilisant les rayons X aux petits angles. (Zhang *et al.*, 2012).

Une caractérisation en Micro-DSC a permis la détermination de la température de micellisation critique (TMC) de solutions de F127 à 20 % m/m, l'enthalpie de micellisation ainsi que la température de cristallisation qui correspond à la formation d'un cristal liquide (T_c). La TMC peut être définie comme étant la température à partir de laquelle les micelles commencent à se former.

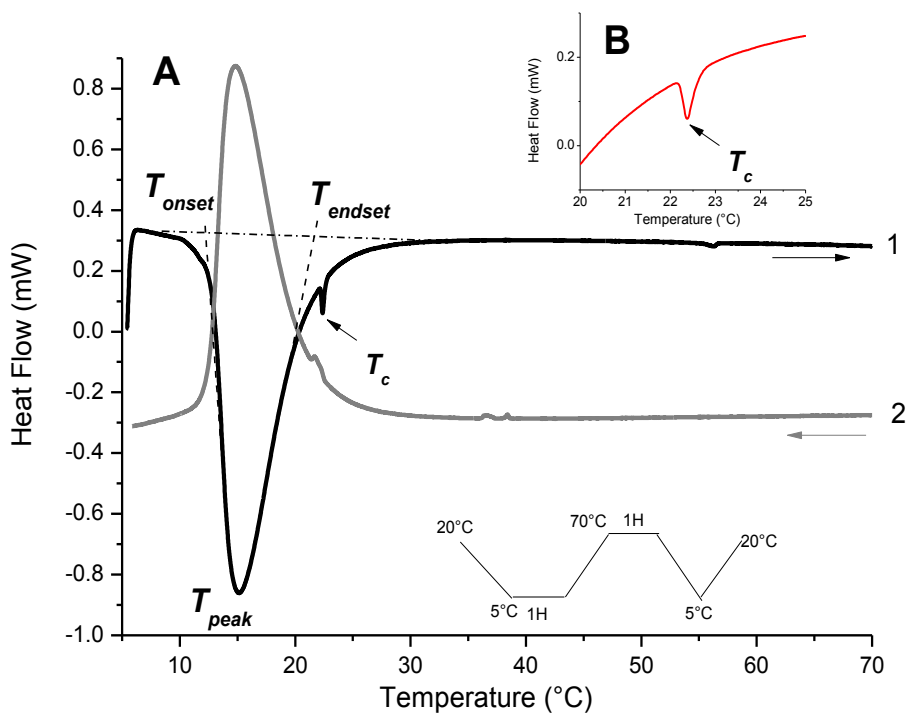


Figure 1 : (A) Thermogramme obtenu au cours du chauffage (1) et du refroidissement (2) d'une formulation composée de F127 à 20 % m/m en fonction de la température et définition de T_{onset} , T_{peak} , T_{endset} et T_c . (B) représente un agrandissement de la zone de formation du cristal. (D'après Zhang *et al.*, 2012)

La formation du cristal coïncide avec la transition de la formulation de l'état liquide à l'état gel (transition sol-gel). Cette température est appelée la température de gélification. Nous avons pu démontrer que la température de cristallisation déterminée par Micro-DSC est très proche de la température de gélification déterminée par un rhéomètre (Zhang *et al.*, 2012, Aka-Any-grah *et al.*, 2010).

Lorsque le F127 se trouve sous forme d'unimères à des concentrations entre 16 et 20 % m/m et à des températures faibles (de 4 à 10 °C). Au fur et à mesure que la température augmente, les unimères s'organisent sous forme de micelles au-delà de la TMC. Lorsque la température continue à augmenter, les micelles de F127 s'organisent entre elles pour former un cristal (Figure 2. (iii)).

Ce comportement caractéristique des pluronics a été précédemment décrit dans la littérature (Pham Trong *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2012).

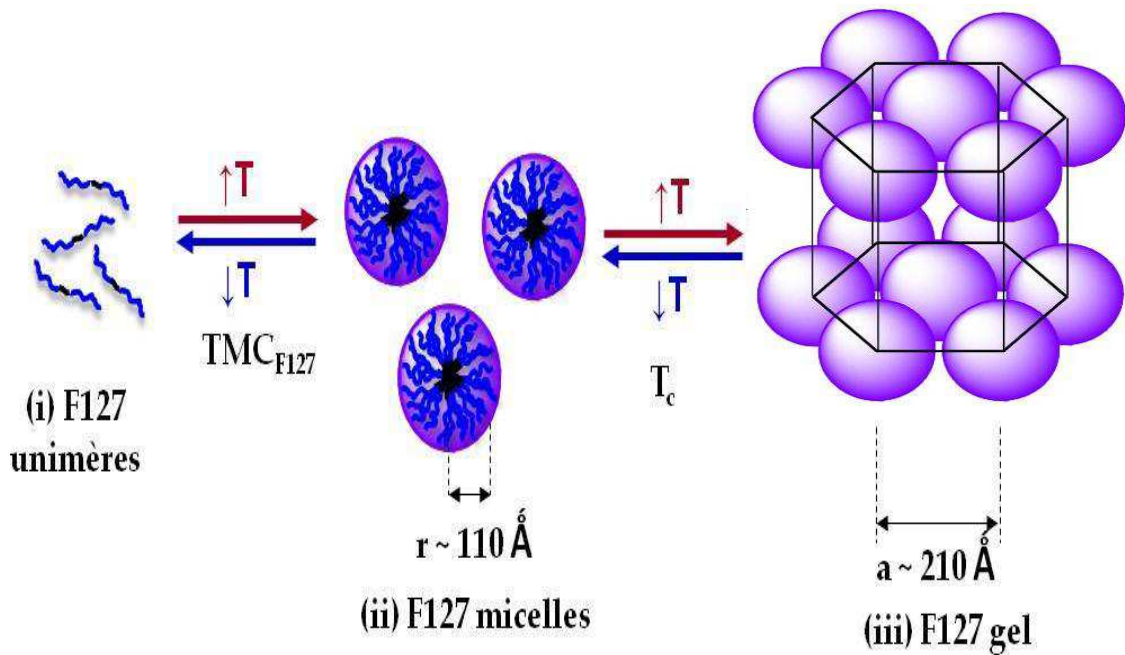


Figure 2 : Proposition de mécanisme pour l'organisation des micelles de F127 (16, 17, 18 et 20 % m/m).

Des expériences de rhéologie ont aussi été menées sur des formulations de F127 à différentes concentrations (16, 17, 18 et 20 % m/m). Ce type d'expérience permet la détermination des paramètres viscoélastiques des gels notamment la température de gélification (T_{gel}), le module visqueux (G'') et le module élastique (G'). Elles ont permis d'observer, en plus de la détermination de la T_{gel} , que la courbe obtenue avec les différentes préparations, présentée dans la Figure 3, est typique des hydrogels de pluronics car le module d'élasticité, G' , est très faible au stade solution, mais augmente considérablement lorsque la température de gélification est atteinte.

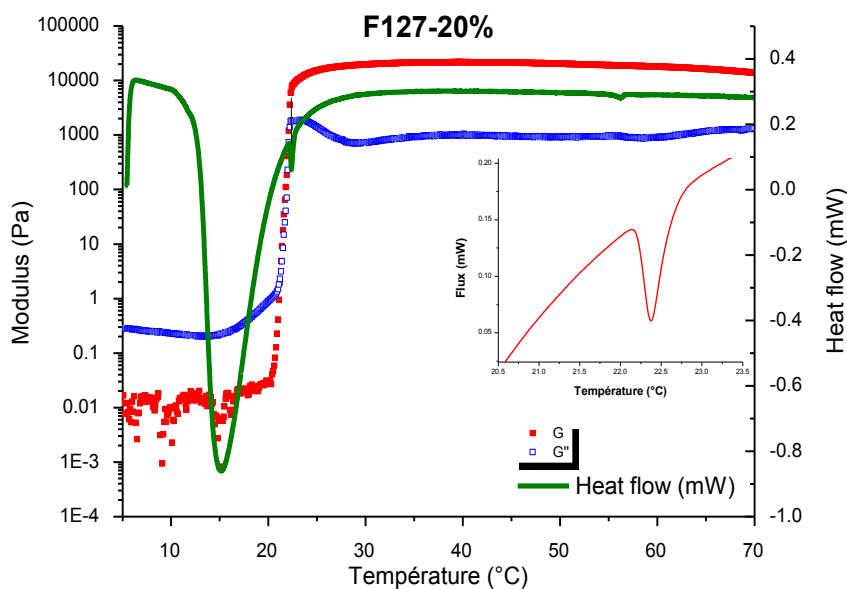


Figure 3 : Représentation de l'enthalpie de micéllisation, des modules visqueux (G') et élastique (G'') en fonction de la température pour la formulation à base de F127 à 20 % m/m. (D'après Zhang *et al.*, 2012)

Les expériences de rhéologie ont également montré que la T_{gel} pouvait être modulée en rajoutant des petites quantités d'un autre pluronic, le F68 ((OE)₈₀(OP)₂₇(OE)₈₀) (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010) (Tableau 1). Cependant, aucune étude ne décrit les raisons pour lesquelles des ajouts aussi petits de F68 (de 1 à 3 % m/m) résultent de variations importantes de la T_{gel} du F127. De plus, l'organisation des micelles du mélange des deux polymères n'a jamais été étudiée dans la littérature.

Tableau 1. T_c , T_{onset} , T_{endset} , T_{peak} des mélanges F127/F68 obtenues à partir des expériences de Micro-DSC.

La température de gélification, T_{gel} , les modules élastiques (G') et visqueux (G'') ($f=1$ Hz).

	% m/m	Résultats de la Micro-DSC ^a				Résultats de la rhéologie ^b			
		T_{onset} (°C) (TMC)	T_{peak} (°C)	T_{endset} (°C)	T_c (°C)	T_{gel} (°C)	G' (10 ³ Pa)	G'' (10 ³ Pa)	δ (°)
F127/F68	20/0	12,47	15,13	21,29	22,39	22	22,8	0,5	1,3
	19/1	12,78	15,18	21,66	24,87	25	17,0	1,0	3,4
	18/2	12,56	15,2	21,41	29,00	30	15,4	1,5	5,7
	17/3	12,79	15,22	21,46	34,43	35,0	3,7	1,6	23,0
	10/10	13,10	15,93	22,85	-	54,0	0	0	85,94

a. Résultats obtenus par Zhang *et al.* (2012).

b. Résultats obtenus par Aka-Any-Grah *et al.* (2010).

(-) non mesurable dans la zone de température étudiée.

Dans le travail réalisé par Zhang *et al.* (2012), des mélanges de F127 et de F68 ont été caractérisés grâce à la Micro-DSC et aux rayons X aux petits angles dans le but de connaître l'organisation des co-polymères aux différentes concentrations et températures. La combinaison des résultats de la Micro-DSC avec la rhéologie ont permis de comprendre que lorsque le F68 est présent dans une formulation composée de F127 (17, 18, ou 19 % m/m) à des concentrations faibles allant de 1 à 3 % m/m, le F68 se trouve à des concentrations plus faibles que les CMC. Ces unimères de F68 ne vont pas former de micelles mixtes avec le F127 (Figure 4). Ces unimères gêneraient l'organisation des micelles de F127 en retardant ainsi la formation du cristal et donc la gélification. Cette organisation des copolymères de pluronics aura un effet sur la mobilité des particules dans ces hydrogels et sur la libération du peptide M48U1 tel que nous le développerons ci-dessous.

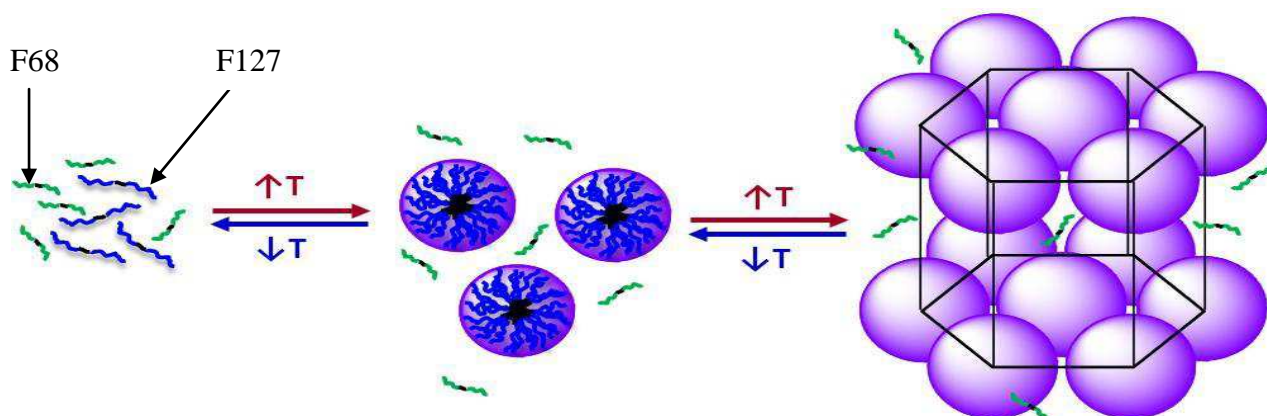


Figure 4 : Proposition de mécanisme pour l'organisation des micelles de mélanges F127/F68 (19/1, 18/2 et 17/3 % m/m). Les concentrations du F68 sont plus faibles que la CMC_{F68} dans la zone de température étudiée. (a)Unimères de F127 et F68 (b) Micelles de F127 et unimères de F68 (c) Gel de F127 et unimères de F68

Pour la poursuite de notre étude, nous avons donc sélectionné deux types de formulations, le F127 seul à 16 % m/m et le mélange F127/F68 18/2 % m/m qui présentaient des T_{gel} inférieures à la température du corps. Cependant, dans les conditions physiologiques d'utilisation, ces formulations vont endurer des dilutions qui sont susceptibles d'être à l'origine d'une diminution de l'efficacité de la formulation par perte de la gélification à température corporelle. Cette perte de gélification est causée par la diminution de la concentration en pluronic qui est à l'origine d'une augmentation de la T_{gel} . En effet, nous avons montré que les deux formulations sélectionnées, le F127 à 16 % m/m et le mélange F127/F68 18/2 % m/m devenaient sous forme liquide à température du corps après dilution par le fluide vaginal simulé (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010). Ces gels ont donc été reformulés en augmentant la concentration en pluronic. Les deux formulations retenues étaient le F127 à 20 % m/m et le mélange F127/F68 à 22,5/2,5 % m/m. La détermination de la T_{gel} après dilution avec le fluide vaginal simulé a montré que les hydrogels étaient résistants à la dilution et les T_{gel} étaient proches de 30 °C (Aka-Any-Grah *et al.*, 2010). (Voir Tableau 2 Chapitre 2)

Les hydrogels concentrés à 20 % m/m à base de pluronic F127 et de mélange de pluronic F127/F68 à 22,5/2,5 % m/m présentent donc la propriété d'être liquides à faible température

facilitant ainsi l'administration de la formulation, et de gélifier à 37 °C après leur administration chez les patients. Il est utile de rappeler que ces formulations peuvent être stockées au réfrigérateur afin de les maintenir à l'état liquide avant leur administration.

En plus des propriétés physico-chimiques et rhéologiques, les propriétés mucoadhésives de ces hydrogels ont été étudiées en rajoutant 1 % m/m d'un polymère mucoadhésif : l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC). Pour cette étude de mucoadhésion nous avons utilisé la muqueuse vaginale de porc. En effet, la muqueuse vaginale de porc présente des similitudes avec la muqueuse humaine d'un point de vue anatomique, physiologique, histologique et du métabolisme (Van Eyk *et al.*, 2005, Squier *et al.*, 2008).

La mesure des principaux paramètres caractéristiques de la mucoadhésion, la force d'adhésion (F_{\max} exprimée en N) et le travail d'adhésion (W exprimé en mJ ou N.m) en présence ou non d'HPMC, ont permis de mettre en évidence le rôle important de ce polymère dans la mucoadhésion de ces hydrogels. Il est important de noter que le travail d'adhésion nous donne une idée plus précise des propriétés adhésives des hydrogels et constitue de ce fait le paramètre le plus pertinent à considérer.

De plus, nous avons montré que la dilution des formulations finales (F127/HPMC 20/1 % m/m et le F127/F68/HPMC 22,5/2,5/1 % m/m) par le fluide vaginal simulé était à l'origine d'une diminution des propriétés mucoadhésives des gels (Chapitre 2). Nous avons également observé une baisse du module élastique (G') lors de la dilution. Cette baisse est compensée par une augmentation du module visqueux (G''), ce qui favorise l'étalement de ces hydrogels. Comme le montre la Figure 5 présentant les courbes force-élongation, la formulation à base de mélange de pluronics F127 et F68 a des propriétés muco-adhésives plus marquées. Ces propriétés sont liées à la plus grande concentration en polymère (25 % m/m). En effet le nombre plus important de groupes hydroxyles (42 mM) présents dans cette formulation augmente les possibilités d'interaction avec les mucus ce qui favorise l'adhésion.

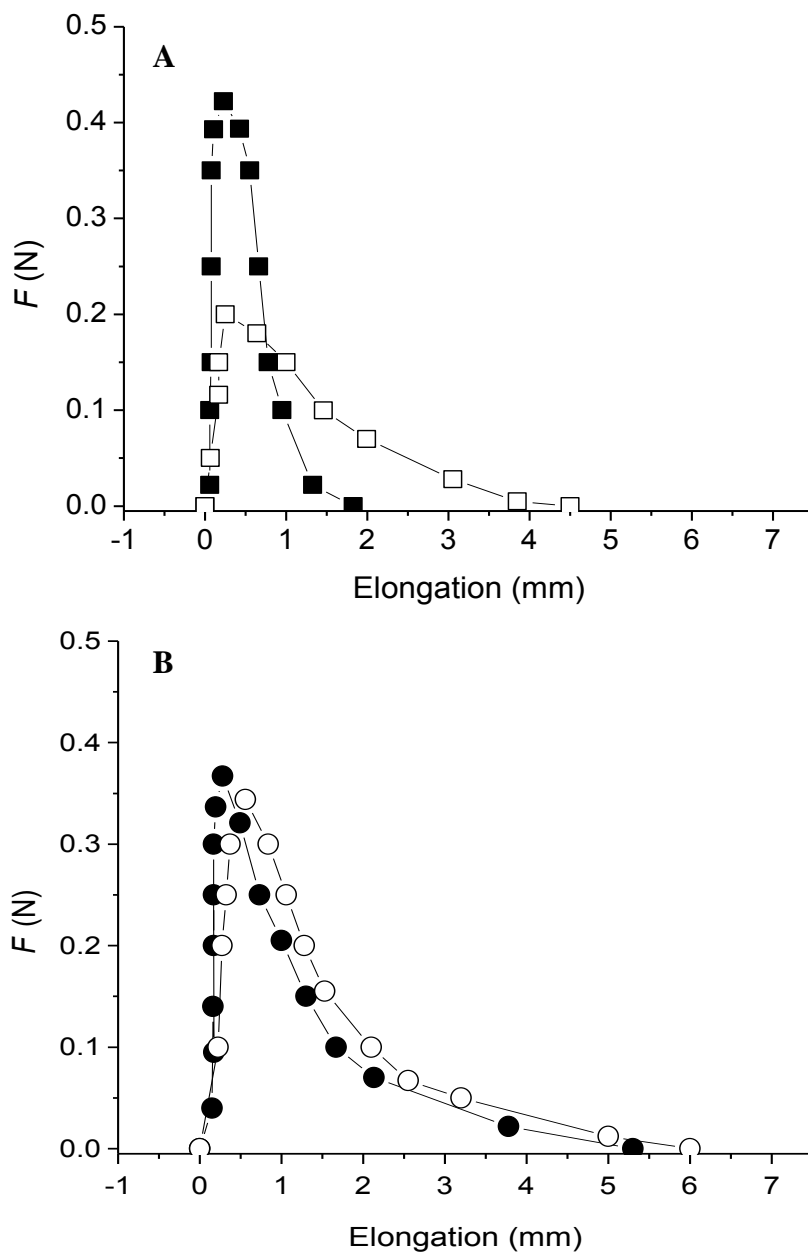


Figure 5 : Représentation d'une courbe typique Force-élongation pour la formulation F127/HPMC (20/1 % m/m) (A) et F127/F68/HPMC (22,5/2,5/1 % m/m) (B) avant (■ et ●) et après dilution avec le fluide vaginal simulé (□ et ○).

Nous avons donc pu démontrer que nos formulations thermosensibles et mucoadhésives résistent bien à la dilution par le fluide vaginal simulé ce qui en fait des candidats de choix pour une administration par la voie vaginale. Nous avons par conséquent voulu évaluer la capacité de ces hydrogels à immobiliser des particules dont la taille serait proche de celle du VIH.

3. Evaluation de la capacité des formulations thermosensibles et mucoadhésives à immobiliser des particules de taille 170 nm en comparaison avec du mucus cervico-vaginal de *Cynomolgus macaque*.

Comme nous l'avons démontré dans la première partie de notre travail, nos hydrogels thermosensibles et mucoadhésifs à base de pluronics et d'HPMC ont une structure micellaire plus ou moins organisée en fonction de la présence du F68 dans ces formulations. De plus, leurs propriétés thermosensibles et mucoadhésives sont très liées à leurs propriétés physico-chimiques et rhéologiques.

Afin d'évaluer un possible effet barrière des formulations, une technique faisant appel à la vidéomicroscopie a été utilisée afin de mesurer la diffusivité de particules fluorescentes de polystyrène carboxylées en surface (COOH-PS) et dont la taille était de 170 nm, c'est-à-dire avoisinant celle du virus VIH. Il est utile de rappeler que la taille des virions de VIH variant de 120 à 180 nm, alors que la taille du VIH mature varie de 140 à 220 nm (Briggs *et al.*, 2003). Par cette technique, nous avons pu réaliser le calcul des trajectoires, de la moyenne géométrique du déplacement carré moyen (MSD). Ainsi, les diffusivités moyennes (D_{eff}) des nanoparticules de polystyrène carboxylées dans les échantillons ont pu être calculées (Schweizer, 2007, Braeckmans *et al.*, 2010) et ont permis de démontrer que les formulations à base de pluronics parvenaient à immobiliser des particules beaucoup plus efficacement que le mucus cervical de macaque et que les hydrogels à base d'HEC.

Ainsi, les mobilités des nanoparticules étaient environ 1320 et 590-fois plus lentes dans les deux hydrogels F127/HPMC 20/1 % m/m et F127/F68/HPMC 22,5/2,5/1 % m/m en comparaison avec un hydrogel d'HEC à 1,5 % m/m. Il est intéressant de noter que ces hydrogels sont habituellement utilisés comme référence dans les études cliniques de gels microbicides destinés à la voie vaginale. Ces différences de mobilité constatées entre nos deux formulations ont été reliée à leur structure. Le moindre effet retardant de la formulation F127/F68/HPMC 22,5/2,5/1 % m/m pourrait s'expliquer par le fait que le F68 désorganise les micelles de F127, comme cela a été montré précédemment, entraînant ainsi une augmentation de la mobilité des particules.

En outre, la mobilité de ces particules a été plus lente dans les hydrogels de pluronics, notamment celui à base de F127 et d'HPMC, en comparaison avec du mucus cervico-vaginal de macaque. Le mucus forme un milieu très complexe avec une porosité très variable qui peut être évaluée comme allant de 20 à 3000 nm. Toutefois, la diffusion des particules virales au sein de cet hydrogel naturel peut être plus complexe en raison de phénomènes d'attachement des particules, réversibles ou non. De ce point de vue, les glycoprotéines du mucus comprennent dans leur structure des groupements acides sialiques capables d'interagir avec des particules chargées ou d'interagir avec des virus (Lai *et al.*, 2010). Il a été démontré dans la littérature que les virus de petites tailles et non enveloppés diffusaient à travers le mucus tandis que les virus de grosse tailles et enveloppés (VIH, HSV-2) étaient ralentis (Cone., 2009). Nos formulations à base de pluronics quant à elles, ont une structure organisée de micelles dans un arrangement de type hexagonal. Des expériences de diffraction des rayons X aux petits angles ont montré que le diamètre de chaque micelle était d'environ 220 Å (22 nm), et que la distance entre elles dans les formulations à 20 % m/m de F127 était d'environ 210 Å (21 nm) à une température plus élevée que la T_{gel} (à 60 °C). Nos hydrogels étant non ioniques, les interactions avec les particules de polystyrène sont majoritairement de type hydrophobe. Comparativement à l'hydrogel à base d'HEC 1,5 % m/m, qui lui possède une structure linéaire constituée de chaînes de polymères formant des nœuds et caractérisée par la taille de ses mailles, nos gels ralentissaient donc plus les particules.

Nous avons donc ainsi montré conformément à la littérature que la mobilité des particules était liée non seulement à la structure du milieu dans lequel elles se déplacent mais aussi aux interactions avec ce milieu. Ces interactions sont elles-mêmes dues à leurs propriétés physico-chimiques.

Enfin, l'ensemble de ces résultats sont extrêmement encourageant, suggérant la possibilité des hydrogels de pluronics de former une barrière physique contre la diffusion des particules vers l'épithélium vaginal. Toutefois, des études approfondies méritent d'être menées en variant plusieurs paramètres tels que les propriétés de surfaces et la taille des particules et également en mesurant l'effet barrière de nos formulations vis-à-vis des particules virales de VIH lui-même avant et après l'introduction du principe actif, le M48U1.

4. Mise en évidence de l'absence de toxicité des formulations thermosensibles et mucoadhésives

Les formulations microbicides topiques doivent être les moins toxiques possibles pour la voie vaginale. Ceci constitue une exigence essentielle lors du développement préclinique de ces formulations. Ainsi, il nous a semblé nécessaire d'évaluer ce paramètre de sorte à obtenir des données toxicologiques qui pourraient s'avérer utiles pour la suite de notre projet.

Nous avons donc mené des études préliminaires de toxicité de nos formulations sur deux lignées cellulaires différentes. Il s'agit de :

- cellules HeLa issue d'un carcinome du col de l'utérus humain : Ces cellules ne secrètent pas de mucus et possèdent une structure plus fragile que celle de l'épithélium vaginal puisqu'elles ne forment pas de jonctions serrées. Ce sont des cellules indifférenciées que l'on utilise après 7 jours de culture (Wolff E. & Wolff Em., 1962, 1964, Bererhi & Malkani., 1970).

- cellules Caco-2/TC7 (clone des Caco-2 qui ne forment en principe pas de multicouche) : issues de l'épithélium intestinal. Ces cellules sont utilisées dans notre protocole à 21 jours de culture et sont différenciées (les résultats sont présentés en annexe de ce manuscrit). Elles présentent entre autre des jonctions serrées qui leur permettent d'être plus résistantes que les HeLa (Ventura *et al.*, 2007, Makras *et al.*, 2006). Les résultats provisoires sur ces cellules sont présentés en annexe en attendant la fin de l'étude.

Les résultats de cette étude de cytotoxicité menée par Dr Vanessa LIEVIN-LE MOAL de l'équipe du Pr Philippe LOISEAU (UMR CNRS 8076), ont montré que la toxicité de nos formulations n'était pas significative vis-à-vis de notre référence : le gel HEC. Ce gel est décrit dans la littérature comme étant non toxique, ce qui est l'une des raisons pour lesquelles il est utilisé comme placebo dans les études cliniques (Schwartz *et al.*, 2007).

Nos résultats confirment ceux obtenus dans les études menées par d'autres équipes de recherche concernant la toxicité des pluronics. En effet, le F127 a été approuvé par la FDA en tant qu'additif alimentaire et excipient pharmaceutique (Xiong *et al.*, 2006, Wittemann *et al.*, 2007, Lee *et al.*, 2004). De plus, ils sont biocompatibles (Valle *et al.*, 2010, Davis *et al.*, 2008, Armstrong *et al.*, 2006., Minko *et al.*, 2005, Danson *et al.*, 2004, Alakhov *et al.*, 1999., Zhang *et al.*, 2009).

Les résultats de notre étude réalisée sur des cultures cellulaires représentent un point de départ encourageant vers le développement d'autres modèles permettant l'étude de la toxicité de ces hydrogels de pluronics. Il est évident par ailleurs que l'étude de toxicité doit être menée à long terme en utilisant des modèles validés pour l'étude de la toxicité des microbicides tel que nous l'avons développé dans le premier chapitre de cette thèse.

Ces modèles permettent de vérifier non seulement la toxicité mais l'efficacité des formulations. Il serait donc intéressant de mener des études de ce type notamment par la technique utilisant les Dual Chambers pour étudier nos formulations en présence du peptide anti-VIH.

5. Etude de la libération et de la stabilité du M48U1, un principe actif à activité préventive anti-VIH spécifique.

Parallèlement aux travaux de caractérisation des formulations, nous y avons inclus une substance active anti-VIH agissant par blocage de l'interaction entre la gp120 virale et le récepteur CD4 (Martin *et al*, 2003, Van Herrewege *et al*, 2008, Stricher *et al*, 2008). Il s'agit de la mini-protéine CD4 ou peptide M48U1, ce qui a nécessité de vérifier sa stabilité dans les formulations avant les essais de libération.

Les études de stabilité et de libération ont été menées en collaboration avec le CEA au cours du stage post-doctoral de Dr. Justyna FRELICHOWSKA. Le M48U1 s'est avéré stable au sein de nos formulations pendant trois mois à 4 °C et pendant 3 semaines à 37 °C.

Concernant la cinétique de libération du peptide M48U1, elle a été suivie pendant 24 h avec des prélèvements au bout de $t = 0$ min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h and 24 h par la technique utilisant les cellules de Franz et pour une dose de $600 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Cette étude de libération réalisée sur les hydrogels de pluronics en comparaison avec la formulation à base de HEC 1,5 % m/m a relevé que les hydrogels de pluronics permettaient une libération prolongée du principe actif. Une partie du peptide était disponible au cours des premières heures (32 % et 55 % à 4 h pour les hydrogels F127/HPMC 20/1 % m/m et F127/F68/HPMC 22,5/2,5/1 % m/m respectivement) pour interagir avec le VIH, tandis que 30 % du principe actif restait dans la formulation de sorte à constituer une barrière pour prévenir la diffusion du VIH à travers la muqueuse vaginale. Il est utile de rappeler que seule 7 % du peptide est restée dans la formulation à base de HEC à 1,5 % m/m.

Ce résultat était prévisible car lors de l'observation macroscopique de la diffusion de la rhodamine à travers nos formulations le même constat a été fait (voir chapitre 4). En effet, la rhodamine diffusait très rapidement dans l' HEC en comparaison avec les deux hydrogels de pluronics.

Lors des études de libération du peptide à partir des gels de pluronics, nous avons constaté que la cinétique de libération était plus importante lorsque le F68 était présent dans la formulation. Nous avons pu grâce à une meilleure connaissance de l'organisation des micelles de pluronic et de mélange de pluronics constater que la désorganisation des micelles de F127 causée par le F68 favorisait cette libération. Ainsi, les formulations à base de F127 contrôlent mieux la libération du peptide tandis que, du fait de leur plus grande viscosité, les gels à base de mélange de pluronics, le retiennent plus, au bout de 24 h. Nous pouvons donc conclure que nos formulations permettront de contrôler la libération du peptide M48U1 en comparaison avec le HEC 1,5 % m/m. Il serait intéressant dans des études ultérieures de vérifier la stabilité du peptide après sa libération *in vitro* à partir de nos gels en mimant les conditions naturelles (fluide vaginal simulé, pH, enzymes...).

6. Vérification *in vitro* de l'absence de passage du peptide M48U1 à travers la muqueuse vaginale de *Cynomolgus macaque*.

Comme nous l'avons annoncé dans l'introduction de notre sujet, l'un de nos objectifs était de s'assurer que notre candidat microbicide aura une action localisée au niveau de la muqueuse vaginale. Par conséquent, il devrait y adhérer et s'y maintenir le plus longtemps possible de sorte à interagir avec le virus, empêchant ainsi son interaction avec les cellules immunitaires.

L'étude *ex vivo* du passage du peptide formulé dans les hydrogels de pluronics à travers la muqueuse de macaque a également été effectuée au sein de notre équipe de recherche en collaboration avec le CEA dans le cadre du post-doctorat de Dr. Justyna FRELICHOWSKA. La technique en chambre d'Ussing a été réalisée pour cette étude (Bechgaard *et al.*, 1994). Cette technique permet d'observer la libération d'une substance à travers une muqueuse tout en surveillant la viabilité de l'épithélium au cours de l'expérience.

La chambre d'Ussing est une technique très intéressante qui permet d'évaluer le passage des molécules (ou éventuellement de particules) à travers un tissu d'origine animale fixé entre deux

demi-chambres (Figure 6) de manière à définir un compartiment luminal et un compartiment séreux.

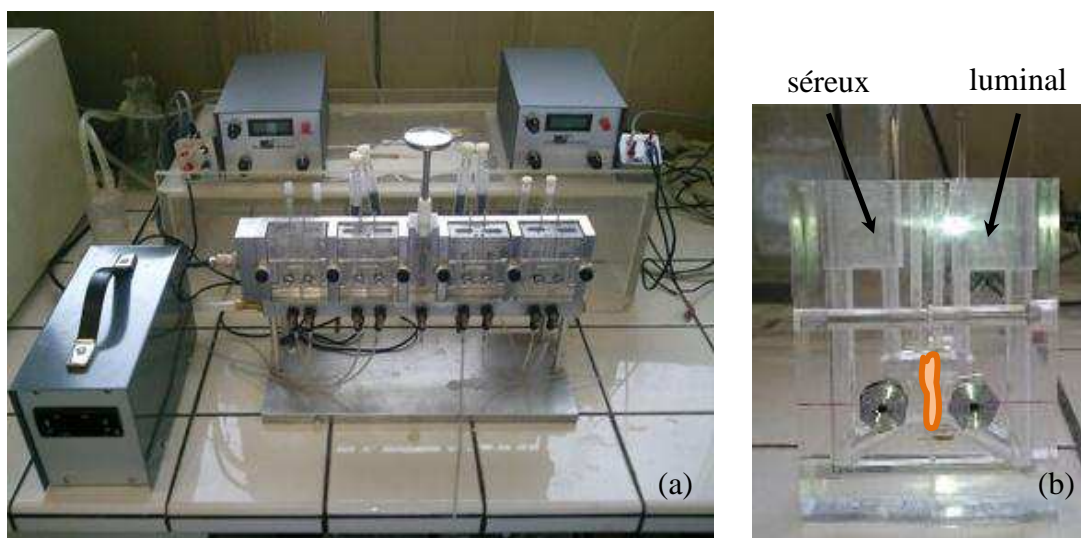


Figure 6 : L'ensemble de l'appareillage de la chambre d'Ussing (a). Chambre où l'intestin est fixé (b).

Les mesures des paramètres électriques de la muqueuse vaginale de *Cynomolgus macaque* (dans nos essais) tout au long de l'expérience ont permis de vérifier que la muqueuse restait viable après l'expérimentation.

En revanche, aucun passage transépithélial du peptide n'a pu être mis en évidence, ce qui n'est pas très surprenant compte tenu de sa masse molaire relativement élevée malgré tout. Nous avons donc pu conclure que le peptide présent dans les hydrogels ne diffusait pas au travers de la muqueuse, permettant ainsi d'assurer une action strictement locale.

7. Conclusion

Nous avons donc démontré que nos formulations à base de pluronic et d'HPMC : F127/HPMC 20/1 % m/m et F127/F68/HPMC 22,5/2,5/1 % m/m :

1/ sont thermosensibles et mucoadhésives tout en résistant de façon satisfaisante à la dilution par le fluide vaginal simulé ;

2/ ont un effet de barrière diffusionnelle vis-à-vis de particules (de polystyrène carboxylées) de taille avoisinant le virus VIH. Le ralentissement de la mobilité particulaire s'est avéré largement supérieur à celui du gel HEC 1,5 % m/m et du mucus cervico-vaginal de macaque ;

3/ ne sont pas toxiques sur des cultures cellulaires type Hela et Caco-2/TC7 (voir en annexe sur les Caco-2/TC7) ;

4/ prolongent la libération tout en mettant à disposition une quantité importante du principe actif M48U1 dès la première heure d'administration comparativement au gel HEC 1,5 % m/m ;

5/ libèrent le peptide de façon localisée au niveau de la muqueuse.

Nous pouvons donc à l'issue de notre travail prévoir que nos formulations pourront se maintenir efficacement au niveau de la muqueuse vaginale et y délivrer le principe actif anti-VIH en quantité suffisante, de façon localisée, prolongée et avec une toxicité limitée. Toutefois, des études précliniques plus poussées nous permettront de valider ces résultats et d'envisager nos formulations comme des candidats microbicides potentiels pour des études cliniques.

8. Références

- ✓ Aka-Any-Grah A, Bouchemal K, Koffi A, Agnely F, Zhang M, Djabourov M, Ponchel G. Formulation of mucoadhesive vaginal hydrogels insensitive to dilution with vaginal fluids. *Eur J Pharm Biopharm* 2010, 76, 296–303.
- ✓ Alakhov V.Y. et al. Biological agents composition. US patent n°5, 840,319.
- ✓ AMD, Alliance for Microbicides Development. MICROBICIDES ways forward, <http://www.avac.org/ht/a/GetDocumentAction/i/27266>. Consulté en 2012
- ✓ Armstrong, A.; Brewer, J.; Newman, C.; Alakhov, V.; Pietrzynski, G.; Campbell, S.; Corrie, P.; M., R.; Valle, J. W. Sp1049c as First-Line Therapy in Advanced (Inoperable or Metastatic) Adenocarcinoma of the Oesophagus: A Phase II Window Study. *J. Clin. Oncol.* 2006, 24, 4080.
- ✓ Bechgaard E., Riis K.J., Jørgensen L. The development of an Ussing chamber technique for isolated human vaginal mucosa, and the viability of the in vitro system. *Int. J. Pharm.* 1994, 106, 237–242.
- ✓ Bererhi A., Malkani K. Étude des Cellules HeLa en Culture par le Cryodécapage View *Journal of Ultrastructure Research* 1970, 32(1–2), 23-31.
- ✓ Braeckmans K., Buyens K., Naeye B., Vercauteren D., Deschout H., Raemdonck K., Remaut K., Sanders N.N., Demeester J., De Smedt S.C. Advanced fluorescence microscopy methods illuminate the transfection pathway of nucleic acid nanoparticles. *J. Control. Release* 2010, 148, 69–74.
- ✓ Briggs J.A.G, Wilk T, Welker R, Kräusslich H-G, Fuller S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J.* 2003, 22(7), 1707-1715.
- ✓ Buckheit Jr. R.W., Watson K.M., Morrow K.M., Ham A.S. Development of topical microbicides to prevent the sexual transmission of HIV. *Antiviral Res.* 2010, 85 (1), 142-158.

- ✓ Cohen M.S., Shaw G.M., McMichael A.J., Haynes B.F. Acute-HIV-1 Infection: Basic, clinical and public health perspectives. *N. Engl. J. Med.* 2011, 364, 1943–1954.
- ✓ Cone R.A. Barrier properties of mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61 (2), 75-85.
- ✓ Danson S., Ferry D., Alakhov J., Margison J., Kerr D., Jowle D., Brampton M., Halbert G., and Ramson M. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of pluronic polymer-bound doxorubicin (SP1049C) in patients with advanced cancer. *Br. J. Cancer* 2004, 90(11), 2085-2091.
- ✓ Davis, M. E.; Chen, Z. G.; Shin, D. M. Nanoparticle Therapeutics: An Emerging Treatment Modality for Cancer. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2008, 7, 771–782
- ✓ Dumortier G., Grossiord J.L., Agnely F., Chaumeil J.C. A review of poloxamer 407 Pharmaceutical and Pharmacological Characteristics. *Pharm. Res.* 2006, 23(12), 2709-2728.
- ✓ Garg S., Goldman D., Krumme M., Rohan L.C., Smoot S., Friend D.R. Advances in development, scale-up and manufacturing of microbicide gels, films, and tablets. *Antiviral Res.* 2010, 88 (SUPPL.)
- ✓ Hladik F, McElrath MJ. Setting the stage: Host invasion. *Nat. Rev. Immunol.* 2008, 8, 447-457.
- ✓ Karim Q.A., Karim S.S., Frohlich J.A. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science.* 2010, 329 (5996), 1168-1174.
- ✓ Lai S.K., Wang Y-Y., Hida K., Cone R., Hanes J. Nanoparticles reveal that human cervicovaginal mucus is riddled with pores larger than viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010, 107(2), 598-603.
- ✓ Lee K. HIV impact – A Closing the Gap Newsletter, US Dept of Health and Human Services, spring 2000.

- ✓ Lee, S. H.; Lee, J. E.; Baek, W. Y.; Lim, J. O. Regional Delivery of Vancomycin Using Pluronic F-127 To Inhibit Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Growth in Chronic Otitis Media In Vitro and In Vivo. *J. Control. Release* 2004, 96, 1–7.
- ✓ Makras L., Triantafyllou V., Fayol-Messaoudi D., Adriany T., Zoumpoulou G., Tsakalidou E., Servin A., De Vuyst L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res. Microbiol.* 2006, 157 (3), 241-247.
- ✓ Martin L., Stricher F., Misse D., Sironi F., Pugniere M., Barthe P., Prado-Gotor R., Freulon I., Magne X., Roumestand C., Menez A., Lusso P., Veas F., Vita C. *Nat Biotechnol.* 2003, 21, 71-6.
- ✓ Minko, T.; Batrakova, E. V.; Li, S.; Li, Y.; Pakunlu, R. I.; Alakhov, V. Y.; Kabanov, A. V. Pluronic Block Copolymers Alter Apoptotic Signal Transduction of Doxorubicin in Drug-Resistant Cancer Cells. *J. Control. Release* 2005, 105, 269–278.
- ✓ OMS Organisation Mondiale de la Santé, <http://www.who.int/hiv/data/en/> Consulté en 2012
- ✓ Pham Trong L. C., Djabourov M., Ponton A. J. *Colloid Interface Sci.* 2008, 328, 278.
- ✓ Pirrone V, Wigdahl B., Krebs F.C. The rise and fall of polyanionic inhibitors of the human immunodeficiency virus type 1. *Antiviral Res.* 2011, 90, 168-182.
- ✓ Rohan L.C., Sassi A.B. Vaginal Drug Delivery for HIV Prevention. *AAPS J.* 2009, 11(1), 78-87.
- ✓ Schwartz J. Ophthalmic preparation containing menthyl ester of indomethacin. US patent n°116777A1.
- ✓ Schweizer J.C. Practical course. Single particle tracking. Biophysics - Schwille Lab Biotechnological Center of the Technical University Dresden 2007, 5p.

- ✓ Sharp P.M., Hahn B.H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspec Med 2011.doi: 10.1101/cshperspect.a006841.
- ✓ Squier C.A., Mantz M.J, Schlievert P.M, Davis C.C. Porcine Vagina Ex Vivo as a Model for Studying Permeability and Pathogenesis in Mucosa. J Pharm. Sci. 2008, 97,9-21.
- ✓ Stricher F, Huang C. C, Descours A, Duquesnoy S, Combes O, Decker J. M, Kwon Y. D, Lusso P, Shaw G. M, Vita C, Kwong P. D, Martin L. J. Mol. Biol. 2008, 382, 510-24.
- ✓ Valle, J. W.; Armstrong, A.; Newman, C.; Alakhov, V.; Pietrzynski, G.; Brewer, J.; Campbell, S.; Corrie, P.; Rowinsky, E. K.; Ranson, M. A Phase 2 Study of Sp1049c, Doxorubicin in P-Glycoprotein-Targeting Pluronics, in Patients with Advanced Adenocarcinoma of the Esophagus and Gastroesophageal Junction. Invest. New Drugs 2010, ePub: Feb. 24, 2010.
- ✓ Van Eyk A., Van der Bijl P. Porcine vaginal mucosa as an in vitro permeability model for human vaginal mucosa. Int. J. Pharm. 305 (2005) 105-111.
- ✓ Van Herrewege Y, Morellato L, Descours A, Aerts L, Michiels J, Heyndrickx L, Martin L, Vanham G. J. Antimicrob. Chemother. 2008, 61, 818-26.
- ✓ Van Herrewege Y., Morellato L., Descours A., Aerts L., Michiels J., Heyndrickx L., Martin L., Vanham G. CD4 mimetic miniproteins: potent anti-HIV compounds with promising activity as microbicides. Journal of antimicrobial therapy 2007, 61,818-826.
- ✓ Ventura G., Cinti F.R., Di Luccio F., Alessandro Pino N. Mantle wedge dynamics versus crustal seismicity in the Apennines (Italy). Geochemistry, Geophysics, Geosystems, 2007, 8 (2), art. Q02013
- ✓ Wittemann, A.; Azzam, T.; Eisenberg, A. Biocompatible Polymer Vesicles from Biamphiphilic Triblock Copolymers and Their Interaction with Bovine Serum Albumin. Langmuir 2007, 23, 2224–2230.

- ✓ Wolff Em., Wolff Et. La différenciation morphologique et histologique de deux épithéliomas humains en culture organotypique de longue durée. C. R. Soc. Biol. (Paris) 1965, 159.
- ✓ Wolff Et., Haffen K. Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. Rep. Biol. Med. 1952, 10, 463.
- ✓ Wolff Et., Wolff Em, Renault P. Sur la culture organotypique de carcinomes humains très proliférants, en présence de mésonéphros d'embryons de poulet. Pathol. Biol. (Paris) 1962, 10, 1161.
- ✓ Wolff Et., Wolff Em. La culture prolongée de cancers humains sur le mésonéphros de l'embryon de poulet explanté in vitro. C. R. Soc. Biol. (Paris) 1962, 156, 240
- ✓ Wolff Et., Wolff Em. Nouveaux résultats de la culture organotypique de cancers humains. C. R. Acad. Sci. (Paris) 1964, 258, 2439.
- ✓ Wolff Et., Wolff Em. Sur la culture de longue durée d'un cancer humain in vitro. C. R. Acad. Sci. (Paris) 1963, 256, 1173.
- ✓ Xiong, X. Y.; Tam, K. C.; Gan, L. H. Synthesis and Thermally Responsive Properties of Novel Pluronic F87/Polycaprolactone (PCL) Block Copolymers with Short PCL Blocks. J. Appl. Polym. Sci. 2006, 100, 4163–4172.
- ✓ Zhang M, Djabourov M, Bourgaux C, Bouchemal K. Nanostructured fluids from pluronic mixtures. J. Therm. Anal. Calorim. 2012, Submitted.
- ✓ Zhang, W.; Rong, J.; Wang, Q.; He, X. The Encapsulation and Intracellular Delivery of Trehalose Using a Thermally Responsive Nanocapsule. Nanotechnology 2009, 20, 275101.

Conclusion générale et Perspectives

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Face aux nombreux défis que présente la pandémie du VIH dans le monde, il est urgent de mettre au point des stratégies efficaces notamment en matière de prévention. Ainsi, malgré les faibles ressources allouées à la recherche en la matière aucun effort ne doit être négligé. Protéger les femmes contre l'infection revient à protéger plus de la moitié de la population mondiale et de surcroît, cela permettrait d'éviter la transmission mère-enfant de l'infection. Pour un ensemble de raisons sociales et psychologiques, un moyen de prévention uniquement contrôlé par celles-ci, sans le besoin d'y associer leur partenaire semble être une alternative à privilégier.

Parmi les moyens développés par les chercheurs les formulations microbicides topiques occupent une place de choix. De nombreuses molécules possèdent *in vitro* un effet anti-VIH. Les molécules en développement sont très prometteuses mais posent souvent des problèmes de spécificité d'action et de toxicité. Pour ces raisons, à l'heure actuelle la tendance est au développement de molécules agissant le plus spécifiquement possible. Ces molécules issues des biotechnologies sont souvent fragiles et par conséquent difficiles à formuler de manière efficace et sûre. De plus le mécanisme de l'infection par le VIH n'est pas encore tout à fait élucidé. Ceci complique davantage la mise au point de méthodes efficaces d'évaluation préclinique des formulations. En ce qui concerne les gels microbicides les problèmes liés aux exigences de la voie vaginale rendent leur formulation encore plus délicate. C'est la raison pour laquelle nous nous sommes axés sur ce type de système. Deux formulations thermosensibles et mucoadhésives à base de pluronics et d'HPMC ont été développées et largement caractérisées au sein de notre équipe de recherche. Un principe actif à activité puissante et sélective y a été associé : le peptide M48-U1 imaginé et mis au point par l'équipe du Dr Loïc Martin au CEA.

Ainsi, nous avons pu démontrer que nos formulations : (i) résistent de façon satisfaisante à la dilution par le fluide vaginal simulé car elles conservaient leurs propriétés rhéologiques et d'adhésion ; (ii) permettent de bloquer des particules mimant le virus plus efficacement que le gel témoin HEC et le mucus cervico-vaginal de *cynomolgus macaque* ; (iii) sont non toxiques sur les cellules HeLa et Caco2TC7 ; (iv) libèrent *in vitro* le peptide M48-U1 de façon contrôlée et localisée au niveau de la muqueuse vaginale de porc ; (v) préservent la stabilité du peptide pendant trois mois à 4°C et trois semaines à 37°C.

Ces formulations sont donc prometteuses pour la prévention de l'infection par la voie vaginale. Toutefois nos études demeurent préliminaires et des efforts considérables restent encore à faire pour obtenir des candidats microbicides sûrs et efficaces. En attendant l'avancée des recherches en matière de connaissance du mécanisme de l'infection par le virus ainsi que la mise au point de nouvelles techniques d'évaluation préclinique des candidats microbicides, nous devons poursuivre l'évaluation de nos formulations. Nous devons résoudre les problèmes liés à la formulation du peptide au sein de nos gels de manière à ce qu'il demeure stable le plus longtemps possible au sein de celles-ci et soient les moins toxiques possible vis-à-vis des cellules vaginales. Ainsi, d'une part il sera nécessaire de poursuivre la caractérisation physico-chimique et structurale de nos gels contenant le peptide afin de rationaliser les interactions entre les différents constituants de nos formulations. D'autre part, il s'agira d'approfondir la mise en évidence de l'effet barrière que présentent nos gels vis-à-vis des particules de VIH en utilisant des particules modèles de tailles variant entre 50 et 200 nm et possédant des propriétés de surfaces variées favorables ou non à l'attachement aux chaînes polymères du gel. Bien que techniquement plus délicate, une étude de mobilité menée directement avec les particules virales de VIH permettra alors de confirmer le bien-fondé de ces formulations. Enfin, l'évaluation *in vitro* de l'efficacité et de la toxicité de nos formulations par la technique des dual chambers nous permettront de mieux orienter nos efforts avant d'envisager d'éventuels essais cliniques.

Annexes

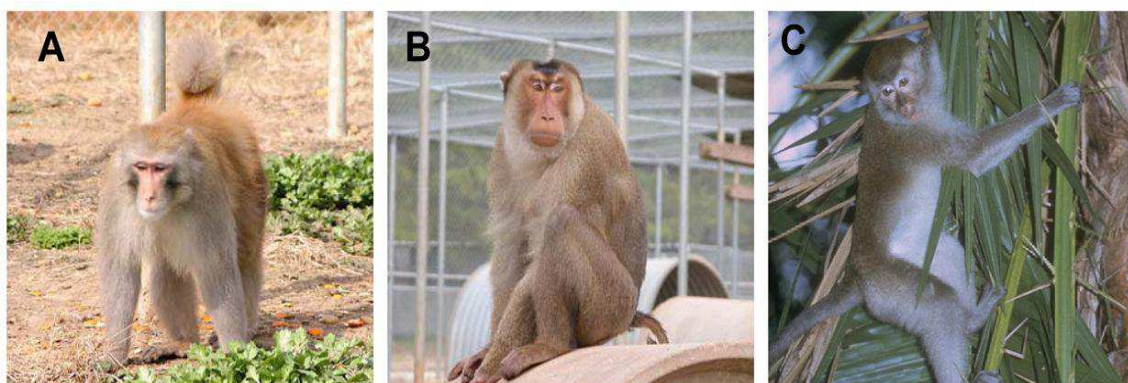
ANNEXE 1

LISTE DES ACIDES AMINES ET LEURS ABREVIATIONS

Acide aminé	Abréviation à 3 lettres	Abréviation à 1 lettre
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique ou Aspartate	Asp	D
Cystéine	Cys	C
Acide glutamique ou Glutamate	Glu	E
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

ANNEXE 2

ESPECES DE MACAQUES LES PLUS COURAMMENT UTILISES DANS LA RECHERCHE SUR LES MICROBICIDES



(A) Macaque Rhésus

(B) Macaque à queue de cochon (Pigtailed macaque)

(C) Cynomolgus macaque

ANNEXE 3

RHEOMETRE DE TYPE CSL 100



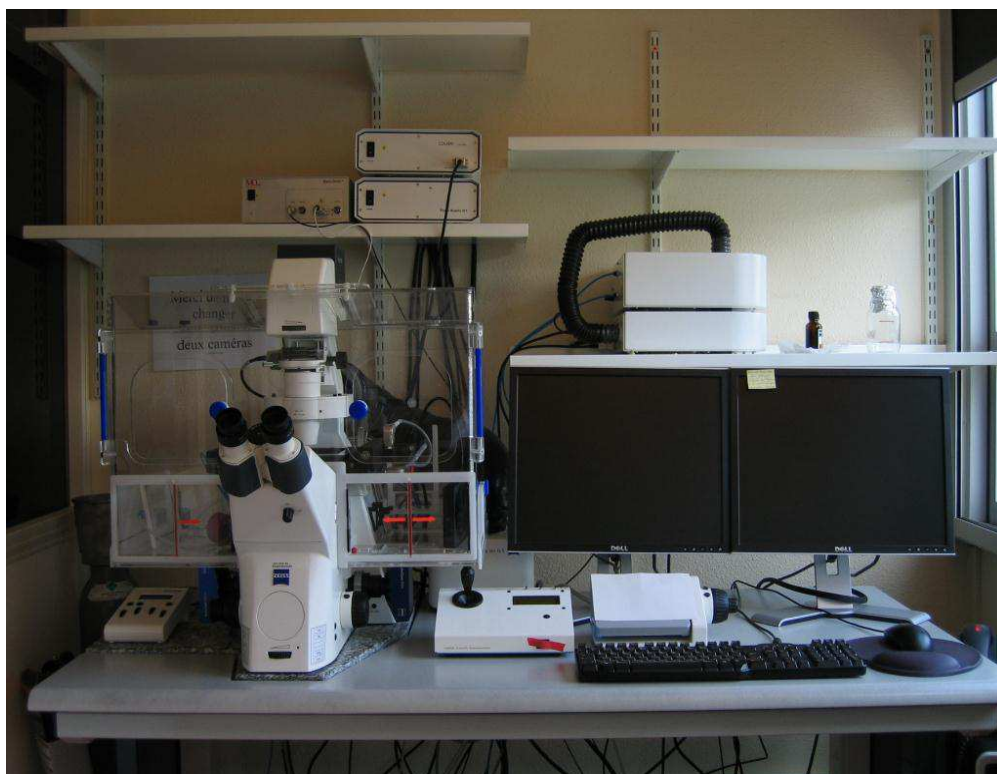
ANNEXE 4

ANALYSEUR DE TEXTURE TYPE TAXT2



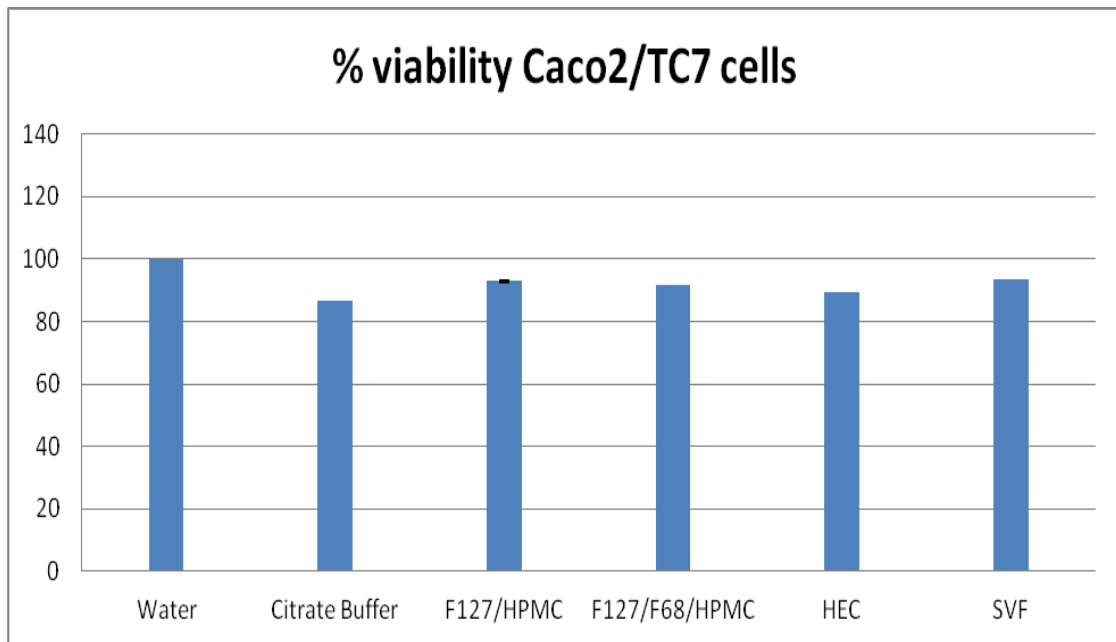
ANNEXE 5

VIDEOMICROSCOPE AXIO OBSERVER Z1-COLIBRI (ZEISS, ALLEMAGNE) EQUIPÉ D'UNE CAMERA CCD HSM



ANNEXE 6

Caco-2/TC7 CELLS VIABILITY AFTER 24 H OF CONTACT WITH F127/HPMC (20/1 WT%) AND F127/F68/HPMC (22.5/2.5/1 WT%) HYDROGELS, IN COMPARISON WITH HEC AND WATER



RESUME

Avec près de 30 millions de morts depuis le début de la pandémie, l'infection par le VIH est un véritable fléau à l'échelle mondiale, surtout en Afrique sub-saharienne. Dans ce contexte, disposer d'une formulation microbicide efficace, facile à administrer par la voie vaginale, représenterait un outil de prévention idéal pour lutter contre cette pandémie. Ainsi, la conception rationnelle de telles formulations représente un enjeu majeur de santé publique.

Ce travail décrit la recherche de formulations thermogélifiantes et mucoadhésives à base de pluronics et d'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC). Outre la caractérisation de leurs propriétés rhéologiques et d'adhésion, ainsi que des études en culture cellulaire suggérant une très faible toxicité de contact, ces hydrogels ont montré d'une part, leur capacité à véhiculer efficacement le peptide M48U1 (équipe L. Martin, CEA) destiné à bloquer l'entrée cellulaire du VIH et d'autre part à ralentir considérablement la diffusion de nanoparticules modèles mimant les particules virale matures du VIH-1, en comparaison d'hydrogel d'hydroxy éthylcellulose (HEC) fréquemment utilisés dans divers essais cliniques infructueux et aussi au mucus cervico-vaginal de macaque. L'ensemble des résultats suggère donc la capacité de ces formulations à constituer une double barrière, physique et pharmacologique, protectrice de la muqueuse vaginale vis-à-vis du VIH.

Mots-clés : Systèmes thermogélifiants, hydrogels, Pluronic, VIH-1, vidéo-microscopie, diffusivité nanoparticulaire, microbicides, cytotoxicité, M48U1, profils de libération, mucoadhésion, voie vaginale.

With nearly 30 million deaths since the start of the pandemic, HIV infection is a major problem globally, especially in sub-Saharan Africa. In this context, have an effective microbicide formulation, easily administered by the vaginal route, would be a great prevention tool to fight against this pandemic. Thus, the rational design of such formulations is a major issue of public health.

This paper describes research of mucoadhesive and thermogelling formulations based on pluronics and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). Further characterization of their rheological properties and adhesion, and cell culture studies suggesting a very low contact toxicity, these hydrogels showed on one hand, their ability to effectively convey the peptide M48U1 (L. Martin team, CEA) for blocking the entry of HIV cellular and on the other hand to considerably slow down the diffusion of nanoparticles models mimicking viral particles mature HIV-1, compared to hydroxy ethylcellulose hydrogel (HEC) commonly used in various unsuccessful clinical trials and also in cervico-vaginal mucus of macaque. The overall results therefore suggest the ability of these formulations constitute a double barrier, physical and pharmacological, protective of the vaginal mucosa from the HIV.

Keywords: Systems thermogelling, hydrogels, Pluronic, HIV-1 video-microscopy, nanoparticle diffusivity, microbicides, cytotoxicity, M48U1, release profiles, mucoadhesion, vaginal route.

UMR CNRS 8612 : Equipe VI

PÔLE : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE PHARMACEUTIQUE

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, rue Jean Baptiste Clément

92296 CHÂTENAY-MALABRY Cedex