



HAL
open science

Développement de vecteurs microparticulaires pour l'administration pulmonaire de corticostéroïdes

Alain N'Guessan

► **To cite this version:**

Alain N'Guessan. Développement de vecteurs microparticulaires pour l'administration pulmonaire de corticostéroïdes. Pharmacie galénique. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. ⟨NNT : 2015PA114832⟩. ⟨tel-01556335⟩

HAL Id: tel-01556335

<https://theses.hal.science/tel-01556335v1>

Submitted on 5 Jul 2017

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.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

Pôle : PHARMACOTECHNIE ET PHYSICO-CHIMIE

Discipline : Pharmacotechnie et Biopharmacie

ANNÉE : 2014-2015

SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT

Date de soutenance : **22 Septembre 2015**

Par

Alain N'GUESSAN

DEVELOPPEMENT DE VECTEURS MICROPARTICULAIRES POUR L'ADMINISTRATION PULMONAIRE DE CORTICOSTEROIDES

| | | |
|------------------------------|----------------------------|--|
| Directeurs de thèse : | M. Nicolas TSAPIS | DR CNRS (Université Paris-Sud) |
| | M. Armand KOFFI | Professeur (Université Houphouët-Boigny) |
| Composition du Jury: | | |
| Rapporteurs : | M. Jean Christophe OLIVIER | Professeur (Université Poitiers) |
| | Mme Ghania DEGOBERT | Maître de Conférence (Université Lyon 1) |
| Examineurs : | M. Elias FATTAL | Professeur (Université Paris-Sud) |
| | Mme Marie-Pierre FLAMENT | Professeur (Université Lille 2) |
| | M. Armand KOFFI | Professeur (Université Houphouët-Boigny) |
| | M. Nicolas TSAPIS | DR CNRS (Université Paris-Sud) |

Dédicaces

Cette thèse a été réalisée en cotutelle entre l'Institut Galien, UMR CNRS 8612, laboratoire de pharmacotechnie, physico-chimie et biopharmacie de la Faculté de pharmacie de Châtenay-Malabry (France) et le département de pharmacie galénique, biopharmacie et de législation de l'UFR des sciences pharmaceutiques et biologiques de l'université Félix Houphouët-Boigny (Côte d'Ivoire) sous la co-direction du Docteur Nicolas TSAPIS et du Professeur Armand KOFFI.

J'adresse mes sincères remerciements :

Au Professeur Elias FATTAL, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de votre laboratoire et de votre équipe de recherche. Je voudrais vous témoigner toute ma gratitude pour la supervision de ce travail et pour la disponibilité dont vous avez fait preuve à mon égard tout au long de mon séjour dans votre service. J'ai été séduit par votre expertise et par votre grande humilité. Encore grand merci à vous.

Au Docteur Nicolas TSAPIS, pour la qualité de l'encadrement dont j'ai bénéficié au quotidien durant toutes ces années. Merci aussi pour ta grande rigueur scientifique, ta disponibilité, ton soutien et pour tes conseils avisés.

Au Professeur Armand KOFFI pour ton indulgence et ta patience tout au long de cette thèse. Reçois toute ma gratitude et ma reconnaissance pour m'avoir aidé à intégrer le laboratoire du Professeur FATTAL.

Aux Professeurs Jean Christophe OLIVIER, Ghania DEGOBERT et Marie Pierre FLAMENT qui m'ont fait l'honneur d'être membres du jury de cette thèse.

Je voudrais tout particulièrement remercier Madame Claire GUEUTIN qui m'a encadré dans la partie analytique de ce travail. Toute ma gratitude pour votre disponibilité et pour toute la rigueur analytique transmise.

Aux Professeur Gilles PONCHEL et Florence AGNELY pour la fructueuse collaboration avec le département de pharmacotechnie et biopharmacie d'Abidjan.

Je tiens à remercier tous les statutaires de l'Institut Galien, tout particulièrement Hervé Hillaireau, Amélie Bochot, Karine Andrieux, Juliette Vergnaud, Simona Mura, Kawthar Bouchemal pour votre accueil, vos conseils et votre contribution à ce travail.

Je tiens également à remercier tout le personnel administratif de l'UMR CNRS 8612, notamment Patricia, Dominique, Hélène, Sylvie et Magaly pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Merci à tous les anciens et les nouveaux doctorants de l'équipe V, tout spécialement à Chantal, Walhan, Odile, Tanguy, Giovanna, Thais, Naila, Adam et Christian pour les bons moments passés ensemble et pour les échanges scientifiques fructueux.

J'associe à ces remerciements, tous les enseignants des facultés de pharmacie de l'université Félix Houphouët-Boigny d'Abidjan et de l'université de droit et santé de Lille 2 qui ont participé à ma formation pharmaceutique initiale. Grand merci aux Professeurs Moriféré, Malan, Kablan, Gayot, Flament, Siepmann et Vion, pour leur appréciable apport et pour les connaissances transmises.

Je pense également à mes collègues du département de pharmacotechnie, biopharmacie et de législation d'Abidjan qui ont accepté volontiers de suppléer à mon absence durant toutes ces années. Sincères remerciements au Professeur Amari et aux Docteurs Dally et Aka. Recevez toute ma gratitude pour votre indulgence et votre disponibilité.

Pensée pieuse à feu Docteur Sabali Coulibaly pour m'avoir donné l'amour pour la galénique. Reçois ce travail en guise de remerciement.

A ma chère épouse Augustine N'GUESSAN née LAUBOUER, pour ton soutien, tes prières et surtout pour tous les sacrifices consentis durant toutes ces années de solitude.

A mes enfants Yann, Jean-Fabrice, Frédéric et Paule-Micheline, merci aussi pour votre indulgence et pour votre patience pour toutes ces années passées loin de vous sans vous voir grandir. Que ce travail soit pour vous un exemple d'abnégation et de persévérance.

A feu mon père Frédéric N'GUESSAN, merci pour m'avoir inculqué cet esprit de travail et de persévérance dans l'effort, j'en ai eu besoin au cours de cette thèse. A ma mère Micheline Kock DJOBO Epse N'GUESSAN, merci pour toutes tes prières et ton soutien.

A mon ami et frère Docteur Maxime Assoi Dadeli, je tiens tout particulièrement à t'exprimer toute ma gratitude pour ton indéfectible soutien, ta présence et ta grande disponibilité pour moi et ma famille pendant ces difficiles années. Sois en remercié et que le Seigneur te rende au centuple tout ce que tu as fait pour que ce travail aboutisse.

A mes amis de Lille et de Paris qui m'ont soutenu durant tout mon périple : Marcellin, Elise, Suzanne, Eugène, André, Céline, Jean Paul, Marie-Rolande, Blaise, Edwige, Cyriaque, Christiane, Blanche-Flore et Gèneviève. Votre présence et votre soutien m'ont permis, un temps soit peu, de surmonter la solitude dans ce pays lointain. Je m'en souviendrai...

A mes amis d'Abidjan : Eby, Félix, Sanogo, Léon, Gama, Jules et Benson, merci pour votre soutien et vos prières.

A toutes les grandes familles N'GUESSAN, DJOBO, KPAMENAN et LAUBOUER recevez toute ma gratitude pour le soutien que vous m'avez apporté de près ou de loin durant cette formation.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| TRAVAUX ANTERIEURS | 6 |
| 1. Physiologie des voies respiratoires | 7 |
| 1.1 Anatomie des poumons | 7 |
| 1.2 Muqueuse pulmonaire | 9 |
| 2. Dépôt pulmonaire des particules | 10 |
| 2.1 Paramètres influençant le dépôt pulmonaire des particules | 10 |
| 2.2 Mécanismes de dépôt pulmonaire des particules | 11 |
| 2.2.1 Impaction inertielle | 12 |
| 2.2.2 Sédimentation | 12 |
| 2.2.3 Diffusion | 13 |
| 2.2.4 Précipitation électrostatique | 14 |
| 2.2.5 Interception | 14 |
| 2.3 Clairance des particules inhalées | 14 |
| 3. Pathologies pulmonaires et corticothérapie inhalée | 16 |
| 3.1 Asthme | 16 |
| 3.1.1 Epidémiologie et physiopathologie de l'asthme | 16 |
| 3.1.2 Mécanisme immunologique de l'asthme | 18 |
| 3.1.3 Classification de la sévérité de l'asthme | 19 |
| 3.1.4 Traitement de l'asthme | 22 |
| 3.2 Autres pathologies pulmonaires pour lesquelles la corticothérapie inhalée est utilisée | 22 |
| 4. Administration des corticoïdes par voie pulmonaire | 24 |
| 4.1 Propriétés pharmacologiques des corticoïdes inhalés | 24 |
| 4.2 Propriétés pharmacocinétiques des corticoïdes inhalés | 25 |
| 4.3 Mécanismes d'action des corticostéroïdes inhalés | 29 |
| 4.4 Effets indésirables des corticoïdes inhalés | 30 |
| 4.5 Corticorésistance asthmatique | 31 |
| 4.6 Implications thérapeutiques | 31 |
| 5. Dispositifs d'inhalation | 32 |
| 5.1 Nébuliseurs | 32 |
| 5.1.1 Nébuliseurs pneumatiques | 32 |
| 5.1.2 Nébuliseurs ultrasoniques | 32 |
| 5.1.3 Nébuliseurs à tamis | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 5.2 Inhalateurs doseurs de liquide | 34 |
| 5.2.1 Inhalateurs doseurs de liquide pressurisés | 35 |
| 5.2.2 Les aérosols doseurs mécaniques | 36 |
| 5.2.3 Inhalateurs doseurs électrohydrodynamiques | 37 |
| 5.2.4 Inhalateurs doseurs thermiques | 37 |
| 5.3 Inhalateurs à poudre sèche | 37 |
| 6. Formulation des médicaments inhalés | 40 |
| 6.1 Aérosols doseurs pressurisés | 40 |
| 6.1.1 Formulation des suspensions pour aérosols pressurisés | 40 |
| 6.1.2 Formulation des solutions pour aérosols | 41 |
| 6.2 Formulations de poudres sèches pour inhalation | 42 |
| 6.2.1 Poudres sèches à particules vectrices | 42 |
| 6.2.2 Liposomes | 44 |
| 6.2.3 Microparticules polymères | 46 |
| 6.2.4 Particules PulmoSpheres | 48 |
| 6.2.5 Particules enrobées | 49 |
| 6.2.6 Grosses particules poreuses | 50 |
| 6.2.7 Particules Troyennes | 53 |
| 7. Stratégies de formulation des particules poreuses par Spray drying | 54 |
| 7.1 Principe du spray drying | 54 |
| 7.2 Formulation des particules pour administration pulmonaire | 56 |
| Références | 58 |
| TRAVAUX EXPERIMENTAUX | 73 |
| Chapitre 1 : Optimisation de microparticules de palmitate de dexaméthasone destinées à être administrées par la voie pulmonaire | 74 |
| Publication 1 : Optimization of spray-dried dexamethasone palmitate microparticles for pulmonary delivery | 76 |
| Abstract | 76 |
| Introduction | 77 |
| Materials and methods | 78 |
| Results and discussion | 81 |
| Conclusion | 84 |
| Tables and figures | 85 |
| References | 93 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 2 : Evaluation in vivo de particules poreuses de palmitate de dexaméthasone après administration pulmonaire à des rats sains. | 94 |
| Publication 2 : Dexamethasone palmitate porous particles: in vivo evaluation after lung delivery in rats | 96 |
| Abstract | 96 |
| Introduction | 97 |
| Materials and methods | 98 |
| Results and discussion | 101 |
| Conclusion | 107 |
| References | 108 |
| | |
| DISCUSSION GENERALE | 111 |
| | |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 124 |

Abréviations

| | |
|------------------|--|
| ACF | : activation function |
| ADN | : acide désoxyribonucléique |
| AF | : alveolar fraction |
| AH | : acide hyaluronique |
| AIS | : anti-inflammatoire stéroïdien |
| AP-1 | : activator protein-1 |
| ARN | : acide ribonucléique |
| AT | : acétonide de triamcinolone |
| AUC | : area under curve |
| BALF | : bronchoalveolar lavage fluid |
| BDP | : beclomethasone dipropionate |
| 17 BMP | : 17-beclomethasone monopropionate |
| BPCO | : bronchopneumopathie chronique obstructive |
| BUD | : budésonide |
| CD4+ | : cluster of differentiation 4 |
| CD8+ | : cluster of differentiation 8 |
| CFC | : chlorofluorocarbone |
| CIC | : ciclésonide |
| C _{max} | : concentration plasmatique maximale |
| COPD | : chronic obstructive pulmonary disease |
| CYP450 | : cytochrome P 450 |
| d _{ae} | : diamètre aérodynamique |
| ΔH | : enthalpie différentielle |
| des-CIC | : désisobutyryl-ciclésonide |
| DPI | : dry powder inhaler |
| DPPC | : 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine |

| | |
|--------------|---|
| DSC | : differential scanning calorimetry |
| DXA | : dexaméthasone acétate |
| DXM | : dexaméthasone base |
| DXP | : dexaméthasone palmitate ou palmitate de dexaméthasone |
| EEC | : european economic community |
| ELF | : epithelial lining fluid |
| Eq. | : équation |
| ERK | : extracellular regulated kinase |
| FEV | : forced expiratory volume |
| FF | : Formoterol fumarate |
| FLU | : Flunisolide |
| FP | : Fluticasone propionate |
| FPF | : fine particle fraction |
| GCI | : glucocorticoïde inhalé |
| GPP | : grosse particule poreuse |
| GR | : glucocorticoid receptor |
| HA | : hyaluronic acid |
| HFA | : hydrofluoroalcane |
| HPLC | : high performance liquid chromatography |
| hsp 90 | : heat shock protein 90 |
| ICS | : inhaled corticosteroids |
| IFN γ | : interféron-g |
| IgE | : immunoglobuline E |
| IL | : interleukine |
| I-K β | : inhibitor kappa B |
| JNK | : c-jun N-terminal kinase |

| | |
|-------|--|
| L/min | : litre par minute |
| LABA | : long acting beta-2-agonist |
| LOD | : limits of detection |
| LOQ | : limits of quantification |
| LPP | : large porous particle |
| LPPs | : large porous particles |
| MAPK | : mitogen-activated protein kinase |
| MDI | : metered dosed inhaler |
| MF | : mometasone furoate |
| μL | : microlitre |
| μm | : micromètre |
| MSLI | : multi-stage liquid impinger |
| NAEPP | : national asthma education and prevention program |
| NF-κB | : nuclear factor kappa B |
| NK | : natural killer |
| NP | : nanoparticule |
| NPMP | : nanoporous microparticle |
| NPMPs | : nanoporous microparticles |
| OMS | : organisation mondiale de la santé |
| PA | : principe actif |
| PAAs | : principes actifs |
| PBS | : phosphate buffered saline |
| PEF | : peak expiratory flow |
| PEG | : polyéthylène glycol |
| PEI | : polyéthylène-imine |
| PGA | : polyglycolic acid |

| | |
|--------------------|--|
| PK | : pharmacokinetics |
| PLA | : poly(lactide) ou poly (acide lactique) |
| PLGA | : poly(lactide-co-glycolide) ou poly(acide lactique-co-glycolique) |
| pMDI | : pressurized metered dose inhaler |
| PNE | : polynucléaire éosinophile |
| PNN | : polynucléaire neutrophile |
| PVDF | : polyvinylidene fluoride |
| PVP | : poly(vinylpyrrolidone) |
| RH | : residual humidity |
| RNA | : ribonucleic acid |
| SD | : standard deviation |
| SDRA | : syndrome de détresse respiratoire aiguë |
| SEM | : scanning electron microscopy |
| SEM | : standard error of the mean |
| SIDA | : syndrome d'immunodéficience acquis |
| SM | : Salmeterol xinaloate |
| SPION | : super paramagnetic iron oxide nanoparticle |
| $t_{1/2}$ | : temps de demi-vie |
| TAA | : triamcinolone acétonide |
| TD | : testosterone decanoate |
| T _g | : température de transition vitreuse |
| Th2 | : T helper cell 2 |
| Th1 | : T helper cell 1 |
| t_{max} | : temps de concentration plasmatique maximale |
| TNF | : tumor necrosis factor |
| T _{onset} | : Température de début de transition thermique |

USA : united state of america

VEMS : volume expiratoire maximal en une seconde

VI : Vilanterol trilenalate

WHO : world health organization

Introduction générale

Face au développement sans cesse croissant de l'industrialisation à travers le monde entier, la pollution environnementale est devenue un problème majeur de santé publique parce qu'elle fait partie des causes de nombreuses maladies respiratoires [1,2]. L'OMS a dénombré en 2011, près de 300 millions d'asthmatiques dans le monde avec un taux de mortalité avoisinant 250 000 décès par an, exclusion faite des autres pathologies respiratoires telles que la bronchopneumopathie obstructive chronique et les maladies infectieuses qui affectent également des millions de personnes dans le monde [2–4]. Le traitement de ces pathologies respiratoires repose essentiellement sur l'utilisation de glucocorticoïdes par différentes voies d'administration : orale, parentérale et pulmonaire. En termes de rapport bénéfice-risque, la voie pulmonaire a montré les meilleurs résultats et reste de loin la voie d'excellence pour le traitement de ces pathologies car présentant de nombreux avantages [5,6]. Elle permet d'avoir un début d'action très rapide par ciblage du site d'action avec de très faibles doses thérapeutiques par rapport aux voies classiques, ce qui entraîne des effets secondaires locaux et systémiques moindres [7,8].

Actuellement malgré les nombreux efforts qui sont faits pour développer de nouvelles formes innovantes à libération prolongée dans les poumons, la plupart des glucocorticoïdes inhalés (GCI) disponibles sur le marché pharmaceutique sont à administrations multiples [9]. Ce qui continue à rendre ces traitements contraignants pour les malades au point d'entraver leur suivi thérapeutique [10,11]. Pourtant la libération modulée des GCI présente de nombreux avantages par rapport aux formes galéniques classiques dont l'allongement du temps de résidence pulmonaire des PAs, la réduction de leur fréquence d'administration, l'amélioration de l'observance des patients aux traitements et le ciblage des médicaments sur des sites d'action spécifiques [12,13]. Par ailleurs, pour éviter d'être rapidement éliminé des voies respiratoires, la conception de ces formes inhalées doit tenir compte des principaux mécanismes de défense des poumons tels que la clairance mucociliaire, la phagocytose par les macrophages et la dégradation métabolique [14,15].

Dans le cadre de ce travail nous nous sommes donnés pour objectif d'optimiser une forme galénique à libération contrôlée destinée à être administrée par la voie pulmonaire. A cet effet, nous nous proposons de formuler un modèle innovant de particules à inhaler appelées "grosses particules poreuses" (LPPs pour *large porous particles*) qui sont des particules de grande porosité, de diamètre géométrique médian supérieur à 5 μm avec une densité inférieure à 0,4

g/cm^3 . Ces caractéristiques permettent au final d'avoir de grosses particules avec des diamètres aérodynamiques correspondants inférieurs à $5 \mu\text{m}$, et donc adaptées à un dépôt idéal dans les voies respiratoires basses [16,17]. En outre, ces particules de grande taille présentent de bonnes propriétés d'écoulement avec une faible tendance à la cohésivité interparticulaire. Leur grande taille leur permet également d'échapper plus efficacement au système de défense des voies pulmonaires [18,19]. Nous comptons produire ces LPPs par spray-drying, une technologie d'atomisation-séchage largement utilisée pour la formulation de telles particules [20,21]. La matrice sera essentiellement composée de 2 excipients biocompatibles et biodégradables : la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) et l'acide hyaluronique (AH) dont la combinaison permet de moduler la libération du PA dans les tissus biologiques [22]. Nous avons choisi d'utiliser comme principe actif (PA), un glucocorticoïde modèle, le palmitate de dexaméthasone (DXP) qui est une prodrogue de la dexaméthasone (DXM), un anti-inflammatoire stéroïdien très utilisé en thérapeutique pour de nombreuses pathologies inflammatoires dont l'asthme par voies orale et parentérale [23,24]. Cependant aucune forme inhalée de la DXP ni de la DXM n'a encore été commercialisée à ce jour car les formulations expérimentales de ces deux molécules n'ont pas donné de résultats satisfaisants [25–27].

Ce manuscrit comportera deux grandes parties. La première partie va comprendre un rappel sur la physiologie et les principales pathologies pulmonaires et une synthèse sur les glucocorticoïdes, leur utilisation par voie inhalée ainsi que les différentes formes galéniques inhalées avec leurs dispositifs d'administration. Nous présenterons la stratégie adoptée pour la formulation de nos poudres. La seconde partie est notre travail expérimental qui sera subdivisé en deux chapitres. Le premier chapitre portera sur la formulation et la caractérisation physicochimique des microparticules de DXP. Nous y décrirons la stratégie utilisée pour optimiser les particules obtenues en vue d'une administration idéale dans les poumons profonds et d'une éventuelle libération prolongée de la DXP. Le deuxième chapitre sera consacré à l'expérimentation animale chez le rat. Nous nous sommes attelés dans cette partie à développer une méthode d'extraction et de dosage de la DXP et de sa forme active, la DXM. Cette méthode analytique nous a permis de quantifier la teneur en DXP et en DXM dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire et dans le plasma. Ces résultats seront donc décrits afin d'évaluer le profil *in vivo* de ces 2 molécules aussi bien dans le liquide épithélial pulmonaire que dans le plasma. L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail feront l'objet d'une discussion

générale afin d'en tirer des conclusions et des perspectives pour d'éventuelles améliorations à apporter à ce travail.

Références

- [1] M. Brauer, G. Hoek, P. Van Vliet, K. Meliefste, P.H. Fischer, A. Wijga, et al., Air Pollution from Traffic and the Development of Respiratory Infections and Asthmatic and Allergic Symptoms in Children, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 (2002) 1092–1098. doi:10.1164/rccm.200108-007OC.
- [2] R.J. Delfino, Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research., *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 573–589.
- [3] S. Croisant, Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease, *Adv. Exp. Med. Biol.* 795 (2014) 17–29. doi:10.1007/978-1-4614-8603-9_2.
- [4] GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention | Documents / Resources | GINA, (n.d.). <http://www.ginasthma.org/documents/4> (accessed June 2, 2015).
- [5] H. Bisgaard, C. O'Callaghan, G.C. Smaldone, *Drug Delivery to the Lung*, CRC Press, 2001.
- [6] C. Loira-Pastoriza, J. Todoroff, R. Vanbever, Delivery strategies for sustained drug release in the lungs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 81–91. doi:10.1016/j.addr.2014.05.017.
- [7] R. Dahl, Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma, *Respir. Med.* 100 (2006) 1307–1317. doi:10.1016/j.rmed.2005.11.020.
- [8] R.M. Stanbury, E.M. Graham, Systemic corticosteroid therapy—side effects and their management, *Br. J. Ophthalmol.* 82 (1998) 704–708. doi:10.1136/bjo.82.6.704.
- [9] L. Thorsson, S. Edsbacker, T.B. Conradson, Lung deposition of budesonide from Turbuhaler is twice that from a pressurized metered-dose inhaler P-MDI, *Eur. Respir. J.* 7 (1994) 1839–1844.
- [10] G.M. Cochrane, R. Horne, P. Chanez, Compliance in asthma, *Respir. Med.* 93 (1999) 763–769. doi:10.1016/S0954-6111(99)90260-3.
- [11] C. F, D. A, Objective measurements of compliance in asthma treatment., *Ann. Allergy.* 73 (1994) 527–532.
- [12] J.A. Boscia, K.K. Pudi, M.T. Zvarich, L. Sanford, S.K. Siederer, C. Crim, Effect of Once-Daily Fluticasone Furoate/Vilanterol on 24-Hour Pulmonary Function in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease: A Randomized, Three-Way, Incomplete Block, Crossover Study, *Clin. Ther.* 34 (2012) 1655–1666.e5. doi:10.1016/j.clinthera.2012.06.005.
- [13] R. Engelstätter, M. Szlávik, C. Gerber, E. Beck, Once-daily ciclesonide via metered-dose inhaler: Similar efficacy and safety with or without a spacer, *Respir. Med.* 103 (2009) 1643–1650. doi:10.1016/j.rmed.2009.06.004.
- [14] C. Evora, I. Soriano, R.A. Rogers, K.M. Shakesheff, J. Hanes, R. Langer, Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, *J. Controlled Release.* 51 (1998) 143–152. doi:10.1016/S0168-3659(97)00149-1.
- [15] B. Forbes, R. O'Lone, P.P. Allen, A. Cahn, C. Clarke, M. Collinge, et al., Challenges for inhaled drug discovery and development: Induced alveolar macrophage responses, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 71 (2014) 15–33. doi:10.1016/j.addr.2014.02.001.
- [16] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, et al., Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, *Science.* 276 (1997) 1868–1872. doi:10.1126/science.276.5320.1868.
- [17] D.A. Edwards, A. Ben-Jebria, R. Langer, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles, *J. Appl. Physiol.* 85 (1998) 379–385.

- [18] B. Patel, V. Gupta, F. Ahsan, PEG–PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin, *J. Controlled Release*. 162 (2012) 310–320. doi:10.1016/j.jconrel.2012.07.003.
- [19] F. Ungaro, C. Giovino, C. Coletta, R. Sorrentino, A. Miro, F. Quaglia, Engineering gas-foamed large porous particles for efficient local delivery of macromolecules to the lung, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 60–70. doi:10.1016/j.ejps.2010.05.011.
- [20] F. Iskandar, A.B.D. Nandiyanto, W. Widiyastuti, L.S. Young, K. Okuyama, L. Gradon, Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1027–1034. doi:10.1016/j.actbio.2008.11.016.
- [21] M.I. Amaro, L. Tajber, O.I. Corrigan, A.M. Healy, Optimisation of spray drying process conditions for sugar nanoporous microparticles (NPMPs) intended for inhalation, *Int. J. Pharm.* 421 (2011) 99–109. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.09.021.
- [22] C. Gomez Gaete, Développement de vecteurs hybrides nano/microparticulaires pour la libération de corticostéroïdes, Paris 11, 2007. <http://www.theses.fr/2007PA114822> (accessed April 20, 2015).
- [23] F. Qureshi, A. Zaritsky, M.P. Poirier, Comparative efficacy of oral dexamethasone versus oral prednisone in acute pediatric asthma, *J. Pediatr.* 139 (2001) 20–26. doi:10.1067/mpd.2001.115021.
- [24] M. Kraft, C. Lewis, D. Pham, H.W. Chu, IL-4, IL-13, and dexamethasone augment fibroblast proliferation in asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 107 (2001) 602–606. doi:10.1067/mai.2001.113760.
- [25] M. Bartneck, K.M. Scheyda, K.T. Warzecha, L.Y. Rizzo, K. Hittatiya, T. Luedde, et al., Fluorescent cell-traceable dexamethasone-loaded liposomes for the treatment of inflammatory liver diseases, *Biomaterials*. 37 (2015) 367–382. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.10.030.
- [26] H. Benameur, G. De Gand, R. Brasseur, J.P. Van Vooren, F.J. Legros, Liposome-incorporated dexamethasone palmitate: Chemical and physical properties, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 157–167. doi:10.1016/0378-5173(93)90239-C.
- [27] M. Dennis, I.H. Itkin, EFFECTIVENESS AND COMPLICATIONS OF AEROSOL DEXAMETHASONE PHOSPHATE IN SEVERE ASTHMA, *J. Allergy*. 35 (1964) 70–76.

Travaux antérieurs

1. Physiologie des voies respiratoires

1.1 Anatomie des poumons

Les poumons sont situés dans le thorax et font partie de l'appareil respiratoire. Ils sont pairs : droit et gauche, et occupent latéralement la plus grande partie du thorax. Ils sont entourés de la paroi thoracique, qui est composée des côtes et des muscles entre les côtes. Les poumons sont séparés par le médiastin, qui contient le cœur et d'autres organes. Sous les poumons se trouve le diaphragme, un muscle mince qui sépare la cavité thoracique de l'abdomen. Chaque poumon est divisé en lobes : le poumon gauche en possède 2 et le poumon droit 3 lobes. Ce dernier est légèrement plus large que le poumon gauche. Le cœur s'appuie sur un creux dans le lobe inférieur gauche appelé incisure cardiaque. La trachée est la voie respiratoire en forme de tube qui se trouve dans le cou et le thorax. Elle se divise en 2 bronches souche/principales qui entrent chacune dans un poumon. Les bronches souches/principales se divisent en bronches secondaires qui à leur tour, se ramifient en bronchioles. 15 à 20 divisions dichotomiques s'opèrent entre les bronches et les bronchioles. À l'extrémité des bronchioles se trouvent des millions de minuscules sacs appelés alvéoles qui sont recouverts de nombreux vaisseaux sanguins (Fig. 1) [1].

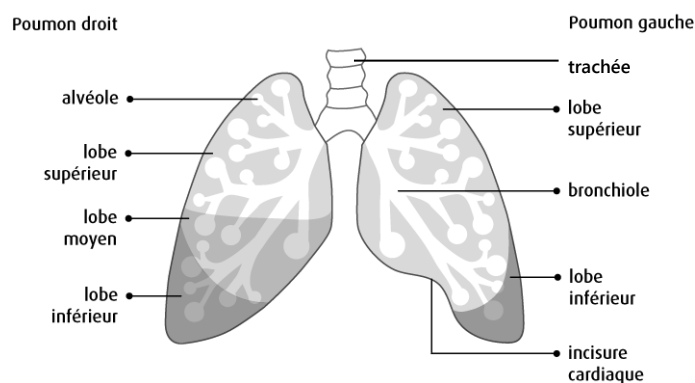


Fig. 1 : Anatomie des poumons [2]

Les voies aériennes sont divisées en voies aériennes supérieures et voies aériennes inférieures. Les voies aériennes supérieures comprennent les fosses nasales, le pharynx et le larynx tandis que les voies aériennes inférieures sont composées de l'arbre trachéobronchique et des alvéoles pulmonaires. La trachée est le conduit aérien cervico-thoracique. Elle est constituée des 16 à 20 anneaux cartilagineux en fer à cheval fermés en arrière par une paroi postérieure

membraneuse qui comprend également le muscle trachéal. Cette structure annulaire existe jusqu'au niveau des bronchioles. La trachée descend en avant de l'œsophage de la sixième vertèbre cervicale jusqu'au niveau de la cinquième vertèbre thoracique où elle se divise en bronches principales. La bronche principale droite est de direction plus verticale (environ 30° par rapport à l'axe vertical) que la bronche principale gauche (environ 60° par rapport à l'axe vertical) du fait de la présence de la crosse de l'aorte qui repousse la bifurcation trachéale. Cela explique la plus grande fréquence des corps étrangers dans la bronche principale droite (Fig. 2).

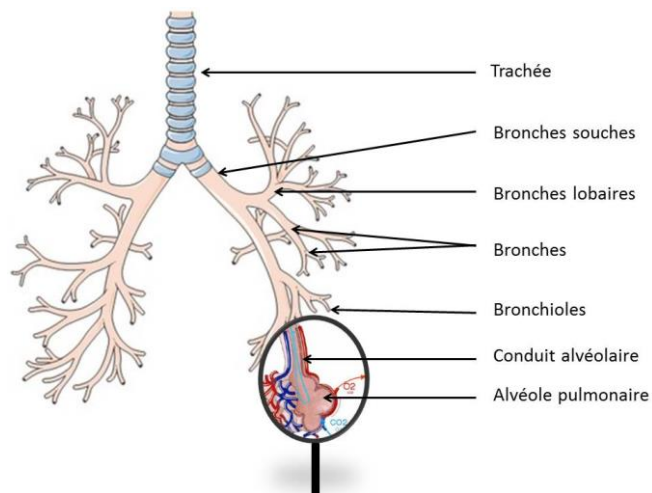


Fig. 2: Schéma de l'arbre trachéobronchique [3]

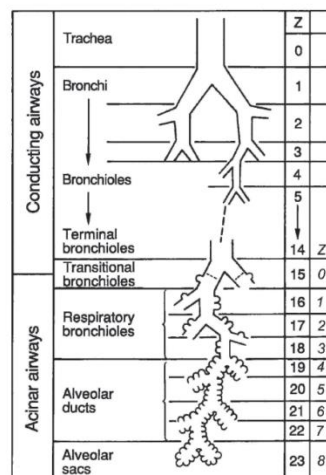


Fig. 3 : Représentation schématique du réseau trachéobronchique (Weibel) [4]

La bronche principale droite est également plus courte que la bronche principale gauche. En général, elle est déjà divisée avant d'entrer dans le poumon droit. Chacune des bronches se

ramifie en bronches lobaires, puis en bronches segmentaires, puis en bronchioles. Au total, il existe jusqu'à 23 divisions avant les alvéoles pulmonaires (Fig. 3) [5].

1.2 Muqueuse pulmonaire

L'épithélium respiratoire est composé de 4 types cellulaires : les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules basales et les cellules neuroendocrines (Fig. 4). Les cellules ciliées constituent le principal type cellulaire dans l'épithélium de la trachée car elles représentent 50% environ de la population cellulaire. Les centaines de cils présents sur la surface apicale des cellules ciliées assurent en permanence, la distribution du mucus dans les voies aériennes supérieures. Dans la région alvéolaire les cellules épithéliales T-I et T-II, ainsi que les macrophages constituent la population cellulaire la plus importante. Les cellules T-I sont responsables des échanges gazeux et ioniques ainsi que du transport des protéines. Les cellules T-II sont quant à elles, les défenseurs de l'alvéole car responsables de la synthèse et la sécrétion de surfactant qui recouvre l'épithélium alvéolaire. Les sacs alvéolaires ont un diamètre moyen de 250 μm avec de petites logettes qui communiquent entre elles via des pores alvéolaires [6,7].

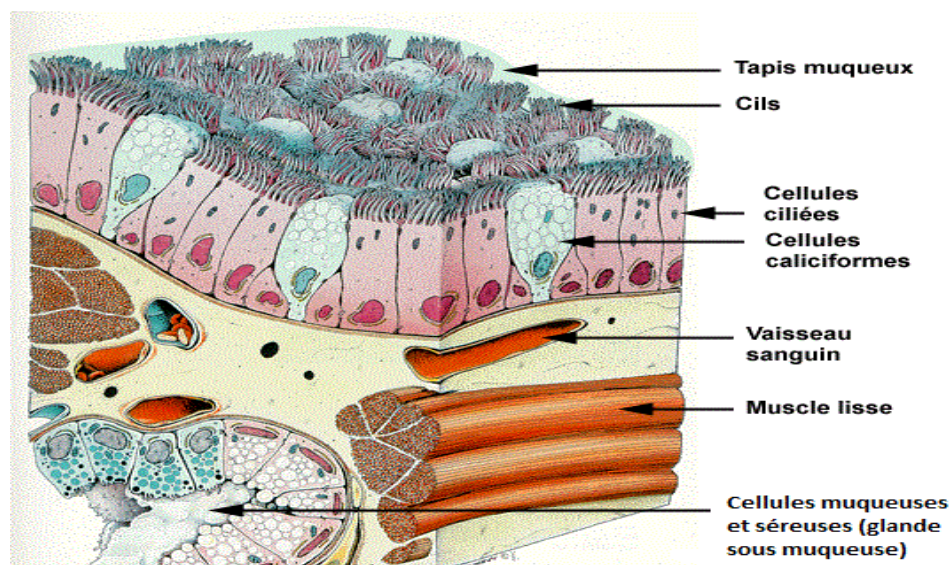


Fig. 4 : Cellules épithéliales des voies respiratoires [8]

La surface totale alvéolaire est approximativement de 100 à 120 m^2 contre 2 à 3 m^2 pour la surface tracheobronchique. Ce qui augmente considérablement la surface de contact entre l'air inspiré et la zone d'échanges gazeux et ioniques [9]. De plus, d'une part, l'épaisseur des couches cellulaires constituant l'épithélium des voies respiratoires se réduit progressivement de

60 μm , dans les voies respiratoires supérieures jusqu'à 0,1 à 0,4 μm au niveau alvéolaire et d'autre part, les capillaires sanguins sont abondants au niveau des alvéoles et des bronchioles respiratoires (Figure 5). Toutes ces particularités morphologiques sont faites pour favoriser les échanges gazeux au niveau alvéolaire ainsi que l'absorption systémique des substances actives atteignant cette zone après inhalation [10].

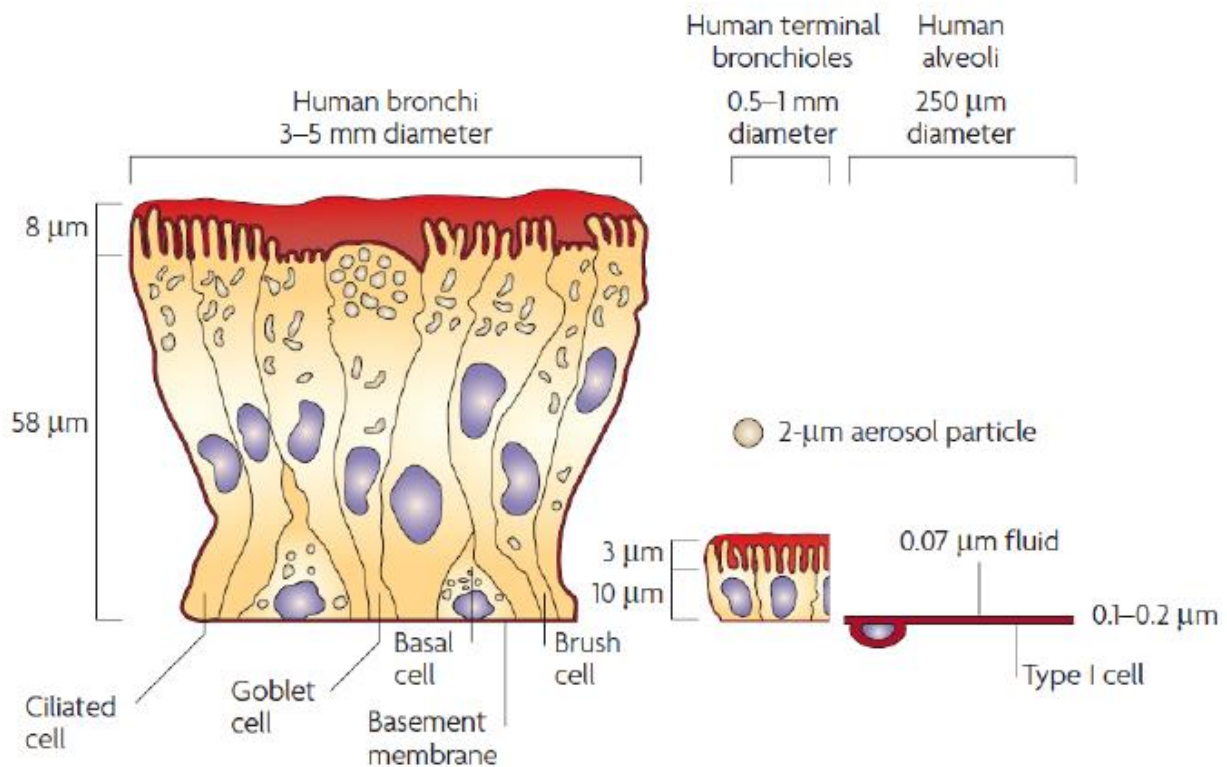


Fig. 5: Comparaison de l'épithélium de différents sites pulmonaires [10].

2. Dépôt pulmonaire des particules

2.1 Paramètres influençant le dépôt pulmonaire des particules

La profondeur de la pénétration des particules dans les voies aériennes de l'appareil respiratoire et leurs effets lorsqu'elles s'y sont déposées dépendent de la taille, de la forme et de la masse volumique de ces matières, ainsi que de leurs propriétés chimiques. Tous ces paramètres se retrouvent dans la notion de diamètre aérodynamique (d_{ae}) qui correspond au diamètre d'une sphère ayant la même vitesse limite de chute qu'une particule ayant une masse volumique de $1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$. Plusieurs paramètres permettent de caractériser le dépôt des particules dans les

poumons. Le paramètre essentiel intervenant dans les processus de dépôt de particules est le diamètre aérodynamique. Il décrit le comportement aéraulique d'un aérosol. Il est donné par la relation suivante (Eq. 1) [11]:

$$d_{ae} = d \sqrt{\frac{\rho}{\rho_0 \chi}} \quad (1)$$

d : Diamètre géométrique médian de la particule (μm)

ρ : Masse volumique de la particule (kg.m^{-3})

ρ_0 : Masse volumique de l'eau ($\rho_0 = 1000 \text{ kg.m}^{-3}$)

χ : Facteur de forme dynamique

L'humidité à l'intérieur des voies respiratoires (99,5%) joue également un rôle important sur la taille des particules. Ce fort taux d'humidité interagit avec les particules inhalées en modifiant leur taille. Les substances volatiles deviennent plus petites et celles hygroscopiques sous l'effet de l'humidité, deviennent plus grosses avec la possibilité de s'agréger entre elles et donc de s'impacter dans l'oropharynx. Par conséquent, la seule connaissance de la taille initiale des particules ne suffit pas à prédire le dépôt des particules dans les poumons [12]. La formulation des particules à inhaler doit donc tenir compte de leurs propriétés physicochimiques.

Deux autres paramètres permettent également de quantifier *in vitro*, la proportion de particules susceptibles de se déposer dans les poumons profonds à l'aide d'impacteurs à cascade, selon des procédures décrites dans les pharmacopées. Ce sont la fraction alvéolaire (AF pour l'anglais "*alveolar fraction*") et la fraction de particules fines (FPF pour l'anglais "*fine particle fraction*") représentant les pourcentages de particules ayant des diamètres aérodynamiques inférieurs respectivement à 3,1 μm et à 5 μm [13,14].

2.2 Mécanismes de dépôt pulmonaire des particules

Le dépôt des particules au niveau des poumons se fait suivant cinq mécanismes: l'impaction inertielle, la sédimentation, la diffusion, la précipitation électrostatique et l'interception (Fig. 6). Les trois premiers mécanismes sont directement liés à la taille et la densité des particules et les deux derniers sont respectivement liés à la forme et à la charge électrostatique des particules. Les particules n'ayant pu se déposer dans les voies respiratoires, sont exhalées.

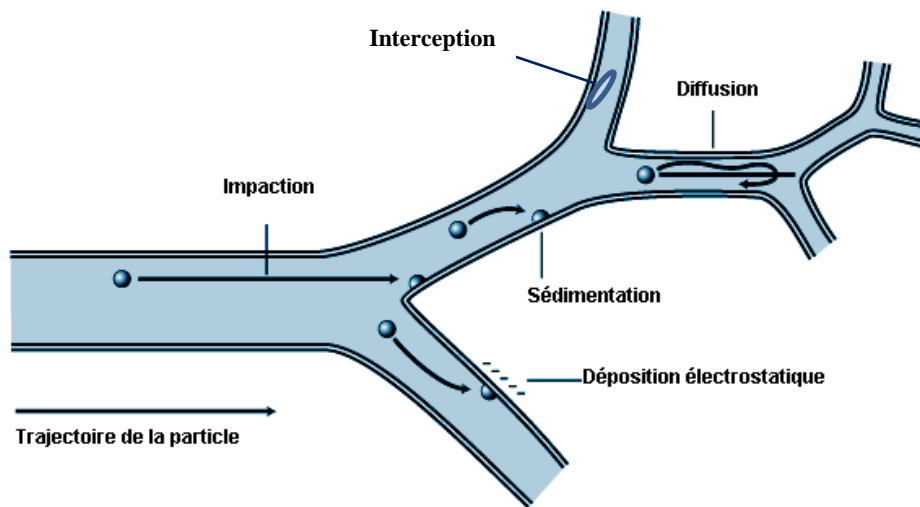


Fig. 6 : Mécanismes de dépôt pulmonaire des particules (Modifié) [15].

2.2.1 Impaction inertielle

L'impaction dépend de la masse et de la vitesse des particules et se déroule dans les voies respiratoires supérieures. Les particules en suspension dans l'air ont tendance à suivre leur trajectoire initiale. Toutefois, lorsqu'elles atteignent une courbe dans les voies aériennes, de nombreuses particules, plutôt que de suivre l'écoulement d'air, continuent tout droit et impactent la surface placée sur leur trajectoire, parfois en y adhérant. Généralement, la plupart de particules de plus de 10 μm de diamètre aérodynamique, se déposent dans la zone oropharyngienne et ne peuvent pénétrer dans les voies respiratoires inférieures. Ce mécanisme prend le pas sur les autres à cause de la grande vitesse de l'air et du grand nombre de virages dans les voies aériennes supérieures [17].

2.2.2 Sédimentation

La sédimentation est un processus est lié à la masse et à la densité des particules et concerne les particules de taille comprise entre 1 et 8 μm . La loi de Stokes suppose que la vitesse relative entre la particule et le courant d'air est nulle. Ainsi, plus le temps de respiration est long et plus le pourcentage de dépôt dans les poumons sous l'influence de la gravité est élevé. La loi de Stokes peut être utilisée pour prédire la vitesse terminale de chute des particules (V_{ts}) selon l'équation (Eq. 2) [18]:

$$V_{ts} = \frac{(\rho_p - \rho_a) \cdot d^2 \cdot g}{18 \cdot \eta} \quad (2)$$

d : Diamètre géométrique médian de la particule

g : Constante de gravité

η : Viscosité de l'air

ρ_p : Densité de la particule

ρ_a : Densité de l'air

Avec un débit d'air élevé, le flux devient turbulent et le dépôt par impaction augmente. Par conséquent, cette équation suppose un écoulement laminaire dans les voies respiratoires tel que défini par le nombre de Reynolds qui doit être inférieur à 1 (Eq. 3) [19]:

$$Re = \frac{\rho_a \cdot V \cdot d}{\eta} \quad (3)$$

Re : Nombre de Reynolds

V : Vitesse de la particule

d : Diamètre de la particule

η : Viscosité de l'air

ρ_a : Densité de l'air

2.2.3 Diffusion

Ce type de dépôt est dû au mouvement brownien caractéristique de particules qui sont en perpétuel déplacement dans l'air causé par des chocs aléatoires entre les particules inhalées et les molécules d'air. Cela concerne les plus petites particules de diamètre aérodynamique inférieur à 1 μm . Plus la particule est petite, plus ce mouvement est important. Lorsque l'air atteint la zone alvéolaire, sa vitesse est encore plus faible et devient négligeable. La diffusion est le mécanisme de dépôt le plus important dans les voies aériennes basses. Ce processus est corrélé à la taille des particules, selon l'équation de Stokes-Einstein (Eq. 4) [20]:

$$Dif = \frac{k \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot d} \quad (4)$$

- Dif : Coefficient de diffusion
k : Constante de Boltzmann
T : Température absolue
d : Diamètre géométrique de la particule
 η : Viscosité de l'air

Le dépôt par diffusion est donc inversement proportionnel à la taille des particules. Les particules de taille inférieure à 0,5 μm peuvent être exhalées lors de l'expiration.

2.2.4 Précipitation électrostatique

La génération mécanique d'un aérosol peut entraîner la production de charges électriques. Il existe deux types d'interactions électriques entre les particules selon que les particules sont de charges identiques ou opposées. Dans le premier cas, c'est la répulsion qui provoque un mouvement des particules vers la paroi respiratoire. Dans le second cas, c'est l'attraction qui provoque l'augmentation de masse et l'agrégat formé se dépose de façon prématurée dans le tractus pulmonaire. Ce mécanisme n'apporte qu'une faible contribution au dépôt des particules [21,22].

2.2.5 Interception

C'est un mécanisme de dépôt qui décrit une situation dans laquelle le centre de gravité de la particule est dans la trajectoire de la phase gazeuse mais une extrémité de la particule est déjà en contact avec la surface des voies respiratoires. Les dépôts par ce mécanisme est plus fréquent lorsque la particule a une forme allongée et se rencontre plus souvent dans les voies respiratoires plus étroites et dans les alvéoles [19,20].

2.3 Clairance des particules inhalées

La taille des particules, la puissance de la vitesse de l'air inspiré, la géométrie particulière des voies respiratoires faite de ramifications successives et de rétrécissements progressifs du diamètre militent considérablement en faveur d'un dépôt par impaction des particules inhalées [23]. Le mucus recouvrant l'épithélium pulmonaire (1 à 10 μm d'épaisseur) et le surfactant

recouvrant les alvéoles (0,1 à 0,2 d'épaisseur) constituent des barrières physiques à l'absorption des substances dans les poumons [12]. Dans un poumon normal, la fréquence des mouvements mucociliaires varie en fonction de la région pulmonaire.

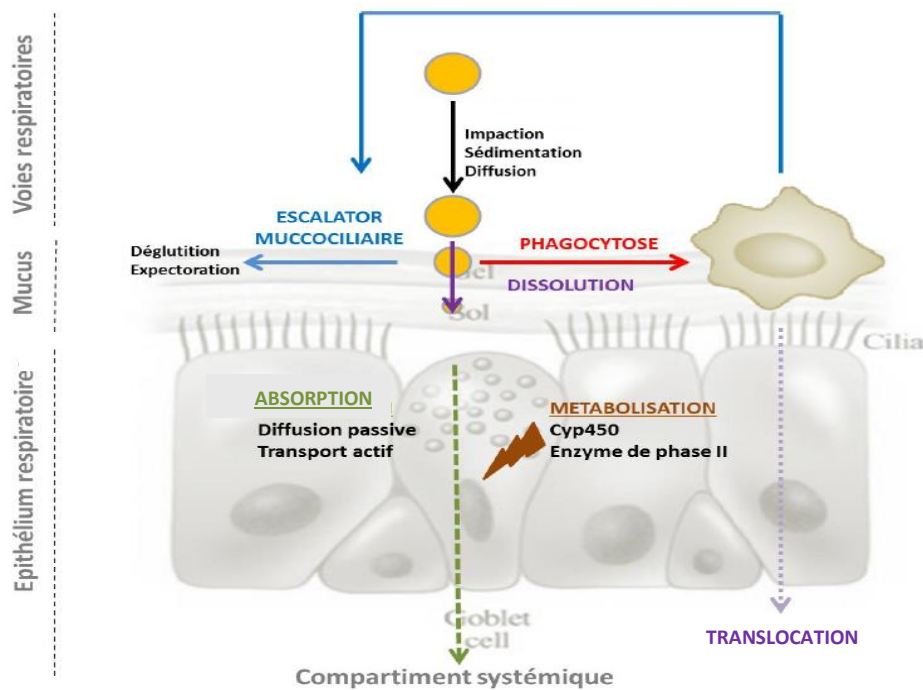


Fig. 7: Schéma des différents mécanismes de clairance pulmonaire [24]

Les mouvements sont plus élevés dans la trachée que dans les voies respiratoires basses et varient en fonction des facteurs agissant sur le fonctionnement ciliaire ainsi que sur la quantité et la qualité du mucus. Si la particule est facilement soluble dans les fluides biologiques, elle sera absorbée et passera dans la circulation systémique. Les substances lipophiles traversent aisément l'épithélium des voies respiratoires par un passage passif (Fig. 7). Les molécules hydrophiles traversent par le mécanisme extracellulaire ou par endocytose [25]. Au niveau de la région submucosale, les particules sont absorbées dans la circulation systémique soit par la circulation bronchique, soit par le système lymphatique. Quant aux substances insolubles, elles sont prises en charge par les macrophages alvéolaires par phagocytose ou par les mouvements mucociliaires pour les éliminer des poumons [26,27]. Dans les alvéoles, de nombreux peptides et protéines dégradés par les protéases sont éliminés par les macrophages alvéolaires. Le temps de demi-vie de la rétention des particules solides dans la région alvéolaire est corrélé aux mécanismes de clairance pulmonaire. Théoriquement 6 à 12h après le dépôt des particules dans

les alvéoles, toutes les particules sont phagocytées. Mais cette phagocytose dépend fortement de la taille des particules [28]. Les particules phagocytées sont entre 1 et 3 μm de taille et les particules n'ayant pu être éliminées par phagocytose telles que les nanoparticules situées dans les poumons profonds atteignent rapidement la voie systémique ou lymphatique [29]. Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer l'absorption systémique des particules inhalées. L'une des principales voies d'absorption est la transcytose à travers l'épithélium des voies respiratoires atteignant l'interstitium puis la circulation sanguine indirectement par la voie lymphatique ou à travers de larges pores transitoires dans l'épithélium dû à des lésions cellulaires ou à l'apoptose [30]. Le métabolisme des substances administrées dans les poumons est encore mal connu, de même que les concentrations et l'efficacité de ces médicaments. Toutes les enzymes présentes dans le foie sont également présentes à des degrés moindres dans les poumons tels que le cytochrome CYP450 qui a un taux 5 à 20 fois inférieur dans les poumons que dans le foie [31]. Ce qui explique que la dégradation enzymatique dans les alvéoles des protéines n'est pas le mécanisme principal de leur élimination des poumons. C'est pourquoi plus de 95% des protéines y compris l'insuline sont absorbées intactes au niveau des poumons [32].

3. Pathologies pulmonaires et corticothérapie inhalée

Les maladies respiratoires touchent les voies aériennes, y compris les voies nasales, les bronches et les poumons. Elles vont d'infections aiguës comme la pneumonie et la bronchite à des affections chroniques telles que l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive. Selon les estimations de l'OMS, les plus courantes sont l'asthme et la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO). D'autres maladies respiratoires moins fréquentes existent telles que les allergies respiratoires, les pneumopathies professionnelles, l'hypertension artérielle pulmonaire et les infections pulmonaires [33,34].

3.1 Asthme

3.1.1 Epidémiologie et physiopathologie de l'asthme

L'asthme est un problème de santé mondial qui affecte selon l'OMS environ 300 millions de personnes dans le monde dont la majorité est constituée d'enfants. Cette pathologie entraîne près de 250.000 décès par an [33,35]. L'utilisation des corticoïdes inhalés depuis quelques années, a considérablement contribué à réduire la mortalité liée à l'asthme [36]. En France,

l'asthme concerne plus de 2,5 millions de personnes, dont un tiers d'enfants [37]. La fréquence de l'asthme est en constante augmentation dans la plupart des pays.

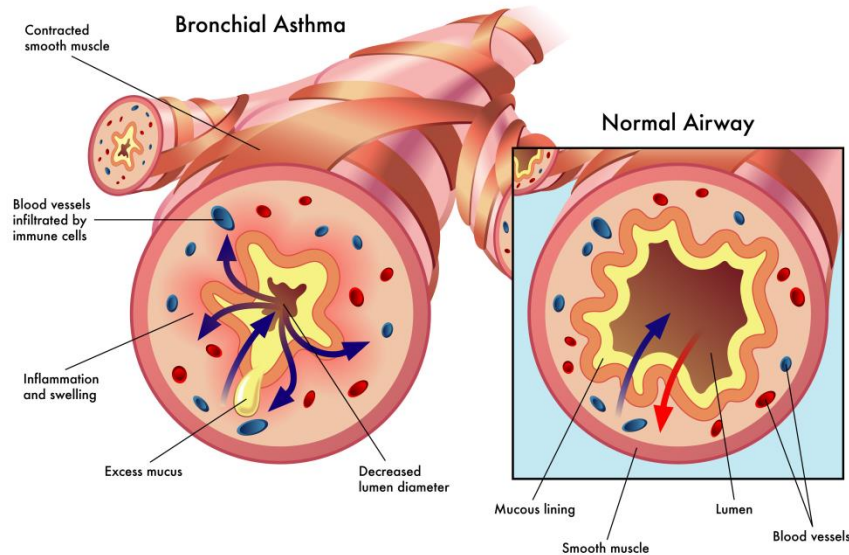


Fig. 8: Physiopathologie de l'asthme [38].

Toutefois, en raison de la diversité géographique, il y a une hétérogénéité considérable de l'asthme en termes d'interactions gène-environnement, des mécanismes physiopathologiques d'expositions environnementales, de la morbidité, de l'âge, de la gravité de la maladie sous-jacente, de l'accès aux soins de santé, des soins reçus, des facteurs psychologiques, de la réactivité de la maladie à la thérapie, et de la gravité de la maladie, y compris de l'exacerbation de l'asthme et de la mort ainsi que la morbidité chronique à long terme [39,40]. L'asthme est une maladie pulmonaire chronique des voies aériennes réversible, caractérisé par une obstruction bronchique résultant de l'inflammation des voies aériennes du poumon et d'un resserrement des muscles autour d'eux (Fig. 8) [41,42].

Des réactions plus graves peuvent se produire en raison de l'exposition à une variété des déclencheurs. Ceux-ci varient selon la personne et l'environnement, mais certains déclencheurs connus sont la cigarette, la fumée, la moisissure, le pollen, la poussière, les squames animales, l'effort physique, l'air froid, certains produits ménagers et industriels, les polluants atmosphériques, et certaines infections. L'asthme est d'origine multifactorielle dont les plus fréquentes sont génétiques, environnementales, alimentaires et tabagiques [39,42]. L'inflammation des voies aériennes supérieures entraîne la contraction des muscles lisses bronchiques aboutissant à une obstruction bronchique. Cette hyperréactivité bronchique se

traduit cliniquement par un œdème et un infiltrat cellulaire polymorphe constitué d'éosinophiles, de polynucléaires neutrophiles et de lymphocytes. Les symptômes sont le plus souvent des épisodes de dyspnées sifflantes, d'oppression thoracique et de toux répétitives nocturnes et au réveil. Ces symptômes peuvent être réversibles spontanément ou sous l'effet d'un traitement. Le tableau clinique peut considérablement varier d'un patient à l'autre [40,45].

3.1.2 Mécanisme immunologique de l'asthme

Les mécanismes physiopathologiques de l'asthme sont très complexes. La réaction inflammatoire dans l'asthme se développe en plusieurs étapes et fait intervenir de nombreuses cellules (Fig. 9). Elle débute par l'étape d'initiation de la réponse allergique sous la dépendance de la cellule dendritique, ensuite l'étape effectrice par la libération de multiples médiateurs issus des cellules pro-inflammatoires telles que les mastocytes, les éosinophiles, les lymphocytes et les monocytes et enfin l'étape de réparation qui intervient au stade chronique de l'asthme [35,46]. Lorsque l'allergène pénètre dans les voies aériennes, il interagit en premier lieu avec les cellules dendritiques présentes dans les voies aériennes. Ce qui a pour conséquence la production de chimiokines qui attirent les polynucléaires éosinophiles (PNE), les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes et les mastocytes dans les voies respiratoires. Ce processus de sensibilisation aux allergènes inhalés débute dès les premiers mois de la vie et conduira ou non au développement de la maladie asthmatique. Les mastocytes possèdent à leur surface des récepteurs pour l'immunoglobuline E (IgE). Après activation, les mastocytes libèrent des médiateurs préformés tels que l'histamine, la tryptase et des médiateurs néoformés comme les dérivés de l'acide arachidonique et les cytokines par exemple le facteur de nécrose tumorale (TNF de l'anglais : tumor necrosis factor). La libération de ces médiateurs entraîne une bronchoconstriction, un œdème des voies aériennes et une hypersécrétion de mucus. Les cellules dendritiques migrent ensuite vers les ganglions médiastinaux où elles induisent la prolifération lymphocytaire T et ultérieurement la différenciation en T helper 1 (Th1) et T helper 2 (Th2) [47,48]. Ces cellules Th1 et Th2 ont des profils de sécrétion de cytokines différents : les Th1 participent au développement des réactions d'hypersensibilité retardée et se caractérisent par une production prédominante d'interféron- γ (IFN γ) tandis que les Th2, par l'intermédiaire des cytokines interleukines IL-4 et IL-13, renforcent la production d'IgE mais aussi, via l'IL-5, la différenciation et l'activation des éosinophiles. Certaines cytokines modulent négativement l'inflammation allergique: l'IL-10 a une origine ubiquitaire et apparaît essentiellement comme une cytokine anti-inflammatoire

puissante [48]; l'IL-12 : produite par les monocytes, les cellules dendritiques et les cellules Natural Killer (NK) joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules Th1 [49,50] ; l'IL-13 partage de nombreuses activités biologiques avec l'IL-4, notamment l'induction et la synthèse d'IgE [50]. Elle exerce aussi une certaine activité anti-inflammatoire directe. L'IL-9 favorise l'éosinophilie bronchique et l'hyperréactivité bronchique.

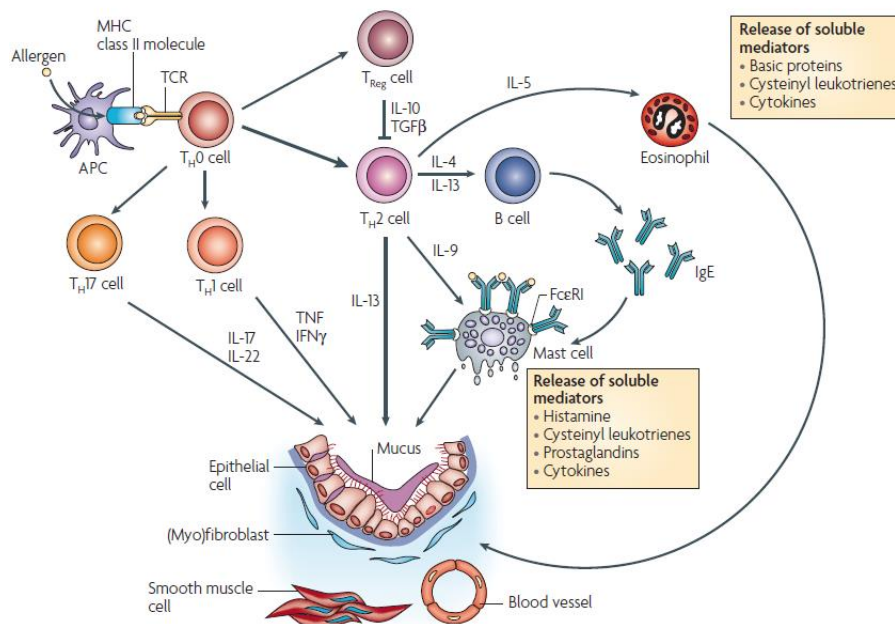


Fig. 9: Mécanisme physiopathologique de l'asthme [51]

L'IL-9 induit aussi une expression accrue des chimiokines au niveau des cellules épithéliales pulmonaires. De nombreux patients possèdent des anticorps d'immunoglobuline E (IgE) contre les allergènes environnementaux ce qui limite l'impact de ceux-ci sur ces patients. Par contre, l'inflammation des voies respiratoires et l'activation des lymphocytes sont plus marquées chez les patients sans anticorps IgE spécifiques de l'allergène [52]. Chez les asthmatiques chroniques, on observe une infiltration des cellules pro-inflammatoires telles que les éosinophiles, les lymphocytes, mastocytes et d'autres ainsi que le détachement des cellules épithéliales des voies aériennes (Fig.9) [51,52].

3.1.3 Classification de la sévérité de l'asthme

L'évaluation de la sévérité de l'asthme est importante pour la gestion de l'asthme et permet une meilleure approche par étapes de la pharmacothérapie. Ainsi depuis 1991, le programme national américain d'éducation et de prévention de l'asthme (NAEPP) a défini un classement

de la sévérité de l'asthme [43]. Le rapport du groupe d'experts a été révisé en 1997 et l'accent a été mis sur l'effet des médicaments sur la gravité de l'asthme. Cette classification prend en compte la limitation de l'activité physique journalière, les symptômes diurnes et nocturnes et le débit expiratoire ou la spirométrie. Un score de 1 à 4 est attribué à chacun des paramètres selon une gravité croissante des symptômes. Le score final est ensuite calculé à partir de la somme des résultats obtenus de chacun des quatre composants. Les sujets ayant reçu un score de 4 sont alors définis comme ayant un asthme léger intermittent, 5-8 comme souffrant d'un asthme persistant léger, 9-12 comme ayant un asthme persistant modéré, et 13 à 16 comme ayant un asthme persistant sévère (Tableau 1) [43].

Tableau 1: Classification de la sévérité de l'asthme (Source NAEPP) [43]

| Clinical features before treatment ⁽¹⁾ | Symptoms ⁽²⁾ | Night-time Symptoms | Lung function |
|---|---|------------------------|---|
| Step 1, mild intermittent | Symptoms \leq 2 times a week Asymptomatic and normal PEF between exacerbations brief (from a few hours to a few days); intensity may vary | \leq 2 times a month | FEV1 or PEF \geq 80% predicted PEF variability < 20% |
| Step 2, mild persistent | Symptoms > 2 times a week but < 1 time a day Exacerbations may affect activity | > 2 times a month | FEV1 or PEF \geq 80% predicted PEF variability 20 to 30% |
| Step 3, moderate persistent | Daily symptoms Daily use of inhaled short-acting b2-agonist Exacerbations affect activity Exacerbations \geq 2 times a week; may last days | > 1 time a week | FEV1 or PEF > 60% to < 80% predicted PEF variability > 30% |
| Step 4, severe persistent | Continual symptoms Limited physical activity Frequent exacerbations | Frequent | FEV1 or PEF \leq 60% predicted PEF variability > 30% |

NAEPP : National Asthma Education and Prevention Program PEF: Peak expiratory flow FEV1: Peak expiratory flow

- (1) : The presence of one of features of severity is sufficient to place a patient in this category. An individual should be assigned to the most severe grade in which any feature occurs. The characteristics noted in this figure are general and may overlap because asthma is highly variable. Furthermore, an individual's classification may change over time.
- (2) : Patients at any level of severity can have mild moderate or severe exacerbations. Some patients with intermittent asthma experience severe and life threatening exacerbations separated by long periods of normal lung function and no symptoms.

3.1.4 Traitement de l'asthme

Il faut distinguer principalement deux types de traitements : un traitement de fond et un traitement de crise. Le traitement de fond permet de contrôler l'asthme quand il est pris quotidiennement sur une longue durée. Il s'agit essentiellement des anti-inflammatoires et plus spécifiquement des corticoïdes inhalés qui sont de plus en plus utilisés pour leur grande efficacité sur l'asthme car agissant contre l'étiologie de l'inflammation [36,53]. Le traitement de la crise est réalisé à l'aide des bronchodilatateurs qui ont une action rapide sur la bronchoconstriction permettant de réduire la dyspnée, les sifflements et la toux. Ils sont essentiellement composés de β 2-agonistes de courte et longue durée et d'anticholinergiques [54,55]. Les antiasthmatiques peuvent être administrés par différentes voies: inhalée, orale et parentérales. La voie inhalée a constitué une innovation majeure dans le traitement de l'asthme. Elle a permis, avec une efficacité et une tolérance optimale, de traiter localement une affection qui nécessitait jusque là le recours à des fortes doses de principe actif par voie générale avec le corollaire d'effets systémiques indésirables. La voie inhalée permet de déposer les particules directement sur les sites d'action : lors de l'inhalation, les particules pénètrent dans les divers étages de l'appareil respiratoire en fonction de leur taille [16]. Cependant selon les dispositifs d'inhalation utilisés, une grande partie des particules est déposée dans l'oropharynx, déglutie, absorbée au niveau gastro-intestinal et métabolisée lors du premier passage hépatique en composés inactifs. Cette dissociation entre action locale et systémique permet d'en limiter les effets secondaires [56]. Les dispositifs d'inhalation utilisés sont les nébuliseurs, les aérosol-doseurs sous pression (MDI en anglais "metered dosed inhaler") et les inhalateurs à poudre (DPI en anglais "dry powder inhaler") que nous détaillerons plus loin dans cette introduction. Leur efficacité dépend de la maîtrise de leur utilisation par les patients. Les voies orales et parentérales sont réservées pour le traitement des formes sévères de l'asthme et des crises nécessitant une prise en charge urgente des patients [57].

3.2 Autres pathologies pulmonaires pour lesquelles la corticothérapie inhalée est utilisée

La corticothérapie inhalée peut constituer un traitement d'appoint souvent utile dans d'autres maladies pulmonaires telles que les bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO) et les infections pulmonaires.

Bronchopneumopathies chroniques obstructives : Comme l'asthme, la BPCO est caractérisée par une inflammation des voies aériennes avec la présence relativement tôt dans le

processus de la maladie de marqueurs d'inflammation comme les neutrophiles, les macrophages, les éosinophiles et les cellules CD4+ et CD8+ [58]. Cliniquement, c'est un terme qui regroupe deux pathologies pulmonaires : la bronchite chronique et l'emphysème. Ces deux maladies sont caractérisées par l'obstruction du flux d'air qui interfère avec la respiration normale et les deux pathologies coexistent fréquemment. Au cours des BPCO, aucun argument objectif ne justifie une corticothérapie au long cours mais en pratique, elle est utilisée dans les formes sévères. Contrairement à l'asthme, le rôle des glucocorticoïdes inhalés (GCI) dans le traitement de la BPCO reste controversé avec des résultats thérapeutiques incohérents [59]. Plusieurs études indiquent que le traitement à long terme avec les GCI n'a pas d'impact appréciable sur les troubles de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de BPCO légère ou modérée. On a plutôt constaté une forte incidence de pneumonie chez ces patients traités uniquement avec les GCI [60,61]. Le traitement par les GCI aurait tout de même quelques avantages cliniques, en particulier chez les patients présentant des formes graves de la maladie en termes d'améliorations de la qualité de vie et des fonctions pulmonaires [61,62]. Ces améliorations cliniques sont plus significatives chez les patients traités avec une bithérapie GCI/LABA (β 2-agonistes à longue durée d'action) [63,64]. Par conséquent, les directives internationales recommandent beaucoup plus la bithérapie GCI/LABA comme protocole actuel de traitement des BPCO et proscrivent les GCI en monothérapie [65]. Par ailleurs, certains patients atteints de BPCO plus grave, peuvent nécessiter l'utilisation de glucocorticoïdes oraux. Ces patients doivent alors être surveillés contre le développement de l'ostéoporose. Une prophylaxie de l'ostéoporose devant être envisagée chez les patients nécessitant plusieurs courtes rafales de haute dose de glucocorticoïdes oraux [66].

Les pathologies infectieuses : Dans la tuberculose, la place des corticoïdes se limite actuellement dans les adénopathies compressives au cours de la primo-infection tuberculeuse et dans les miliaries tuberculeuses dyspnéisantes [67]. Dans les autres pneumopathies infectieuses, virales ou bactériennes, la corticothérapie est indiquée en cas de tableaux sévères avec un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Enfin, dans la pneumocystose compliquant le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA), la corticothérapie est utilisée dans les formes sévères avec risque de détresse respiratoire aiguë [68].

4. Administration des corticoïdes par voie pulmonaire

4.1 Propriétés pharmacologiques des corticoïdes inhalés

Les glucocorticoïdes sont une famille d'anti-inflammatoires stéroïdiens (AIS) issus des glucocorticoïdes naturels : cortisone et hydrocortisone. Ils sont utilisés pour traiter de très nombreuses maladies allergiques, immunologiques ou cancéreuses [69]. Néanmoins, la grande majorité des patients recevant ces médicaments sont traités pour des maladies pulmonaires ou rhumatologiques. Leur utilisation par les voies orale et parentérales a fait apparaître de nombreux effets indésirables systémiques surtout en cas de traitement à long terme et à forte dose [70]. Pour pallier à cet inconvénient majeur, deux options ont été développées. D'une part, les doses thérapeutiques ont été réduites en ciblant par vectorisation les sites d'action et d'autre part, le traitement a été limité à l'administration locale des corticoïdes notamment par l'inhalation pour les pathologies pulmonaires et par la voie intrarticulaire pour les pathologies rhumatismales. Ces deux mesures ont fortement contribué à réduire les effets indésirables des glucocorticoïdes. L'administration pulmonaire des corticoïdes pour le confort et les nombreux avantages qu'elle apporte aux patients, a été une innovation importante dans le traitement des pathologies inflammatoires pulmonaires et plus particulièrement pour le traitement de l'asthme. En effet, les corticoïdes inhalés exercent leurs effets anti-inflammatoires sur les voies respiratoires en réduisant l'hyperréactivité bronchique, la réactivité à l'histamine, aux agonistes cholinergiques et aux allergènes [71]. Des biopsies post traitement de l'épithélium bronchique d'asthmatiques, ont permis de mettre en évidence une inversion de la desquamation des cellules épithéliales ainsi que de l'hyperplasie des cellules caliciformes [72]. La corticothérapie réduit de façon similaire, la réactivité pulmonaire exercée par l'air froid, la bradykinine, l'adénosine et les produits chimiques irritants tels que le dioxyde de soufre et les métabisulfites. Les voies aériennes deviennent donc moins sensibles aux spasmogènes [73]. Toutefois, les corticoïdes inhalés ne peuvent rien contre les déformations structurelles persistantes des voies respiratoires. Une étude rétrospective portant sur le suivi des malades asthmatiques a permis de montrer une nette amélioration des signes cliniques chez les patients sous beclométhasone dipropionate inhalé que chez les patients pour lesquels un glucocorticoïde inhalé n'a pas été prescrit [74]. Les principaux corticoïdes utilisés par voie pulmonaires ont été répertoriés dans le tableau 2.

4.2 Propriétés pharmacocinétiques des corticoïdes inhalés

Les propriétés pharmacocinétiques des glucocorticoïdes inhalés (GCI) influencent fortement leurs performances thérapeutiques. Elles dépendent de plusieurs paramètres ayant des interactions entre eux. Ce sont la lipophilie, la conjugaison lipidique, la liaison protéique, l'affinité aux récepteurs, la biodisponibilité orale et le temps de demi-vie (Tableau 2). La lipophilie d'un PA est une propriété physicochimique intrinsèque de la molécule qui lui permet de traverser plus aisément les membranes cellulaires. Ce qui a pour conséquence de conduire à une large distribution des GCI dans le tissu pulmonaire créant ainsi un grand volume de distribution avec des effets thérapeutiques prolongés. Les GCI les plus lipophiles sont le dipropionate de beclométhasone (4,9), son métabolite actif le monopropionate de beclométhasone (4,3) et le propionate de fluticasone (4,5) (tableau 2) [75]. Ils peuvent également se lier de façon non spécifique aux lipides et aux protéines dans les poumons. La conjugaison des lipides est un autre paramètre important pour évaluer la pharmacocinétique des GCI. Ceux ayant un groupe hydroxyle en position C-21 peuvent former des liaisons esters réversibles avec des acides gras dans les poumons [76,77]. C'est le cas du budésonide, du flunisolide et de la forme active du ciclésone : le désisobutyryl-ciclésone. Les conjugués lipidiques constituent des formes inactives, ils sont maintenus dans les poumons. Ils y constituent un stock-réservoir et libèrent progressivement les PA avant d'être absorbés. Les conjugués lipidiques ne pouvant être directement absorbés dans la circulation sanguine [76,77]. Toutefois, bien que la formation des conjugués lipidiques soit bénéfique sur le plan thérapeutique, seul un faible pourcentage de la dose administrée (5% à 10%) subit cette conjugaison [75]. La majeure partie des médicaments étant plutôt sous forme libre. Il est important de faire la distinction entre la conjugaison lipidique et le caractère lipophile d'un PA. La conjugaison lipidique est une véritable liaison chimique formée entre le PA et un lipide présent dans les poumons produisant un ester. Cette liaison ester est réversible et peut par la suite être hydrolysée par des enzymes pour libérer le PA sous forme libre et active [75]. Des études suggèrent même que la conjugaison lipidique des corticoïdes est une réaction très spécifique aux poumons et qu'elle semble ne se produire que de façon limitée dans les autres tissus de l'organisme. Contrairement à la conjugaison lipidique, la liaison aux protéines n'est pas une véritable réaction chimique mais plutôt une simple force d'attraction physique du PA à la surface des protéines. Elle est facilement réversible et constitue une forme également inactive pharmacologiquement. Le GCI idéal doit posséder une forte liaison protéique de sorte à limiter les interactions avec les récepteurs systémiques pouvant conduire à des effets

indésirables systémiques [78,79]. La plupart des GCI présentent des taux de liaison protéique élevés et très proches (71 à 99%) (Tableau 2). L'acétonide de triamcinolone a le taux le plus faible (71%) et les plus forts taux se retrouvent chez le fuorate de mometasone, le ciclésone et son métabolite actif (98 à 99%). En raison de leur fort taux de liaison aux protéines, moins de 1% des PAs sont disponibles dans la circulation systémique avec des effets systémiques indésirables réduits [80,81]. Pour exercer leurs activités pharmacologiques, les GCI doivent se fixer de façon préférentielle à leurs récepteurs. L'affinité des corticoïdes aux récepteurs est déterminée par rapport à celle de la molécule de référence qui est la dexaméthasone dont l'affinité est fixée à 100 [78,79]. Les récepteurs des corticostéroïdes sont intracellulaires donc pour agir les GCI doivent diffuser à travers les membranes cellulaires des voies respiratoires. Tout GCI qui interagit avec les récepteurs peut engendrer des effets bénéfiques et/ou des effets indésirables. L'idéal serait donc de maximiser la dose de GCI au niveau des récepteurs pulmonaires tout en minimisant l'absorption systémique afin de réduire les effets indésirables systémiques. En fonction des performances aérodynamiques des formulations et des dispositifs d'inhalation, la proportion de médicament atteignant les voies respiratoires basses peut varier généralement entre 10 et 60% de la dose émise. La fraction restante étant déglutie et absorbée par la voie digestive. La dose ingérée subit très souvent une inactivation lors du premier passage hépatique et seule une faible partie arrive à atteindre la circulation systémique. Une partie de cette fraction orale atteint finalement les poumons et y exerce une activité pharmacologique au même titre que la partie inhalée [78,82,83]. La biodisponibilité orale varie en fonction du degré d'inactivation du premier passage hépatique qui diffère d'un corticoïde à l'autre. Le dipropionate et le monopropionate de béclo méthasone ainsi que l'acétonide de triamcinolone présentent des biodisponibilités orales élevées (15 à 25%), tandis que le propionate de fluticasone, le ciclésone, le désisobutiryl-ciclésone et le fuorate de mometasone ont de très faibles biodisponibilités orales (<1) (Tableau 2). Il importe de préciser que la biodisponibilité systémique totale d'un médicament inhalé est la somme des biodisponibilités pulmonaire et orale. Lorsque le taux de délivrance pulmonaire augmente, cela réduit automatiquement la fraction déglutie avec une diminution biodisponibilité orale. Après inhalation, le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) des GCI n'est plus contrôlé par la vitesse d'élimination par le foie mais plutôt par sa vitesse d'absorption pulmonaire. Il est donc possible qu'il y ait une différence significative entre les $t_{1/2}$ d'un corticoïde administré par inhalation et par voie intraveineuse. Cela prouve bien que le corticoïde est stocké dans le tissu pulmonaire et qu'il diffuse progressivement dans la circulation systémique. C'est le cas du propionate de fluticasone dont les $t_{1/2}$ sont d'environ 8 h pour la voie intraveineuse et de 14 h pour la voie

inhalée (Tableau 2) [84,85]. Toutefois l'accumulation d'un GCI dans les poumons n'est pas toujours liée à son $t_{1/2}$, elle pourrait également être fonction de la dose inhalée. Afin de réduire les événements systémiques indésirables, les GCI doivent être éliminés de la circulation systémique le plus rapidement possible. L'élimination des GCI s'effectue généralement par le foie [82,86].

Tableau 2 : Propriétés physicochimiques et pharmacocinétiques des corticoïdes inhalés [36,75]

| Inhaled corticoids | Relative lipophilicity | Water solubility at 37°C (µg/mL) | Relative receptor affinity | Half-life time (h) | Protein binding (%) | Oral bioavailability (%) |
|--|------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------|---------------------|--------------------------|
| Beclomethasone dipropionate (BDP) | 4.9 | < 1 | 53 | 0.1-0.2 | 87 | 15 |
| Beclomethasone monopropionate (17 BMP) | 4.3 | 15.5 | 1345 | 2.7 | NA | NA |
| Budesonide (BUD) | 3.6 | 16 | 935 | 2.8-2 | 88 | 11 |
| Ciclesonide (CIC) | NA | < 1 | 12 | 0.36 | 99 | < 1 |
| Desisobutyryl-Ciclesonide (des-CIC) | NA | 7 | NA | 3.6-5.1 | 99 | < 1 |
| Flunisolide (FLU) | 3.4 | 140 | 180 | 1.6-1-2 | 80 | 7 |
| Fluticasone propionate (FP) | 4.5 | NA | 1800 | 7.8-14.4 | 90 | < 1 |
| Mometasone furoate (MF) | NA | < 1 | 2200 | 2.0-4.5 | 98-99 | < 1 |
| Triamcinolone acetonide (TAA) | 3.4 | 21 | 233 | 2.0 | 71 | 23 |

4.3 Mécanismes d'action des corticostéroïdes inhalés

Les mécanismes d'action des glucocorticoïdes inhalés dans l'asthme sont complexes. Les corticoïdes exercent leurs effets en se liant à des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) présents dans le cytoplasme (Fig. 10) [87]. Ces récepteurs possèdent plusieurs domaines fonctionnels dont un domaine de liaison au ligand, un domaine de liaison à l'ADN et deux domaines impliqués dans la transactivation de gènes une fois que la liaison avec l'ADN a eu lieu, en association avec d'autres protéines telles que les protéines de fonction d'activation (AF) 1 et 2 [54]. Le GR inactif est lié à un complexe protéique incluant deux sous-unités de heat shock protein 90 (hsp 90) qui agissent comme un chaperon en empêchant le récepteur d'aller au noyau [88]. Quand un ligand se lie à un GR, hsp 90 se dissocie, ce qui permet au complexe GR-corticoïde activé de se transloquer au noyau et de se lier en duplex à des séquences spécifiques d'ADN pour interagir avec des complexes coactivateurs [46].

Les corticoïdes peuvent également supprimer l'inflammation en augmentant l'expression de protéines anti-inflammatoires telles que l'annexine 1, l'interleukine 10 (IL-10) ou l'inhibiteur du facteur nucléaire kappa B (NF- κ B), I- κ B.

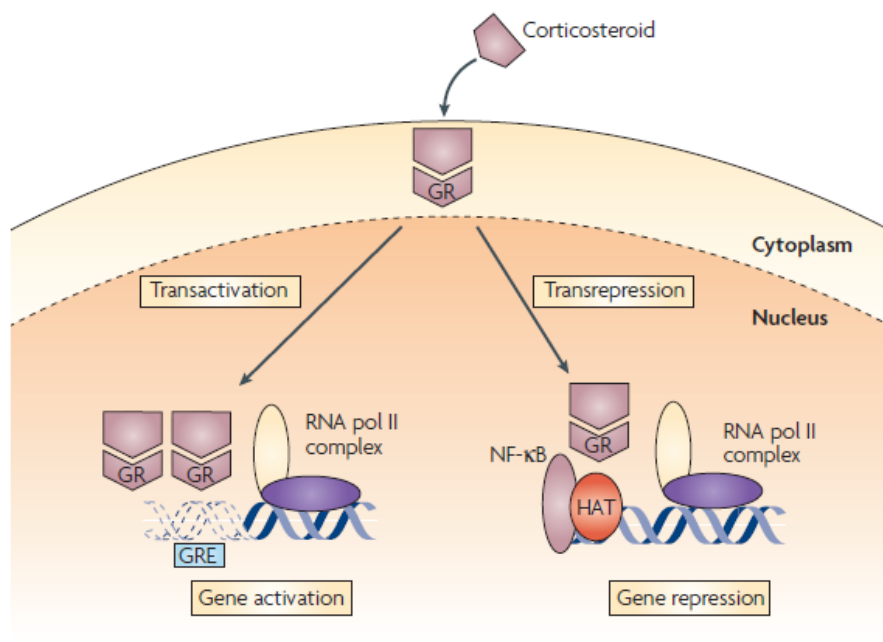


Fig. 10: Mécanismes d'action anti-inflammatoire des corticostéroïdes [54]

Ils sont également capables d'augmenter la transcription de gènes en passant par un remodelage de la chromatine et un recrutement de l'ARN polymérase II au site de désenroulement de l'ADN [54]. La répression des gènes de l'inflammation et de l'immunité est une action importante des corticoïdes. Cette action passe par des interactions complexes de type protéine-protéine entre le GR activé et des facteurs de transcription tels que NF- κ B et *activator protein-1* (AP-1) qui sont pro-inflammatoires parce qu'ils servent d'intermédiaires dans l'expression de nombreux gènes de l'inflammation. Les corticoïdes sont également capables de réprimer l'action de protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) telles que l'*extracellular regulated kinase* (ERK), MAPK p38 et *c-jun N-terminal kinase* (JNK) (Fig. 10) [89].

4.4 Effets indésirables des corticoïdes inhalés

Comparativement aux voies systémiques, les corticoïdes inhalés sont mieux tolérés par les patients [36,53]. Toutefois quelques effets indésirables locaux et systémiques sont à noter [56,90]. Leur intensité dépend de la dose inhalée, de la fréquence d'administration et de l'inhalateur utilisé [36]. Lors de l'inhalation, une partie des particules s'impacte dans l'oropharynx puis est déglutée et absorbée par la muqueuse gastro-intestinale. L'utilisation d'une chambre d'inhalation réduit notablement le dépôt dans l'oropharynx étant donné que les grosses particules sont retenues dans la chambre d'inhalation [91,92]. Cela a pour conséquence de réduire les effets indésirables locaux et systémiques. Il faut noter toutefois que les chambres d'inhalation permettant d'améliorer le dépôt pulmonaire du médicament avec comme corolaire, la possibilité d'une absorption plus élevée dans la circulation systémique et également l'apparition d'effets indésirables systémiques [84]. Les effets indésirables locaux généralement observés sont la dysphonie, les candidoses oropharyngées, la toux et l'irritation de la gorge. [93,94]. Il est donc conseillé aux patients utilisant des inhalateurs de poudre de bien se rincer la bouche après chaque utilisation afin de réduire au maximum ces effets indésirables locaux de même que la fraction de corticoïdes déglutée [95]. Les effets indésirables systémiques observés avec les corticoïdes inhalés sont de plusieurs types. La beclométhasone et le budésonide, administrés à dose élevée par inhalation, modifient la fonction hypothalamus-hypophyso-surrénalienne par la réduction de la sécrétion de cortisol par les glandes surrénales de la corticotropine [96,97]. L'apparition d'ecchymoses est plus fréquente chez les personnes âgées que chez les enfants. Enfin quelques cas de cataracte ont été rapportés chez les patients sous traitement avec les corticoïdes inhalés [53]. Aucun effet métabolique cliniquement important n'a été signalé.

4.5 Corticorésistance asthmatique

Bien que les corticostéroïdes soient reconnus comme efficaces dans le traitement de l'asthme, il existe une proportion d'asthmatiques qui répondent mal à ces molécules. Dans l'asthme, la résistance aux corticoïdes a d'abord été rapportée chez un groupe de patients asthmatiques porteurs d'un asthme mal contrôlé qui présentaient indiscutablement une réponse aux β -agonistes inhalés et pourtant pas de réponse à de fortes doses de corticoïdes oraux. Il n'existait pas chez ces patients de suppression de l'éosinophilie sanguine mais ils développaient des effets secondaires du type cushingoïde (hyperfonctionnement des glandes surrénales). Toutefois, la définition objective de la corticorésistance asthmatique repose sur l'absence de modification du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) mesuré au cours d'une cure de corticoïdes oraux (habituellement, 14 jours à 40 mg/jour d'équivalent prednisolone). Les patients dont l'amélioration du VEMS reste inférieure à 15 % de la valeur de base sont classés comme résistants aux corticoïdes tandis que ceux chez qui le VEMS augmente de 30 % ou plus par rapport à la valeur de départ sont considérés comme sensibles aux corticoïdes [96,98].

4.6 Implications thérapeutiques de la corticorésistance

De récentes études menées sur la corticorésistance asthmatique indiquent qu'il existe plus d'un mécanisme pour l'expliquer. En fait, il est très possible que plusieurs mécanismes puissent contribuer, au niveau moléculaire, à la corticorésistance chez un même malade. La connaissance de ces différents mécanismes permettrait d'orienter vers de nouveaux anti-inflammatoires plus spécifiques. En effet, récemment, un anticorps anti-IgE s'est montré capable de réduire la dose de maintenance des corticoïdes inhalés dans l'asthme sévère [52]. Là encore, on ignore si cela passe par une augmentation de la réponse aux corticoïdes, bien que cet agent soit clairement un anti-inflammatoire. Parmi les stratégies actuelles de développement de nouveaux traitements dans l'asthme, il convient de mentionner les agents inhibant des cytokines spécifiques, puisqu'une partie pourrait être appropriée dans le traitement de l'asthme corticorésistant [50]. Le fait que, d'une part, le mélange IL-2-IL-4 ou que l'IL-13 puissent reproduire *in vitro* la résistance aux corticoïdes et que, d'autre part, ces cytokines soient surexprimées dans l'asthme plaident en faveur de leur rôle important. Un récepteur à IL-4 soluble humain recombinant, capable de se lier et de séquestrer l'IL-4 (agissant donc comme un antagoniste), a montré quelques effets bénéfiques dans l'asthme modéré. Un anticorps bloquant à l'IL-2 est en stade d'essai clinique. Il est toutefois probable qu'une suppression combinée des

effets de l'IL-2 et de l'IL-4 soit nécessaire dans le traitement de l'asthme corticorésistant. Pour antagoniser l'IL-13, il faudrait parvenir à administrer des récepteurs solubles à l'IL-13, des anticorps monoclonaux anti-IL-13 et des anticorps antirécepteurs [54,99].

5. Dispositifs d'inhalation

L'administration des médicaments par inhalation date de plus de 4000 ans et trouve son origine en Inde et au Moyen-Orient. En 1950, les corticostéroïdes ont été administrés pour la première fois par nébulisation en vue d'une action locale pulmonaire. Dans la deuxième moitié du XXe siècle, la technologie des inhalateurs s'est développée autour de trois systèmes différents: les nébuliseurs, les aérosols doseurs liquides et les aérosols doseurs de poudre sèche que nous présenterons dans la suite de cette introduction.

5.1. Nébuliseurs

Le principe de la nébulisation est la conversion d'une solution en une suspension de particules de taille appropriée au dépôt pulmonaire et chargée en substances actives. L'âge du patient, la facilité d'utilisation, la durée de nébulisation, le débit de sortie, la taille des particules, la dose émise et les possibilités d'entretien constituent les critères de choix d'un nébuliseur. Il existe en trois types : les nébuliseurs pneumatiques, les nébuliseurs ultrasoniques et les nébuliseurs à tamis.

5.1.1 Nébuliseurs pneumatiques

Ce sont les modèles les plus anciens dont le fonctionnement est basé sur un flux de gaz comprimé qui est accéléré par une buse et qui crée une dépression à l'orifice du nébuliseur provoquant l'aspiration d'une fine couche de solution contenue dans le réservoir et génère des gouttelettes (Fig. 11) [100].

5.1.2 Nébuliseurs ultrasoniques

Le fonctionnement de ce type de nébuliseurs est basé sur un cœur en quartz piézoélectrique. Quand on lui applique une décharge électrique oscillante, le quartz crée des vibrations qui permettent l'aérosolisation (Fig. 12). Le temps de nébulisation est plus réduit mais globalement la taille des gouttelettes produites est supérieure à celles des nébuliseurs pneumatiques. De plus, les suspensions et les solutions très visqueuses ou avec une grande tension de surface ne peuvent être administrées par ce type de nébuliseur [101].

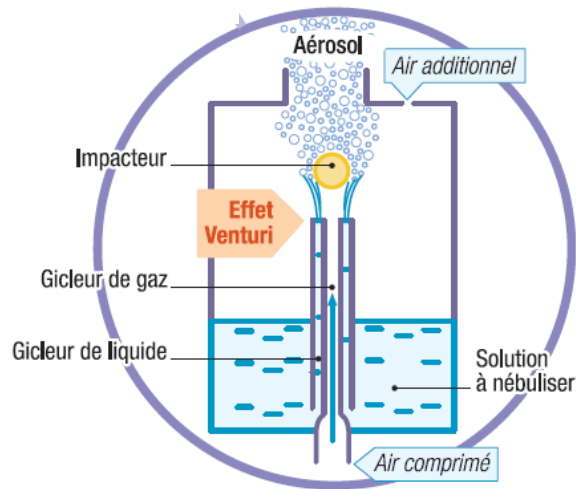


Fig. 11: Nébuliseur pneumatique [102]

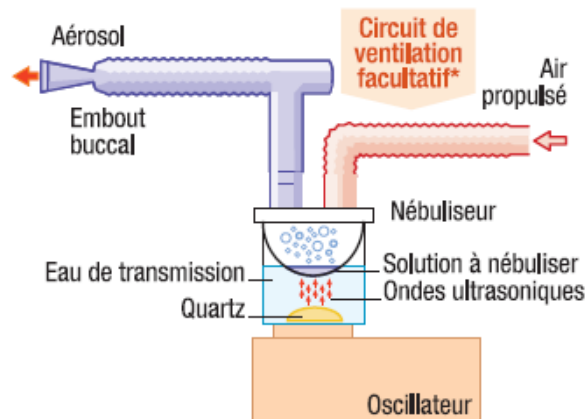


Fig. 12 : Nébuliseur ultrasonique [103]

5.1.3 Nébuliseurs à tamis

Ils sont de conception plus récente que les deux autres types de nébuliseurs. Deux catégories de nébuliseurs à tamis existent : les nébuliseurs à tamis statique et à tamis vibrant (Fig. 13). Les tamis sont des membranes percées d'un millier d'orifices microscopiques. Le diamètre des orifices détermine le débit médicamenteux et la taille des gouttelettes générées. Les nébuliseurs à tamis statique consistent à pousser la solution médicamenteuse à travers la membrane par mise en vibration de la solution médicamenteuse, générée par un quartz piézo-électrique. Les gouttelettes produites sont alors inhalées par le patient. Tandis que la technologie à membrane vibrante repose sur la vibration de la membrane associée à un quartz. L'aérosol est produit par micro-aspiration de la solution médicamenteuse placée au contact direct de la membrane

animée de mouvements oscillants. Les appareils utilisant cette technologie offrent une meilleure homogénéité dans la dispersion de l'aérosol.

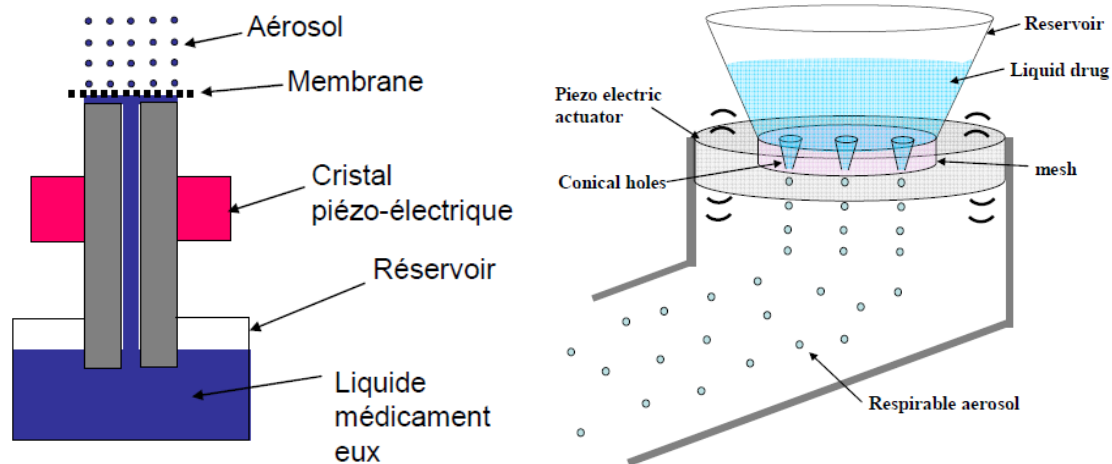


Fig. 13: Nébuliseurs à tamis statique (gauche) et à tamis vibrant (droite) [104]

Ils sont portables, silencieux vu l'absence de compresseur, fonctionnent sur batterie et le temps de nébulisation est plus court, ce qui contribue à une meilleure compliance au traitement [105]. Les principaux inconvénients sont le coût prohibitif, la fragilité des appareils qui pose un problème en termes de maintenance et de désinfection, et la masse médicamenteuse résiduelle élevée. Les nébuliseurs sont en général, des dispositifs adaptés aux personnes physiquement affaiblies car ils ne nécessitent ni coordination des mouvements respiratoires ni force inspiratoire importante. Cependant, ils présentent quelques inconvénients : les appareillages nécessitent une source d'énergie ; lors du processus de nébulisation, seuls 10% de la dose initiale est délivrée ; l'aérosolisation se produit à la fois lors de l'expiration et de l'inspiration : une partie de l'aérosol est donc expulsée dans l'environnement lors de l'expiration. De plus ces systèmes sont encombrants et donc difficilement déplaçables. Le dépôt pulmonaire optimal est obtenu grâce à l'utilisation d'un embout buccal ou d'un masque nasobuccal qui est parfois jugé plus confortable par certains malades. Des dispositifs miniaturisés sont actuellement en cours d'évaluation [106].

5.2 Inhalateurs doseurs de liquide

Entre la Première et la Seconde Guerre mondiale, l'évolution des propulseurs de chlorofluorocarbones (CFC) pour des objectifs militaires, a permis le développement d'inhalateurs doseurs pressurisés (pMDI pour l'anglais "pressurized metered dose inhaler") à des fins thérapeutiques. Les pMDI sont les dispositifs d'inhalation les plus utilisés par les

patients. Par la suite les CFC ont été remplacés par les hydrofluoroalcanes (HFA) moins écotoxiques. Et tout récemment, de nouveaux dispositifs ont été développés pour s'affranchir de l'utilisation des gaz propulseurs. Ce sont les aérosols doseurs mécaniques, électrohydrodynamiques et thermiques.

5.2.1 Inhalateurs doseurs de liquide pressurisés

Les aérosols doseurs de liquide pressurisés fonctionnent à l'aide d'un gaz propulseur liquéfié. En effet, les inhalateurs doseurs pressurisés ou aérosols doseurs de liquides sont des dispositifs multidoses qui délivrent une quantité déterminée de principe actif à partir d'une suspension ou d'une solution dans un gaz propulseur sous haute pression (Fig. 14). Actuellement les gaz propulseurs utilisés sont les hydrofluoroalcanes (HFA 227 et HFA 134a) en remplacement des chlorofluorocarbones (CFC) qui se sont révélés toxiques pour la couche d'ozone selon le protocole de Montréal de 1989 [107]. Ils sont peu onéreux, permettent la délivrance de doses reproductibles et leur contamination reste limitée.



Fig. 14 : Inhalateur doseur pressurisé (*Medihaler*[®]) [108]

Toutefois, ils présentent certains inconvénients : ils requièrent notamment une synchronisation entre le mouvement inspiratoire et la délivrance de la dose. La règle est d'appuyer sur le déclencheur de l'aérosol une seconde environ après avoir commencé à inspirer. La grande vitesse de projection de l'aérosol à la sortie du dispositif entraîne un impact d'environ 50% des particules du médicament inhalé au niveau de l'oropharynx [90]. Les chambres d'inhalation permettent de s'affranchir de cette "coordination main-poumons". Elles permettent une

augmentation de la distance parcourue par les particules entre l'inhalateur et la bouche. Ce qui permet de réduire la vitesse des particules avec pour conséquence, la diminution des dépôts particulaires au niveau oropharyngé. L'utilisation d'une chambre d'inhalation permet également de retenir les grosses particules dans la chambre réduisant ainsi les risques de candidoses oropharyngées liées à l'inhalation des corticostéroïdes. Malgré ces avantages, les chambres d'inhalation ne permettent pas d'augmenter la fraction respirable des aérosols. En effet l'impaction et la sédimentation se produisant dans la chambre d'inhalation conduisent à d'importantes pertes en particules. De même, l'attraction électrostatique qui survient lorsque la chambre d'inhalation est en plastique (ex : Aerochamber), conduit également à des pertes en particules [91,95].

5.2.2 Les aérosols doseurs mécaniques

Ce sont des dispositifs qui utilisent une force mécanique pour propulser le liquide à travers de fins capillaires (Fig. 15).

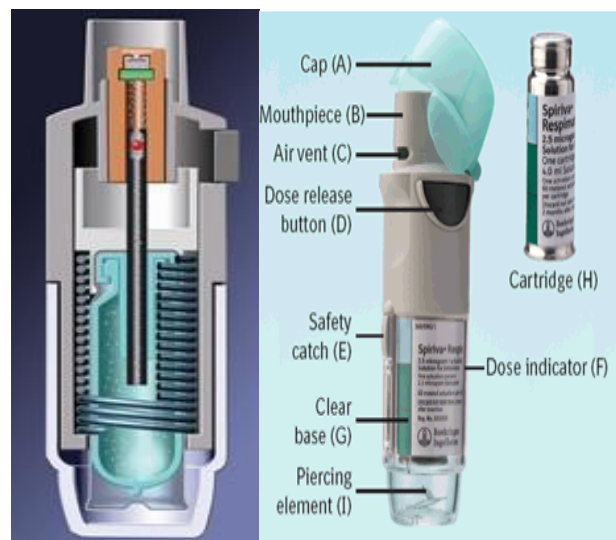


Fig. 15: Inhalateurs doseurs mécaniques (Respimat®) [109]

L'aérosol produit est composé de deux jets en collision qui permettent de réduire la vitesse des particules en comparaison des pMDI [110] et d'obtenir une fraction plus importante de fines particules [109]. Cette diminution de la vitesse des particules a pour conséquence une augmentation de la durée de la génération de l'aérosol permettant d'avoir un meilleur dépôt d'aérosols dans les poumons avec 52 % de fraction de particules fines (FPF) pour le budésonide [109] et 39 % de FPF pour le Fénotérol [111]. Certaines versions de ce type d'inhalateurs génèrent des volumes d'aérosols plus importants, d'environ 50 μ L avec des tailles

de gouttelettes de 2 μm en moyenne et permettent d'avoir des dépôts pulmonaires de 50 % chez les sujets sains [112] et jusqu'à 80 % chez les sujets asthmatiques [113].

5.2.3 Inhalateurs doseurs électrohydrodynamiques

Ce système utilise le passage du liquide dans un petit orifice auquel est appliqué un champ électrique pour aérosoliser le liquide. L'aérosol électriquement chargé est ensuite déchargé avant d'être inhalé par le patient. Les gouttelettes produites sont monodisperses [114,115] et avec des tailles variant de 1 à 5 μm . Ces tailles sont modulables par ajustement d'un certain nombre de paramètres tels que les propriétés physicochimiques de la solution médicamenteuse et le champ électrique. Le dépôt pulmonaire de l'aérosol produit, avoisine 80 % [116,117]. La limitation de cette technique semble résider dans le fait qu'elle ne permet pas de générer des aérosols à partir de tous les types de solutions.

5.2.4 Inhalateurs doseurs thermiques

Ce sont des dispositifs innovants dont le principe de fonctionnement est basé sur l'élévation rapide de la température pour produire l'aérosol. La surface d'un cylindre de quelques mm de diamètre est enduite du médicament puis est soumise à une forte élévation de température (350 °C) en un temps de l'ordre de 0,5 s [118]. Cet aérosol vaporisé très rapidement, est instantanément inhalé par le patient. 90 à 99% de la solution enduite sur le cylindre est transformé en aérosol d'une taille de 1 à 2,5 μm . C'est un dispositif à usage unique et auto-déclenché utilisé pour l'administration de médicaments à visée systémique [118,119]. La limitation de ce type d'inhalateurs thermiques réside dans le fait qu'ils ne soient pas adaptés aux substances thermolabiles car l'élévation importante de la température pourrait dégrader certaines molécules comme les protéines ou les peptides [120].

5.3 Inhalateurs à poudre sèche

Pour résoudre les difficultés d'utilisation des inhalateurs doseurs pressurisés, la possibilité de dispersion des poudres sèches a été explorée et a conduit en 1971, à la commercialisation du premier inhalateur à poudre sèche dénommé *Spinhaler*[®] [121]. Leur principe est le suivant : il s'agit de disperser des particules de poudre sèche en aérosol directement dans le flux d'air inspiratoire du malade. Les inhalateurs à poudre sèche ne nécessitent donc pas de gaz propulseur. Ils sont constitués de plusieurs types : les dispositifs unidoses (*Sphinhaler*[®],

Aerolizer[®]), les dispositifs multidoses encore appelés réservoirs (Turbohaler[®], Easyhaler[®]) [122,123] et les dispositifs à doses unitaires multiples (Diskus[®]) (Fig. 16, Tableau 3).



Fig. 16 : Principaux inhalateurs à poudre sèche : Sphinghaler[®], Turbohaler[®], Aerolizer[®], Handihaler, Diskus[®] et Easyhaler[®]

Les aérosols à poudre sèche permettent une meilleure stabilité des substances actives car celles-ci sont à l'état solide et une administration de fractions respirables plus importantes par l'inspiration comparativement à la nébulisation. Ce système s'affranchit du problème de la "coordination main-poumon" mais la quantité de médicament délivrée peut dans certain cas dépendre du flux inspiratoire du malade et le débit inspiratoire de pointe requis varie de 30 à 60L/min [124]. Le bon usage des dispositifs d'inhalation permet d'assurer le meilleur dépôt pulmonaire possible et donc l'efficacité thérapeutique optimale. Le choix du dispositif est essentiel, c'est le critère de choix qui conditionne l'efficacité du traitement et donc le contrôle de l'asthme ainsi que de l'adhésion au traitement. Le choix du dispositif est fonction de l'âge des patients, de la substance active à administrer et de l'adhérence au dispositif par le malade [125]. Afin d'améliorer l'adhérence du malade au traitement, il convient d'utiliser les même types de dispositifs pour les traitements de fond et les traitements de la crise. L'apprentissage de l'autogestion du traitement par le malade nécessite un suivi régulier. Des études ont démontré que 50 à 80% des asthmatiques n'utilisaient pas de manière adéquate leur inhalateur.

Tableau 3 : Différents dispositifs utilisés pour l'administration de corticostéroïdes par voie inhalée

| Inhaled Corticosteroids | Pressurized metered dose inhaler (pMDI) | Dry powder inhaler (DPI) | References |
|---|---|--|---------------|
| Beclomethasone dipropionate (BDP) | BDP - HFA (Qvar®) | None | [121,126] |
| Beclomethasone diprop (BDP)/ Formoterol fumarate (FM) | BDP - HFA | BDP - DPI | [127,128] |
| Fluticasone propionate (FP) | FP - HFA (Flutide® Air) | FP - DPI (Flutide® Diskus, Flutide® Diskhaler) | [129–133] |
| Fluticasone propionate (FP) / Salmeterol xinaloate (SM) | FP/SM HFA (Adoair® aerosol) | FP/SM DPI (Adoair® Diskus) | [133,134] |
| Fluticasone propionate (FP) / Formoterol fumarate (FM) | FP/FM (Flutiform®) | FP/FM DPI | [135–138] |
| Budesonide (BUD) | None | BUD - DPI (Pulmicort® Tubuhaler) | [123,139,140] |
| Budesonide (BUD) Formoterol (FM) | None | BUD/FM (Symbicort® Turbuhaler) | [141–144] |
| Ciclesonide (CIC) | CIC - HFA (Alvesco®) | None | [145–147] |
| Mometasone furoate (MF) | None | MF - DPI (Asmanex® Twisthaler) | [148,149] |
| Fluticasone furate (FF) / Vilanterol trifenalate (VI) | None | FF/VI - DPI (Relvar® Ellipta) | [150,151] |

6. Formulation des médicaments inhalés

6.1 Aérosols doseurs pressurisés

Ce sont des préparations liquides comportant un gaz propulseur liquéfié dans lequel sont dispersées les substances actives sous forme de solution ou de suspension. Leur formulation est complexe et les gaz propulseurs utilisés doivent être inertes et posséder des constantes diélectriques très basses. Les gaz les plus utilisés actuellement sont les hydrofluoroalcanes (HFA 227 et HFA 134a) en remplacement des chlorofluorocarbones (CFC) depuis 1989 suite au protocole de Montréal pour des raisons de toxicité vis-à-vis de la couche d'ozone. Les HFA se présentent sous forme liquide, inerte et non toxique notamment pour l'environnement [152]. Ils ont une température d'évaporation et une constante diélectrique basses ainsi qu'une pression de vapeur élevée (Tableau 4). Les propriétés physicochimiques des CFC et des HFA sont différentes, ce qui explique que les formulations contenant les CFC ne soient pas transposables à celles à base des HFA. D'où la nécessité de reformuler toutes les préparations à base de CFC car les HFA solubilisent difficilement les tensioactifs utilisés pour stabiliser les particules. Les matériaux de conditionnement utilisés doivent également être inertes ou avoir très peu d'interactions avec la formulation [153–155].

Tableau 4: Principales propriétés physiques des hydrofluoroalcanes [12]

| | HFA 227 | HFA 134a |
|---|--------------------------------------|------------------------------------|
| Nom chimique | 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropane | 1,1,1,2-tetrafluoroethane |
| Formule chimique | CF ₃ -CFH-CF ₃ | CF ₃ -CH ₂ F |
| Température d'ébullition (°C) | -16,5 | -26,3 |
| Pression de vapeur (10 ³ mm Hg à 25°C) | 3,90 | 5,72 |
| Constante diélectrique (25°C) | 4,1 | 9,8 |
| Densité du liquide (kg/m ³) | 1408 | 1226 |
| Solubilité à l'eau (g/kg à 25°C) | 0,61 | 2,20 |
| Solubilité à l'éthanol (25°C) | Miscible | Miscible |

6.1.1 Formulation des suspensions pour aérosols pressurisés

Dans la formulation des suspensions, le paramètre le plus important à maîtriser est la stabilité des particules en suspension car l'uniformité de la teneur en substances actives délivrée à chaque

inhalation en dépend. En outre, l'inhomogénéité de la dose d'aérosol délivrée pourrait au cours du traitement, modifier la composition initiale en substances actives de la préparation contenue dans le réservoir. Le volume de la chambre de dosage est très faible (50 μ L), il est donc important que la formulation soit bien homogène afin de délivrer au patient des doses thérapeutiques uniformes. D'où la nécessité de toujours bien homogénéiser les suspensions par agitation avant toute inhalation. La loi de Stokes (Eq. 3) définit les paramètres à maîtriser pour stabiliser les suspensions. La faible constante diélectrique du gaz propulseur permet de réduire la force exercée par celui-ci sur les particules en suspension. La formulation pour être plus stable, doit en outre modifier la densité du couple gaz-particules ou diminuer la taille des particules afin de réduire leur vitesse de sédimentation dans la préparation. Il est également possible d'utiliser des tensioactifs pour réduire les tensions de surface entre les particules et le HFA. L'acide oléique a longtemps été utilisé dans les formulations contenant les CFC mais il est moins soluble dans les HFA et donc nécessite l'ajout de co-solvants afin de mieux stabiliser les nouvelles formulations à HFA. Par ailleurs d'autres tensioactifs plus solubles dans les HFA peuvent être également être utilisés. Ce sont le polyéthylène glycol (PEG), le polyvinylpyrrolidone (PVP) et l'acide carboxylique fluoré. Enfin, l'énergie de surface des matériaux de conditionnement primaire notamment le réservoir et la chambre de dosage, pourrait être modifiée par une bonne sélection des matériaux ou par pelliculage intérieur de ceux-ci [142,156].

6.1.2 Formulation des solutions pour aérosols

Dans ces préparations, les substances actives doivent être complètement dissoutes dans le gaz propulseur. Elles possèdent une FPF de 50 à 60% de la dose émise. Ce pourcentage est bien supérieur à celui des suspensions [127]. Pour les substances actives peu solubles dans les HFA, il est parfois nécessaire d'ajouter des co-solvants aux préparations pour en faciliter la dissolution. En pratique courante, l'éthanol est très utilisé comme co-solvant dans de nombreuses formulations car ayant l'avantage d'être à la fois bien soluble dans les HFA et solvant de nombreuses substances actives pharmaceutiques. En outre, la stabilité des solutions obtenues doit être maintenue quelles que soient les conditions de conservation notamment les variations de température. Il faut noter que la dissolution complète dans les HFA des substances actives, augmente la probabilité de dégradation des substances actives comparativement aux suspensions [157]. Par ailleurs, dans les suspensions, la taille des particules inhalées dépend directement de celle des particules dans les suspensions. Par contre dans les solutions, la taille des particules est directement liée à celle des gouttelettes d'aérosol et la concentration du principe actif dans le HFA. Par conséquent, la taille des particules inhalées peut être modulée par le réglage du

diamètre de l'orifice de sortie des gouttelettes d'aérosol et par la pression de propulsion du HFA en fonction de l'objectif thérapeutique à atteindre. En général, l'utilisation dans la formulation d'un co-solvant volatile, permet d'obtenir de très fines particules après évaporation et séchage de la gouttelette d'aérosol. Mais ces tailles ne sont pas adaptées à toutes les pathologies, d'où la nécessité d'adapter la taille des particules à inhaler en fonction de la zone de dépôt souhaité et en fonction de la pathologie à traiter. Il est également possible de modifier la taille des particules par ajout d'un agent non volatile tel que le glycérol ou le PEG dans la formulation [12,128,158,159].

6.2 Formulations de poudres sèches pour inhalation

Les récents progrès dans la thérapie inhalée ont suscité un grand intérêt pour le développement de nombreuses formulations de poudres sèches destinées à l'administration pulmonaire des médicaments [160]. A cet effet, d'importantes améliorations sur la performance de ces poudres ont pu être obtenues par variation des paramètres de formulation et de préparation notamment en réduisant la densité, en modifiant les propriétés de surface ou en variant la taille de ces particules. Dans ce travail, nous énumérerons les formes les plus utilisées actuellement en thérapie notamment celles utilisées pour la formulation des corticostéroïdes.

6.2.1 Poudres sèches à particules vectrices

Les substances actives à l'état micronisé, constituent une poudre cohésive avec de mauvaises propriétés d'écoulement [161]. Cela a pour conséquence de rendre très difficile la répartition de la poudre en doses unitaires en vue d'être inhalée. Les forces interparticulaires rendent également difficile la dispersion de la poudre dans les voies respiratoires. Il paraît donc impossible de les utiliser directement pour les formulations et pour l'administration pulmonaire. Pour améliorer les propriétés rhéologiques de ces poudres afin qu'elles puissent facilement être réparties en doses unitaires reproductibles, il a été proposé l'utilisation de grosses particules inertes pharmacologiquement, notamment le lactose comme particules vectrices des petites particules de substances actives (Fig. 17) [163]. Ainsi le mélange des particules fines de substances actives et des grosses particules de lactose devient plus facile à manipuler et à mesurer en doses unitaires. Ainsi, lors du mélange, les particules de substances actives adhèrent sur les parois des particules de lactose selon un mélange ordonné [164]. Après inhalation, les petites particules sous l'effet de l'inspiration exercée par le patient, se détachent des grosses particules. Celles-ci vont s'impacter dans la gorge et être dégluties, pendant que les petites particules continuent leur trajectoire pour atteindre les bronches ou les alvéoles selon leur taille.

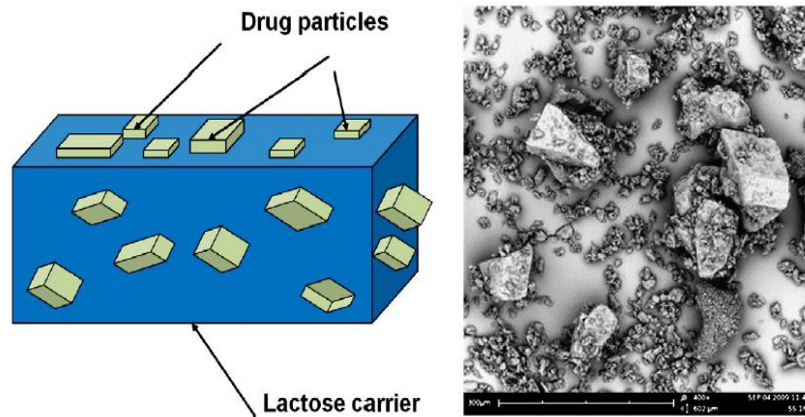


Fig. 17: Principe du transport des particules fines par le lactose [162]

Toutefois, deux phénomènes majeurs jouent un rôle important dans la performance de ces poudres à inhaler : la présence de "sites actifs" et la formation de microagrégats de fines particules de lactose et de substances actives. Les "sites actifs" sont des parties du lactose qui présentent de forts potentiels d'adhésion pour les particules de principe actif. Cette forte attractivité serait due à la présence de fissures, à la rugosité de la surface et à la présence de formes amorphes avec des variations de l'énergie de surface du lactose [165]. Les fines particules de PA deviennent donc difficiles à détacher de ces sites. Cette forte rétention pourrait expliquer les faibles taux de FPF (< 20%) délivrées par certains médicaments dans les poumons [166]. Pour pallier à ce problème, l'une des solutions proposée est une force d'inspiration supérieure à la force d'adhésion (F_{adh}) des particules de substances actives sur les particules de lactose qui peut être déterminée selon l'équation suivante (Eq. 5) [167] :

$$F_{adh} = 0,063 \cdot 2d [1 + 0,009 (\%RH)] \quad (5)$$

d : Diamètre géométrique médian du principe actif

RH : Humidité résiduelle de la poudre

Des traitements de surface ont également été proposés pour réduire la quantité de "sites actifs" et améliorer la délivrance pulmonaire du médicament [168]. Quant aux microagrégats, il s'agit de la création de liaisons entre les particules fines de lactose et de PA présentes dans la formulation. Ces liaisons sont de type "lactose-lactose", "lactose-PA" et "PA-PA". Ainsi, ces liaisons interparticulaires créent des microagrégats entre les deux types de particules fines [169]. Cela a

pour conséquence directe d'augmenter la quantité de substances actives greffées sur le lactose et donc d'améliorer la dose de substances actives délivrée dans les poumons. Cette théorie est la base de l'introduction des particules fines de lactose dans les formulations afin de réduire les sites actifs et d'augmenter la proportion de principe actifs délivrés dans les poumons. Une autre option pour améliorer la délivrance pulmonaire des principes actifs est de réduire les forces de contact entre le lactose et le principe actif par modification de la surface du lactose. Deux méthodes pour modifier l'énergie de surface du lactose existent. La première méthode consiste à modifier le polymorphisme du lactose par cristallisation [170]. Cela a permis effectivement de réduire l'énergie de surface du lactose et donc d'améliorer les performances des poudres formulées par cette méthode. La deuxième méthode a quant à elle consisté à enrober la particule porteuse avec différents matériaux susceptibles d'en réduire les charges de surface et réduire ainsi les éventuelles interactions avec les particules de la substance active. Plusieurs matériaux ont été utilisés à cet effet, ce sont le stéarate de magnésium, la leucine, le stéarate de sucrose et le stéarate de sodium. Cette méthode a été appliquée pour la formulation du *Pulvinel*[®] à base de beclométhasone et de stéarate de magnésium comme agent d'enrobage des particules de lactose [171]. De nouvelles particules porteuses telles que le mannitol et l'erythritol ont aussi été testées. Bien que ces molécules aient démontré un bon potentiel, le lactose demeure le plus utilisé car ayant le double avantage d'être bien toléré par les patients et de donner une sensation de goût sucré dans la gorge confirmant ainsi la bonne dispersion des particules. Et malgré les difficultés rencontrées en pratique pour délivrer de fortes doses de substances actives dans les poumons, les poudres à inhaler demeurent les formes de choix pour l'administration pulmonaire des médicaments.

6.2.2 Liposomes

Les médicaments encapsulés sous forme de liposomes sont préparés soit par lyophilisation soit par séchage par atomisation. A l'état solide, les liposomes peuvent aussi s'appeler liposphères ou proliposomes [172,173]. Ils sont de taille nanométrique et sont formés de bicouches lipidiques concentriques, emprisonnant entre elles des compartiments aqueux (Fig. 18). Ils sont obtenus à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles dont les plus couramment utilisés sont des phospholipides que l'on retrouve dans la composition du surfactant pulmonaire. Ils permettent l'encapsulation de substances actives hydrosolubles, liposolubles et amphiphiles [174]. En raison de leur préparation relativement simple, ainsi que leur excellente biodégradabilité et biocompatibilité, les systèmes liposomaux constituent l'un des plus utilisés pour l'administration de médicaments innovants [175]. L'utilisation de phospholipides permet de créer des systèmes qui miment les membranes biologiques facilitant ainsi leur pénétration

intracellulaire. La formulation liposomale permet une rétention prolongée du médicament encapsulé sur le site d'administration en limitant sa diffusion et sa dégradation.

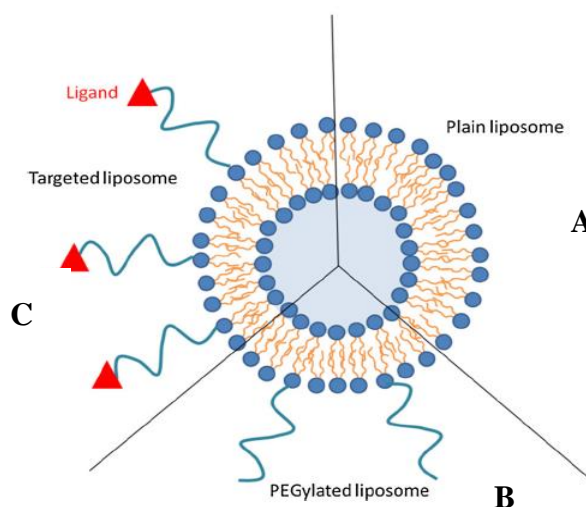


Fig. 18 : Représentation schématique de différents types de liposomes : liposome simple (A), liposome PEGylé (B), liposome ciblé (C) [176].

Ce qui permet de réduire de façon sensible la fréquence d'administration de ces médicaments comparativement à leurs formes conventionnelles avec un rapport bénéfice/cout plus élevé [177]. L'encapsulation permet la protection des substances contenues dans les liposomes vis-à-vis d'une dégradation enzymatique. Elle permet également de limiter les effets indésirables des substances actives. Des améliorations peuvent être apportées à ce système notamment par l'introduction de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) souvent greffées sur des phospholipides: c'est la "PEGylation". La "PEGylation" permet une stabilisation stérique du liposome et limite l'adsorption de molécules de reconnaissance du système immunitaire ce qui augmente considérablement le temps de circulation sanguine et permet ainsi de limiter les fréquences d'administration ou même d'envisager des thérapies ciblées [178,179]. Ce système permet aussi de greffer des ligands sur la membrane phospholipidique pour une action plus ciblée (Fig. 18) [180]. Cependant, les liposomes présentent un inconvénient majeur : l'instabilité chimique par oxydation des phospholipides, ce qui nécessite des conditions de stockage particulières. Les liposomes sont très utilisés dans l'industrie pharmaceutique comme vecteurs des médicaments et plus principalement dans les maladies cancéreuses et pulmonaires. De nombreux corticoïdes sous forme liposomale ont été évalués. Ce sont entre autres, la triamcinolone, le palmitate de dexaméthasone, le budésonide et la béclo méthasone dipropionate [181–183]. Des études ont

permis d'évaluer le profil pharmacocinétique de liposomes à base de dilaurylphosphatidylcholine encapsulant le béclométhasone dipropionate dont la taille variait de 1 à 3 μm , administrés par nébulisation [184]. On a pu observer que 75% des liposomes nébulisés se retrouvaient dans les voies pulmonaires, 12% dans le rhino-pharynx et 13% dans l'estomac et l'intestin. En outre, 50% de la dose étaient encore présents 24h après l'administration, prouvant la rétention prolongée des liposomes dans les poumons. Aucun effet indésirable important tant local que systémique n'a été signalé lors de cette étude [185]. Une étude similaire utilisant des liposomes à base de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) a montré 88% de dépôt pulmonaire 6h après inhalation des liposomes. Ce qui laisse suggérer qu'une dose quotidienne unique de corticoïde liposomal pourrait suffire pour une efficacité thérapeutique adéquate [186]. Enfin, il est intéressant de noter que des liposomes PEGylés contenant du budésonide administrés à des souris à raison d'une dose par semaine ont donné lieu à une efficacité antiasthmatique similaire à celle de doses quotidiennes égales de budésonide libre. Cette contribution positive de la PEGylation sur l'efficacité de la formulation pulmonaire liposomale semble être liée à l'amélioration de la stabilité physico-chimique et à une meilleure diffusion dans le mucus pulmonaire évitant ainsi la clairance mucociliaire par rapport aux liposomes non PEGylés [178,187].

6.2.3 Microparticules polymères

Les microparticules polymères sont des systèmes particuliers de taille comprise entre 1 et 100 μm . Elles sont soit de type matriciel (microsphères), adapté aux molécules hydrophobes, soit renfermant un ou plusieurs réservoirs (microcapsules) adapté aux molécules hydrosolubles (Fig. 19) [188]. De nombreux polymères biodégradables ou bioérodibles existent et sont soit d'origine naturelle (ex. : albumine, alginate, chitosan, acide hyaluronique), soit d'origine synthétique (ex. : polyesters dont les plus communément utilisés sont les polymères d'acide lactique : le poly(lactide) (PLA), d'acide glycolique (PGA) ou les copolymères d'acide lactique et glycolique : le poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) [189]. La libération des principes actifs se produit soit par diffusion à travers les pores de la matrice, soit par dégradation du polymère soit par combinaison des deux mécanismes. Le choix du polymère et la technique de production influencent considérablement les propriétés physicochimiques des particules (taille, densité, porosité, stabilité...) ainsi que le devenir *in vivo* des particules. Les microparticules polymériques présentent une meilleure stabilité physicochimique comparativement aux liposomes [23]. Ils présentent cependant quelques inconvénients : la plupart des techniques de

production impliquent l'utilisation de solvants organiques et des résidus de ces solvants peuvent donc se retrouver dans les microparticules.

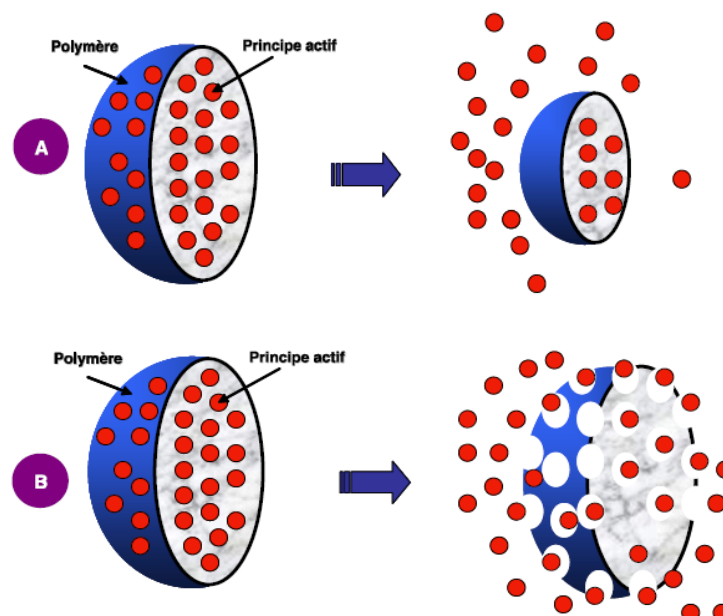


Fig. 19: Différents types de microparticules polymères : microparticule érodible (A), microparticule biodégradable (B) [190].

La dégradation de certains polymères comme le PLGA crée un micro-pH acide qui peut endommager certains principes actifs pH-sensibles comme les peptides et les protéines [191]. Il est important de noter que la durée de la biodégradation du polymère est généralement bien plus longue que celle de la libération du principe actif à partir des microparticules polymériques [192]. Les microparticules peuvent après administration par voie pulmonaire, être internalisées et dégradées par les macrophages, ce qui conduit à des effets cytotoxiques. En effet, chez le lapin, l'administration par inhalation de microparticules de polymères d'acide lactique (PLA) a provoqué des dommages histologiques, des hémorragies pulmonaires ainsi qu'une infiltration d'éosinophiles et de neutrophiles [193]. Il est toutefois possible de réduire la phagocytose des particules polymériques (PLGA) ayant une taille de 2 à 3 μm en les enrobant de 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), le constituant majeur du surfactant pulmonaire [194]. L'ajout de PEG dans les formulations de microparticules polymères permet également de réduire la densité particulaire, afin d'obtenir un diamètre géométrique plus important tout en conservant un diamètre aérodynamique adéquat, ce qui permet de diminuer la clairance alvéolaire [195].

6.2.4 Particules PulmoSpheres

Les PulmoSpheres sont des particules préparées par séchage par atomisation à partir d'une émulsion. Cette méthode a été conçue pour créer des particules poreuses avec une morphologie semblable à une éponge (Fig. 20) [196]. Les pulmoSphères sont sphéroïdales avec une répartition uniforme de la taille géométrique variant entre 1 et 5 μm .

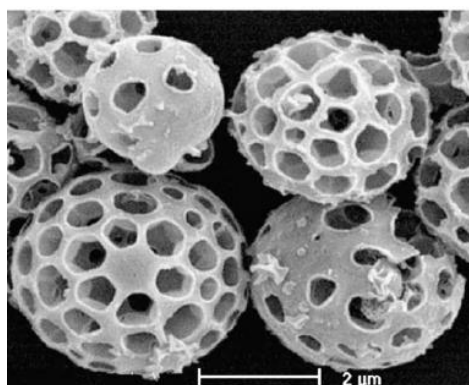


Fig. 20 : Particules pulmoSphères poreuses [197]

Ces caractéristiques structurales leur confèrent des surfaces de contact interparticulaires plus réduites, ce qui conduit à une meilleure dispersibilité des particules et à une délivrance efficace dans les poumons profonds. Les FPF peuvent même atteindre 60% de la dose émise [198]. L'inhalation de ce type de poudre est en grande partie indépendante de la force inspiratoire du patient réduisant ainsi la variabilité inter-patient des doses inhalées [199]. C'est un avantage pour les jeunes patients et pour les personnes âgées ayant une fonction pulmonaire réduite. Ils pourront ainsi créer le débit inspiratoire nécessaire pour l'administration d'une dose complète. La technologie PulmoSphere est utilisée pour la formulation de plusieurs classes thérapeutiques, notamment les antibiotiques à savoir la tobramycine et la ciprofloxacine pour traiter les infections chroniques ainsi que l'amphotéricine B pour traiter l'aspergillose pulmonaire invasive chez les patients immunodéprimés [186,200]. Au-delà des produits en cours de développement, les formulations PulmoSpheres ont montré des résultats prometteurs dans l'administration pulmonaire des produits biologiques, y compris les peptides, les protéines, les anticorps et les vaccins [201]. En outre, la dispersion des particules poreuses PulmoSpheres dans les gaz propulseurs hydrofluoroalcanes améliore l'uniformité de la dose par rapport aux formulations de suspensions conventionnelles. Ce qui peut améliorer le dépôt pulmonaire de ces formulations pMDI [202].

6.2.5 Particules enrobées

L'aérosolisation des particules inhalables micronisées peut être améliorée par l'ajout d'un enrobage externe formé par des lipides ou par des acides aminés en utilisant soit le séchage par atomisation soit le dépôt physique en phase vapeur. L'optimisation de la formulation et du procédé de séchage par atomisation est nécessaire pour obtenir une solidification précoce du liquide d'enrobage et la formation d'une couche hydrophobe et cristalline capable de réduire les forces interparticulaires et donc améliorer la dispersibilité de particules [203]. La distribution granulométrique des particules obtenues, est étroite avec généralement plus de 90% des particules qui sont inférieures à 2,8 μm . L'enrobage réduit la tendance à l'agglomération des particules, augmente leur dispersibilité et les FPF qui peuvent atteindre 50 à 68% de la dose émise. Les FPF des poudres ainsi enrobées sont 3 à 4 fois supérieures aux FPF mesurées pour la poudre micronisée nue. La dispersibilité de la poudre est essentiellement affectée par la morphologie et la rugosité de surface des particules c'est-à-dire la taille et la densité des aspérités et non plus par les énergies de surface [204]. Une formulation de tobramycine enrobée de lipides a été mise au point par cette méthode pour le traitement de la fibrose kystique [205]. Des particules de sulfate de salbutamol ont été enrobées avec des acides aminés qui ont été appliqués par dépôt physique en phase vapeur sur les surfaces sphériques des particules. Le dépôt de l'excipient a conduit à la formation d'aspérités pointues cristallines dont la taille et la densité est fonction de la teneur en L-leucine dans la phase gazeuse [206]. D'autres PA ont été formulés avec succès par cette technique : tartrate de nicotine, fludrocortisone, budésonide et l'hormone de croissance [207]. La préparation de particules enrobées implique plusieurs étapes de production, ce qui pourrait ne pas être avantageux pour la production industrielle de ce type de particules [205]. Par conséquent, une technologie de production en une seule étape des microparticules et de l'enrobage a été mise au point en Finlande pour pallier à cet inconvénient. Ce procédé breveté implique la production de particules à surface modifiée dans des réacteurs continus ou discontinus d'aérosols [208]. Un autre procédé d'amélioration des propriétés de surface des particules inhalables est la mécanofusion qui consiste à appliquer un revêtement mécanique sec sur les particules [209]. Cette méthode utilise l'acide silicique anhydre (Aerosil 200) comme agent de revêtement. Les particules micronisées d'hydrate de pranlukast, un antagoniste de leucotriène utilisé dans le traitement de l'asthme bronchique, ont été formulées par cette technique. Les fractions respirables de cette formulation obtenues à l'aide d'un impacteur varient entre 43 et 79% comparativement à la poudre d'origine qui était seulement de 36% [210]. Toutefois, des réserves ont été émises concernant la sécurité de l'acide silicique utilisé dans les produits d'inhalation. Le stéarate de magnésium considéré comme plus sûr pour la voie

pulmonaire, a finalement été utilisé en remplacement de l'acide silicique pour modifier la surface des particules à inhaler [211]. Des améliorations significatives des propriétés d'aérosolisation ont été notées pour toutes les poudres formulées par mécanofusion avec une augmentation significative des fractions respirables. C'est le cas du sulfate de salbutamol, du salmétérol et de l'acétonide de triamcinolone, tous utilisés dans le traitement de l'asthme [211]. L'énergie de surface de ces formulations a été abaissée afin de la rendre plus homogène sur toutes les particules [212].

6.2.6 Grosses particules poreuses

Les grosses particules poreuses (LPP en anglais "*large porous particles*") sont des microparticules qui ont été développées pour la première fois par les laboratoires Advanced Inhalation Research. Elles ont un diamètre géométrique supérieur à $5\ \mu\text{m}$ et une densité inférieure à $0,4\ \text{g/cm}^3$. Ce qui correspond à un diamètre aérodynamique inférieur à $5\ \mu\text{m}$ et donc adapté à l'administration pulmonaire (Fig. 21) [213]. Ces particules de grande taille, présentent de bonnes propriétés d'écoulement avec une tendance moindre pour l'agrégation. Elles échappent plus efficacement à la phagocytose des macrophages que les plus petites particules non poreuses. Le processus initial de production des LPP était basé sur la technique d'émulsion-évaporation de solvant à partir d'une double émulsion eau dans l'huile dans l'eau [213]. La phase interne aqueuse contenant le PA et éventuellement d'autres excipients tels que la cyclodextrine, des agents solubilisant ou des agents modificateurs de pH (ex. l'acide acétique).

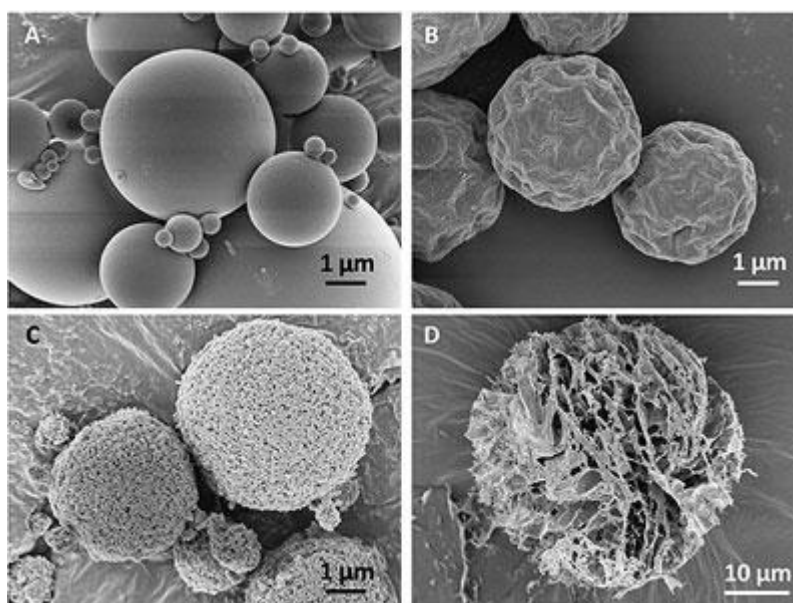


Fig. 21: Différents types de particules obtenues par spray drying : particules lisses (A), particules ridées (B), particules troyennes (C) et grosses particules poreuses (D) [214].

La phase organique interne contient un polymère de type PEG ou PLGA et éventuellement un émulsifiant [215]. Après évaporation du solvant les particules sont lyophilisées afin de favoriser la porosité et ainsi de diminuer leur densité tassée. L'incorporation de polyéthylène-imine (PEI) dans la phase interne aqueuse permet de modifier la morphologie des LPP en augmentant la porosité des particules [216]. Des LPP à base de testostérone ont montré des fractions respirables trois fois supérieures à celles des particules non poreuses (50 à 60% vs 20%). Des études *in vivo* chez le rat ont mis en évidence de faibles dépôts dans la trachée (46%) après inhalation de LPP comparativement aux particules non poreuses qui ont montré des dépôts plus élevés (79%) [213]. Les LPP présentent des FPF élevées et des profils de libération prolongée [217]. La formulation de LLP-PLGA contenant du chlorhydrate de doxorubicine et du bicarbonate d'ammonium dans la phase aqueuse a abouti à l'obtention de particules hautement poreuses de tailles comprises entre 4,6 et 5,7 μm et des FPF entre 16 et 34%. Il a également été noté une faible phagocytose par les macrophages et une libération prolongée de la doxorubicine [218].

Une approche alternative à l'émulsion-évaporation de solvants pour la production de LPP consiste à utiliser la technique de séchage par atomisation [219]. Le PA et les excipients sont solubilisés dans une phase aqueuse ou un mélange eau-éthanol avant d'être séchés [219]. Des LPP composées de sulfate de salbutamol, d'albumine du sérum humain, de lactose et de DPPC ont été fabriquées par cette méthode. Les particules obtenues ont présenté des diamètres aérodynamiques inférieurs à 4,7 μm et des FPF d'environ 50% par rapport à 16% mesurée pour les particules non poreuses. Une étude plus récente a permis d'optimiser des LPP destinées à un traitement antituberculeux à base de pyrazinamide et utilisant comme excipients l'acide hyaluronique, la DPPC, la leucine et le bicarbonate d'ammonium par séchage par atomisation. Les particules obtenues sont sphériques, poreuses et partiellement cristallines avec une taille géométrique médiane de 5,8 μm et une densité tassée autour de 0,09 g/cm^3 . Le diamètre aérodynamique a été estimé à environ 1,75 μm et donc adapté pour la délivrance dans les poumons profonds [220,221].

D'autres variantes aux LPP ont également été proposées par certains auteurs notamment les particules poreuses ridées. La bonne performance de ce type de particules a été attribuée à la réduction des forces cohésives interparticulaires en raison des faibles densités apparentes et des meilleures propriétés de surface. Ceci permet en effet d'améliorer la dispersibilité de ces particules comparativement aux particules sphériques et lisses. Des particules ridées d'albumine de bovin ont été formulées par cette méthode et les FPF mesurées, sont significativement plus importantes que celles des particules sphériques du même PA [222]. En outre, il a été observé une plus faible rétention de poudre dans la capsule et dans l'inhalateur. Un bon écoulement a

également été observé, ce qui laisse supposer que le dépôt de ces particules sera moins dépendant du débit d'inspiration des patients. Ces bonnes performances d'aérosolisation des particules ridées pourraient être expliquées par leurs faibles contacts interparticulaires résultant des aspérités présentes sur la surface des particules. L'addition de petites quantités de trileucine (L-leucyl-L-leucyl-L-Leucine) à des formulations obtenues par séchage par atomisation a permis d'obtenir des particules ridées plus stables avec des propriétés améliorées pour le dépôt pulmonaire (Fig. 22) [223]. Une large gamme de substances actives ont été efficacement formulées en poudre par cette méthode. Ce sont le sulfate de salbutamol, le cromoglycate de sodium, des antibiotiques tels que le sulfate de nétilmicine et le sulfate de gentamicine et des hormones peptidiques telles que la calcitonine de saumon et l'hormone de croissance humaine. Les particules obtenues avaient toutes des morphologies ridées, présentaient une faible cohésivité et une bonne dispersibilité. Une augmentation significative de la fraction de particules fines a été observée même à de faibles concentrations de trileucine (2%). La surface des particules semble être enrichie en trileucine du fait de sa faible solubilité dans les formulations conduisant à une séparation de phase et à l'accumulation de cet excipient à la surface des particules lors du séchage [220,224].

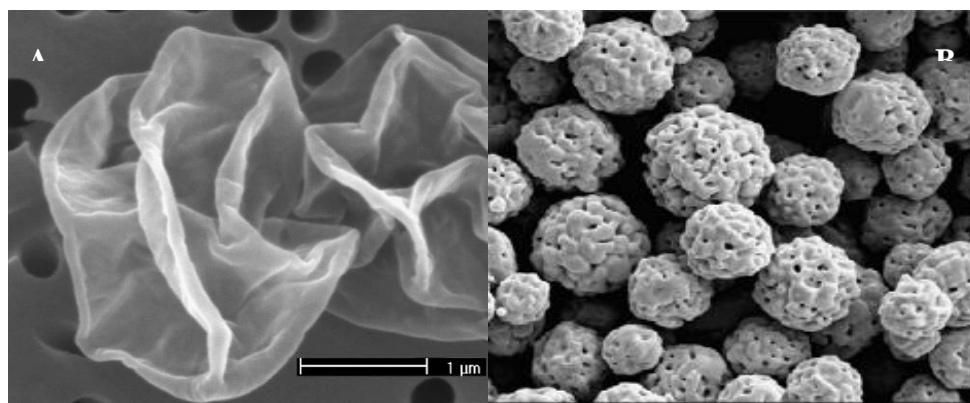


Fig. 22: Particules ridées à base de trileucine (A) et microparticules nanoporeuses (B) [197,225].

Il existe par ailleurs des particules poreuses plus petites, conçues en 2008 par Healy et al. et appelées microparticules nanoporeuses (NPMP) (Fig. 22) [226]. Elles sont également produites par séchage par atomisation et utilise le carbonate d'ammonium comme agent porogène. Les particules NPMP sont de petite taille géométrique ($< 3 \mu\text{m}$) et de faible densité en raison de leur porosité. Elles sont plus souvent amorphes et présentent de bonnes propriétés aérodynamiques [227]. Ces propriétés d'aérosolisation améliorées des NPMP découlent de leurs faibles contacts interparticulaires en raison de leur structure poreuse. Ce qui entraîne une réduction de la

cohésivité et une bonne dispersibilité de la poudre. Les FPF *in vitro* des NPMP varient entre 50 à 80% [228]. Cette technique a servi à formuler de nombreux médicaments sous forme de NPMP dont le budésonide, le chlorhydrate d'ambroxol-budésonide, le bendrofluméthiazide et le cromoglycate de sodium [220,225,227,229].

6.2.7 Particules Troyennes

C'est un système hybride complexe constitué de nanoparticules (NP) chargées en PA et véhiculées au sein de microparticules (Fig. 23). Ce système associe les propriétés de chaque type de particules en fonction de leur taille. Les microparticules possèdent de bonnes propriétés aérodynamiques : moins cohésives, bonne dispersibilité et meilleur dépôt dans les poumons profonds ; tandis que les NP ont un bon potentiel de distribution tissulaire [230].

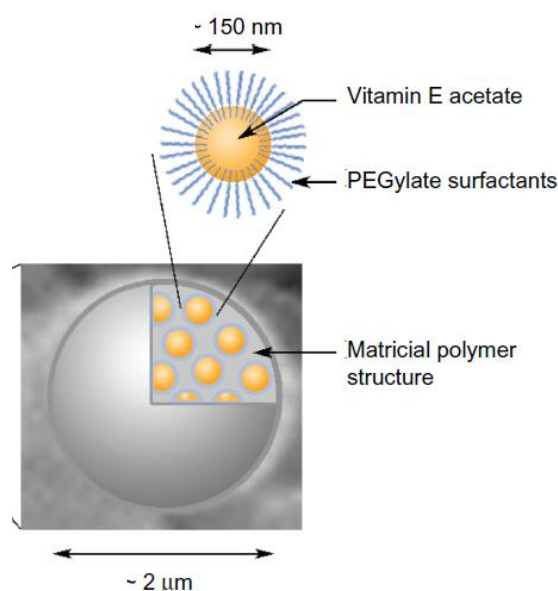


Fig. 23: Particule Troyenne encapsulant des nanoémulsions de vitamine E [231].

Ces microparticules sont produites par séchage par atomisation et ont des tailles supérieures à 5 μm et les NP qu'elles véhiculent ont des tailles qui varient entre 25 nm et plusieurs centaines de nm [230]. Une fois administrées dans les voies pulmonaires, les particules Troyennes ont pour rôle, grâce à leurs excellentes propriétés de dispersion, de véhiculer leur contenu vers les voies respiratoires basses. Puis elles se dissocient pour libérer les NP qui vont à leur tour exercer l'action pharmacologique sur les cellules cibles *in situ* ou par voie systémique. Les NP sont liées entre elles au sein des particules troyennes, par le biais d'une matrice ou par des forces de Van der Waals [230].

Une variante magnétique des particules troyennes a été proposée comme moyen de cibler des régions spécifiques des poumons en utilisant l'aimantation de nanoparticules SPION (*Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles*). C'est une technologie proposée dans le traitement des cancers des poumons et qui tente de trouver une solution aux éventuels effets néfastes que pourraient avoir les médicaments inhalés sur les parties saines des poumons [232]. Elle consiste à incorporer des particules magnétiquement actives à des médicaments chimiothérapeutiques de telle sorte que ces particules orientent les médicaments vers des sites bien spécifiques dans le corps du patient en utilisant un aimant externe [233,234]. Des particules Troyennes SPION à base de budésonide ont été produites à partir d'une matrice lipidique. Le système lipidique étant thermosensible, la libération du budésonide a lieu sous l'effet de l'hyperthermie (45 °C) créée par le champ magnétique radiofréquence et les FPF mesurées sont environs de 30% [235]. D'autres particules troyennes SPION à base de PEG, de carbonate d'ammonium et de stéarate de magnésium ont également été formulées. Les particules obtenues sont sphériques et poreuses avec un diamètre aérodynamique inférieur à 3 µm [220,236].

7. Stratégies de formulation des particules poreuses par Spray drying

7.1 Principe du spray drying

Le spray drying ou séchage par atomisation est une technique de séchage largement utilisée dans l'industrie pharmaceutique pour la production de nombreux médicaments notamment pour la formulation de différents types de particules inhalées [197]. C'est un procédé qui permet de produire des particules à partir d'une solution, d'une suspension ou d'une émulsion. Lors du séchage, la solution ou la suspension est acheminée par une pompe vers une buse qui se charge d'atomiser le liquide sous forme de fines gouttelettes dans une chambre de séchage (Fig. 24). Un flux d'air chaud de température réglable, sèche les gouttelettes et les particules séchées sont transportées vers le cyclone sous l'effet d'un flux d'air. Les particules sont finalement récoltées au fond du cyclone dans un collecteur [237]. La grande surface de contact entre la chaleur et les gouttelettes favorise le séchage ultra-rapide en quelques secondes des gouttelettes.

Cependant cela peut parfois entraîner la dégradation des PA thermosensibles [238]. Cette technique de séchage offre la possibilité d'influer sur les différents paramètres lors du séchage à savoir la composition de la formulation, le solvant, le débit d'alimentation en gaz, la température de chauffage, l'humidité relative, le diamètre de la buse, etc. Tous ces paramètres permettent d'optimiser les caractéristiques des particules telles que la taille, la morphologie et la densité, en

plus des propriétés macroscopiques de la poudre à savoir la densité apparente, la fluidité et la dispersibilité [188].

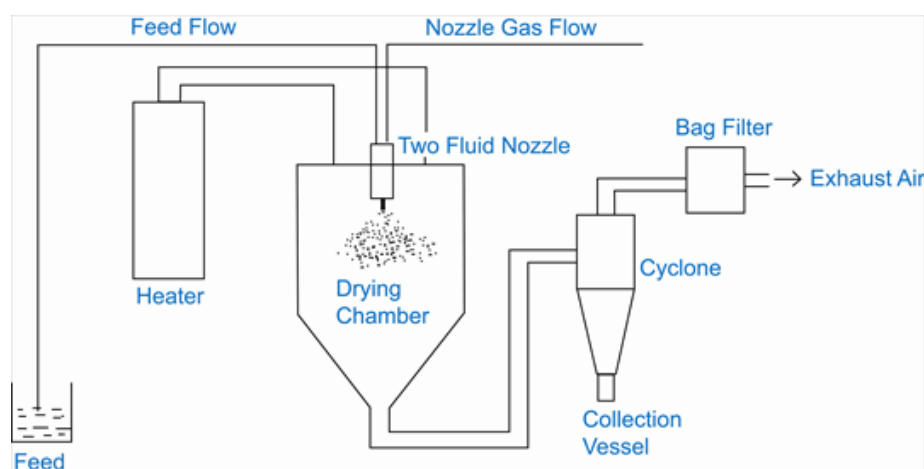


Fig. 24 : Schema d'un spray dryer [239]

La conception et le contrôle minutieux du processus peuvent aboutir à l'obtention de particules avec des morphologies ridées, sphériques ou poreuses [240]. L'utilisation de buses pneumatiques peut entraîner quelques inconvénients tels que l'irrégularité de la taille des gouttelettes produites et le risque de colmatage de la buse [241]. Alors que les buses à ultrasons génèrent des gouttelettes de tailles plus uniformes, ce qui a pour conséquence d'améliorer l'homogénéité de la distribution granulométrique des particules produites [242]. Le séchage par atomisation présente une faible efficacité dans la collecte par le cyclone des particules de taille inférieure à $2\ \mu\text{m}$ [243]. Les excipients les plus utilisés par cette méthode pour la préparation des particules à inhaler sont l'albumine, le chitosan, le PLA, le poly(méthacrylate), le PLGA et les phospholipides. Les propriétés de ces excipients ainsi que les proportions utilisées influencent fortement les propriétés physicochimiques et les profils de libération des particules [188]. Le rendement de fabrication est en général de l'ordre de 30 à 60% du fait de l'adhésion des microparticules sur les parois internes de l'appareil (chambre de séchage, cyclone, collecteur) [244]. La plupart des PA subissent une amorphisation lors du séchage, ce qui entraîne une augmentation de leur vitesse de solubilisation. Toutefois cette amorphisation peut également poser un problème de stabilité de ces PA. Il est important de mentionner que cette méthode permet d'encapsuler des PAs avec un très bon rendement d'encapsulation en comparaison avec d'autres méthodes comme l'émulsion-évaporation de solvant. Un nombre important de corticoïdes comme la DXM, la prednisolone, la betaméthasone, la bécloéthasone, l'hydrocortisone et le budésonide ont été encapsulés par spray-drying [245]. Le fumarate de

formotérol et le sulfate de salbutamol ont également été formulés par cette méthode en particules sphériques lisses dans le but de fabriquer des antiasthmatiques pour la voie inhalée [246].

7.2 Formulation des particules pour administration pulmonaire

Ce travail s'inscrit dans la suite de celui de Gomez-Gaete qui a optimisé une formulation de microparticules à base de DXM par spray drying en vue d'une administration intravitréenne. A l'issue de cette étude, les résultats obtenus ont été très prometteurs pour des particules à administration pulmonaire. En effet, les particules formulées répondent bien aux critères des LPP : elles sont sphériques, poreuses, moins cohésives avec une bonne stabilité physicochimique, des tailles géométriques médianes d'environ 8 μm et une densité tassée de 0,075 g/cm^3 [247]. L'utilisation de la combinaison DPPC-AH (AH : acide hyaluronique) comme matrice a fortement influencé la morphologie, le diamètre, la densité et l'agrégation de ces particules.

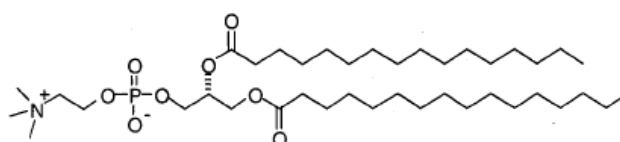


Fig. 25 : Structure chimique de la DPPC [248].

L'atomisation de la DPPC seule a entraîné la formation de particules de plus petite taille avec une forte agrégation entre elles. L'incorporation d'AH a permis de diminuer l'agrégation des particules, d'augmenter leur taille et de diminuer leur densité. En outre, les particules contenant l'AH se sont révélées plus stables que celles ne contenant uniquement que la DPPC [247].

Rappelons que la DPPC et l'AH sont deux excipients biodégradables et biocompatibles très utilisés pour la formulation par spray drying des particules inhalées [249]. La DPPC est un phospholipide, principal composant du surfactant pulmonaire (Fig. 25). Et de par sa structure proche de celle des membranes cellulaires, elle facilite l'absorption pulmonaire des médicaments en augmentant la perméabilité à travers la membrane épithéliale des voies aériennes par diminution de la stabilité de la bicouche et en induisant des changements dans le cytosquelette qui peuvent affecter les jonctions cellulaires et accélérer le passage paracellulaire des PA [250]. Elle réduit par ailleurs la phagocytose des particules par réduction de l'adsorption d'opsonines à la surface de celles-ci [194]. Son incorporation dans les formulations diminue également l'hygroscopicité des particules et permet de moduler la libération des PAs. Aucun effet toxique

n'a pas été rapporté après administration par voie intrapulmonaire ou par d'autres voies [219]. Quant à l'AH, c'est un glycosaminoglycane, polysaccharide présent naturellement dans les tissus biologiques (Fig. 26) [251].

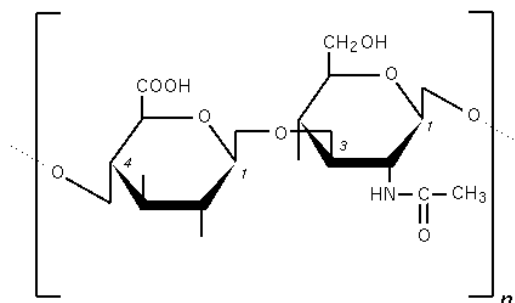


Fig. 26: Structure chimique de l'acide hyaluronique [252].

Il permet de stabiliser les matrices et d'améliorer les propriétés physicochimiques des particules produites par spray-drying. Il est très utilisé pour l'encapsulation des PAs destinés à l'administration pulmonaire et permet également de moduler la libération des PAs. Des études ont montré que des formulations à base d'insuline et d'AH administrées par inhalation présentent des caractéristiques de libération contrôlée du PA.

De par leurs propriétés, la DPPC et l'AH correspondent bien à l'objectif de ce travail qui est de formuler par spray-drying, des LPP destinées à moduler la libération de la DXP dans les poumons profonds. Le spray-drying est connu pour favoriser l'amorphisation des PAs, aussi pour pouvoir moduler la libération de la DXP, il doit y avoir de fortes interactions entre elle et les excipients choisis. Ces interactions ont été mises en évidence dans les particules de DXM élaborées par Gomez-Gaete et dont la matrice était composée du complexe DPPC-AH. Dans cette étude, la DXM s'est incorporée de façon partielle à l'intérieur des bicouches de DPPC en l'absence d'AH dans la formulation alors que cette incorporation est devenue plus effective en présence d'AH. Ce qui laisse supposer que l'encapsulation d'une molécule plus hydrophobe que la DXM en l'occurrence sa prodrogue, la DXP, pourrait aboutir à davantage d'interactions avec la bicouche phospholipidique de la DPPC et conduire certainement à une libération prolongée de la DXP dans les poumons [188].

C'est donc dans cette optique que nous avons dans le cadre de ce travail de thèse, choisi comme molécule modèle le palmitate de dexaméthasone (DXP) qui est un dérivé ester C-21-palmitate de la dexaméthasone (DXM) (Fig.27). La DXP se présente sous deux formes polymorphiques : une forme cristalline (A) et une forme amorphe (B) [253]. Son long radical palmitate lui confère une grande lipophilie lui permettant d'avoir une forte affinité pour les cellules inflammatoires avec

une grande concentration au niveau des sites d'inflammation [181,182]. La DXP est une prodrogue inactive qui sous l'effet des estérases pulmonaires va s'hydrolyser pour se libérer de sa longue chaîne palmitate et donner la DXM qui est la molécule active [254–256].

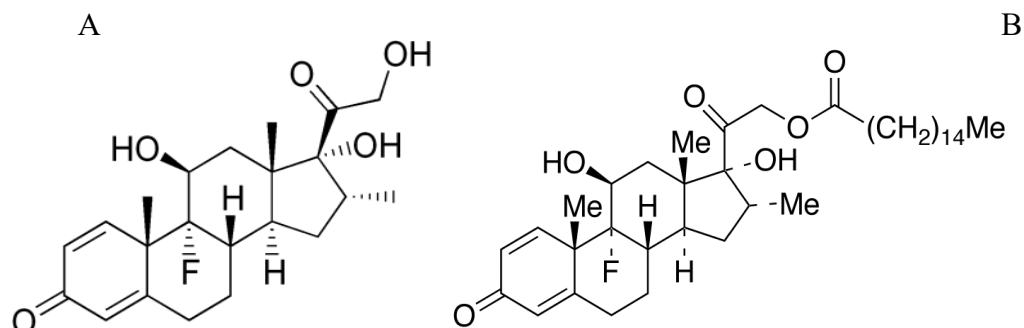


Fig. 27: Structures de la dexaméthasone (A) et du palmitate de dexaméthasone (B)

Cette chaîne palmitate devrait en outre permettre une excellente incorporation dans les bicouches de DPPC et donc de permettre une modulation de la libération de la prodrogue. Ces propriétés physicochimiques et pharmacologiques confèrent à la DXP l'avantage de pouvoir agir à des doses plus faibles et d'engendrer par conséquent moins d'effets secondaires indésirables locaux et systémiques. Sa durée d'action est plus élevée avec des effets thérapeutiques plus importants que la DXM [182]. Elle améliore la tonicité des vaisseaux sanguins en réduisant leur perméabilité, inhibe l'infiltration des leucocytes et la migration des macrophages. Ce qui permet de réduire la sécrétion et la libération des cytokines inflammatoires [255,256].

Références

- [1] E.N. Marieb, K. Hoehn, *Human Anatomy & Physiology*, Pearson Education, 2007.
- [2] Anatomie et physiologie des poumons - Société canadienne du cancer, [Www.cancer.ca](http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/lung/anatomy-and-physiology/?region=qc). (n.d.). <http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-type/lung/anatomy-and-physiology/?region=qc> (accessed April 15, 2015).
- [3] L'asthme de A à E: Fonctionnement normal des voies respiratoires, (n.d.). <http://tout-sur-l-asthme.blogspot.fr/p/fonctionnement-normal-des-voies.html> (accessed April 15, 2015).
- [4] E.R. Weibel, *Geometry and Dimensions of Airways of the Respiratory Zone*, in: *Morphometry Hum. Lung*, Springer Berlin Heidelberg, 1963: pp. 56–73. http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-3-642-87553-3_6 (accessed April 2, 2015).
- [5] B.E.M. Brand-Saberli, T. Schäfer, *Trachea: Anatomy and Physiology*, *Thorac. Surg. Clin.* 24 (2014) 1–5. doi:10.1016/j.thorsurg.2013.09.004.
- [6] J. Gil, H. Bachofen, P. Gehr, E.R. Weibel, *Alveolar volume-surface area relation in air- and saline-filled lungs fixed by vascular perfusion*, *J. Appl. Physiol.* 47 (1979) 990–1001.

- [7] L.-Y. Chang, J.D. Crapo, P. Gehr, B. Rothen-Rutishauser, C. Mühfeld, F. Blank, 8.04 - Alveolar Epithelium in Lung Toxicology*, in: C.A. McQueen (Ed.), *Compr. Toxicol. Second Ed.*, Elsevier, Oxford, 2010: pp. 59–91. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080468846009040> (accessed April 2, 2015).
- [8] solylouna, La mucoviscidose, Muconature. (n.d.). <https://muconature.wordpress.com/2014/10/21/la-mucoviscidose/> (accessed May 5, 2015).
- [9] J.S. Patton, Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 19 (1996) 3–36. doi:10.1016/0169-409X(95)00113-L.
- [10] J.S. Patton, P.R. Byron, Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 67–74. doi:10.1038/nrd2153.
- [11] R.F., Magnus Svartengren, Naomi Jarvis, Michael Bailey, Ralph Bergmann, Werner Hofmann, Per Camner Klas Philipson, Does lung retention of inhaled particles depend on their geometric diameter?, *Exp. Lung Res.* 26 (2000) 437–455. doi:10.1080/01902140050130356.
- [12] P. Colombo, D. Traini, F. Buttini, *Inhalation Drug Delivery: Techniques and Products*, John Wiley & Sons, 2012.
- [13] European Pharmacopoeia Online 8.1, (n.d.). <http://online6.edqm.eu/ep801/mobile/> (accessed May 10, 2015).
- [14] W. Wong, J. Crapper, H.-K. Chan, D. Traini, P.M. Young, Pharmacopoeial methodologies for determining aerodynamic mass distributions of ultra-high dose inhaler medicines, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 853–857. doi:10.1016/j.jpba.2009.10.011.
- [15] Chapitre 10 - L'appareil respiratoire, (n.d.). <http://www.ilocis.org/fr/documents/ilo010.htm> (accessed April 8, 2015).
- [16] T.C. Carvalho, J.I. Peters, R.O. Williams III, Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there?, *Int. J. Pharm.* 406 (2011) 1–10. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.040.
- [17] X.-M. Zeng, H.B. MacRitchie, C. Marriott, G.P. Martin, Correlation between Inertial Impaction and Laser Diffraction Sizing Data for Aerosolized Carrier-based Dry Powder Formulations, *Pharm. Res.* 23 (2006) 2200–2209. doi:10.1007/s11095-006-9055-9.
- [18] W.C. Hinds, *Aerosol technology: Properties, behavior, and measurement of airborne particles*, 1982. <http://adsabs.harvard.edu/abs/1982wi...bookQ...H> (accessed April 8, 2015).
- [19] A.J. Hickey, *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, Second Edition, CRC Press, 2003.
- [20] V. Timbrell, R.E.G. Rendall, Preparation of the UICC Standard reference samples of asbestos, *Powder Technol.* 5 (1972) 279–287. doi:10.1016/0032-5910(72)80032-9.
- [21] C.P. Yu, Theories of Electrostatic Lung Deposition of Inhaled Aerosols, *Ann. Occup. Hyg.* 29 (1985) 219–227. doi:10.1093/annhyg/29.2.219.
- [22] On the practical significance of electrostatic lung deposition of isometric and fibrous aerosols, (n.d.). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0021850285900035> (accessed March 25, 2015).
- [23] H.M. Courrier, N. Butz, T.F. Vandamme, Pulmonary Drug Delivery Systems: Recent Developments and Prospects, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 19 (2002) 425–498. doi:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v19.i45.40.
- [24] C. Duret, K. Amighi, N. Wauthoz, Développement et évaluation de poudres sèches pour inhalation à base d'itraconazole dans le cadre du traitement et de la prévention de l'aspergillose pulmonaire, (2013). <http://hdl.handle.net/2013/ULB-ETD:oai:ulb.ac.be:ETDULB:ULBetd-04222013-104100> (accessed April 8, 2015).
- [25] Q.A. Summers, Inhaled drugs and the lung, *Clin. Immunol Allergy* 21 (1991) 259–268. doi:10.1111/j.1365-2222.1991.tb01657.x.
- [26] F. Blank, B.M. Rothen-Rutishauser, S. Schurch, P. Gehr, An Optimized In Vitro Model of the Respiratory Tract Wall to Study Particle Cell Interactions, *J. Aerosol Med.* 19 (2006) 392–405. doi:10.1089/jam.2006.19.392.
- [27] W.H. Finlay, *The Mechanics of Inhaled Pharmaceutical Aerosols: An Introduction*, Academic Press, 2001.
- [28] B.E. Lehnert, Pulmonary and thoracic macrophage subpopulations and clearance of particles from the lung., *Environ. Health Perspect.* 97 (1992) 17–46.

- [29] G. Oberdörster, J. Ferin, B.E. Lehnert, Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury., *Environ. Health Perspect.* 102 (1994) 173–179.
- [30] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823–839.
- [31] R. Upton, D. Doolette, Kinetic Aspects of Drug Disposition in the Lungs, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 26 (1999) 381–391. doi:10.1046/j.1440-1681.1999.03048.x.
- [32] A.J. Hickey, *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, Second Edition, CRC Press, 2003.
- [33] W.H. Organization, *Global Surveillance, Prevention and Control of Chronic Respiratory Diseases: A Comprehensive Approach*, World Health Organization, 2007.
- [34] J. Bousquet, R. Dahl, N. Khaltaev, Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases, *Allergy.* 62 (2007) 216–223. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01307.x.
- [35] J. Bousquet, E. Mantzouranis, A.A. Cruz, N. Aït-Khaled, C.E. Baena-Cagnani, E.R. Bleeker, et al., Uniform definition of asthma severity, control, and exacerbations: Document presented for the World Health Organization Consultation on Severe Asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 126 (2010) 926–938. doi:10.1016/j.jaci.2010.07.019.
- [36] P.J. Barnes, Inhaled Glucocorticoids for Asthma, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 868–875. doi:10.1056/NEJM199503303321307.
- [37] R. Epaud, L’asthme grave de l’enfant: Épidémiologie, physiopathologie et traitement médical, *Arch. Pédiatrie.* 10 (2003) 470–473. doi:10.1016/S0929-693X(03)00089-7.
- [38] Asthme et mesure du FENO, (n.d.). <http://sante-medecine.commentcamarche.net/faq/48075-asthme-et-mesure-du-feno> (accessed April 22, 2015).
- [39] S.T. Holgate, D.E. Davies, R.M. Powell, P.H. Howarth, H.M. Haitchi, J.W. Holloway, Local genetic and environmental factors in asthma disease pathogenesis: chronicity and persistence mechanisms, *Eur. Respir. J.* 29 (2007) 793–803. doi:10.1183/09031936.00087506.
- [40] H.S. Nelson, The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms, *J. Allergy Clin. Immunol.* 105 (2000) S628–S632. doi:10.1067/mai.2000.106154.
- [41] E.D. Bateman, S.S. Hurd, P.J. Barnes, J. Bousquet, J.M. Drazen, M. FitzGerald, et al., Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, *Eur. Respir. J.* 31 (2008) 143–178. doi:10.1183/09031936.00138707.
- [42] B.S. Bochner, W.W. Busse, Allergy and asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 115 (2005) 953–959. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.032.
- [43] M.Y. Kwok, C.M. Walsh-Kelly, M.H. Gorelick, L. Grabowski, K.J. Kelly, National Asthma Education and Prevention Program Severity Classification as a Measure of Disease Burden in Children With Acute Asthma, *Pediatrics.* 117 (2006) S71–S77. doi:10.1542/peds.2005-2000D.
- [44] K. Nakagome, M. Nagata, Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma, *Auris. Nasus. Larynx.* 38 (2011) 555–563. doi:10.1016/j.anl.2011.01.011.
- [45] E. Wigenstam, S. Jonasson, B. Koch, A. Bucht, Corticosteroid treatment inhibits airway hyperresponsiveness and lung injury in a murine model of chemical-induced airway inflammation, *Toxicology.* 301 (2012) 66–71. doi:10.1016/j.tox.2012.06.020.
- [46] D.H. Broide, F. Finkelman, B.S. Bochner, M.E. Rothenberg, Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010, *J. Allergy Clin. Immunol.* 127 (2011) 689–695. doi:10.1016/j.jaci.2011.01.027.
- [47] C. Caux, C. Massacrier, C. Dezutter-Dambuyant, B. Vanbervliet, C. Jacquet, D. Schmitt, et al., Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34+ progenitors can prime naive CD4+ T cells and process soluble antigen., *J. Immunol.* 155 (1995) 5427–5435.
- [48] G.D. Prete, M.D. Carli, F. Almerigogna, M.G. Giudizi, R. Biagiotti, S. Romagnani, Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production., *J. Immunol.* 150 (1993) 353–360.
- [49] D.T. Umetsu, R.H. DeKruyff, Natural killer T cells are important in the pathogenesis of asthma: The many pathways to asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) 975–979. doi:10.1016/j.jaci.2010.02.006.

- [50] M. Humbert, Cytokines pro-éosinophiles et maladie asthmatique, *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 38 (1998) 50–55. doi:10.1016/S0335-7457(98)80018-X.
- [51] S.T. Holgate, R. Polosa, Treatment strategies for allergy and asthma, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 218–230. doi:10.1038/nri2262.
- [52] P.-O. Girodet, A. Casset, A. Magnan, F. de Blay, P. Chanez, J.M. Tunon De Lara, Immunoglobuline E et maladies respiratoires, *Rev. Mal. Respir.* 22 (2005) 967–981. doi:10.1016/S0761-8425(05)85728-6.
- [53] P.J. Barnes, S. Pedersen, Efficacy and Safety of Inhaled Corticosteroids in Asthma, *Am. Rev. Respir. Dis.* 148 (1993) S1–S26. doi:10.1164/ajrccm/148.4_Pt_2.S1.
- [54] S.T. Holgate, R. Polosa, Treatment strategies for allergy and asthma, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 218–230. doi:10.1038/nri2262.
- [55] I. Stelmach, T. Grzelewski, P. Majak, J. Jerzynska, W. Stelmach, P. Kuna, Effect of different antiasthmatic treatments on exercise-induced bronchoconstriction in children with asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (2008) 383–389. doi:10.1016/j.jaci.2007.09.007.
- [56] J.H. Toogood, Side effects of inhaled corticosteroids, *J. Allergy Clin. Immunol.* 102 (1998) 705–713. doi:10.1016/S0091-6749(98)70007-7.
- [57] D. Brocklebank, F. Ram, J. Wright, P. Barry, C. Cates, L. Davies, et al., Comparison of the effectiveness of inhaler devices in asthma and chronic obstructive airways disease: a systematic review of the literature, *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* 5 (2001) 1–149.
- [58] J.C. Hogg, F. Chu, S. Utokaparch, R. Woods, W.M. Elliott, L. Buzatu, et al., The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 2645–2653. doi:10.1056/NEJMoa032158.
- [59] P.S. Burge, P.M.A. Calverley, P.W. Jones, S. Spencer, J.A. Anderson, T.K. Maslen, Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial, *BMJ.* 320 (2000) 1297–1303. doi:10.1136/bmj.320.7245.1297.
- [60] R.A. Pauwels, J.C. Yernault, M.G. Demedts, P. Geusens, Safety and Efficacy of Fluticasone and Beclomethasone in Moderate to Severe Asthma, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157 (1998) 827–832. doi:10.1164/ajrccm.157.3.9610009.
- [61] P.S. Burge, P.M.A. Calverley, P.W. Jones, S. Spencer, J.A. Anderson, T.K. Maslen, Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial, *BMJ.* 320 (2000) 1297–1303. doi:10.1136/bmj.320.7245.1297.
- [62] P.M.A. Calverley, J.A. Anderson, B. Celli, G.T. Ferguson, C. Jenkins, P.W. Jones, et al., Salmeterol and Fluticasone Propionate and Survival in Chronic Obstructive Pulmonary Disease, *N. Engl. J. Med.* 356 (2007) 775–789. doi:10.1056/NEJMoa063070.
- [63] P.M. Calverley, W. Boonsawat, Z. Cseke, N. Zhong, S. Peterson, H. Olsson, Maintenance therapy with budesonide and formoterol in chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J.* 22 (2003) 912–919. doi:10.1183/09031936.03.00027003.
- [64] W. Szafranski, A. Cukier, A. Ramirez, G. Menga, R. Sansores, S. Nahabedian, et al., Efficacy and safety of budesonide/formoterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J.* 21 (2003) 74–81. doi:10.1183/09031936.03.00031402.
- [65] O. De, A. S, B. J, H. P, M. D, B. M, et al., Canadian Thoracic Society recommendations for management of chronic obstructive pulmonary disease--2003., *Can. Respir. J. J. Can. Thorac. Soc.* 10 Suppl A (2002) 11A–65A.
- [66] R. Siva, R.H. Green, C.E. Brightling, M. Shelley, B. Hargadon, S. McKenna, et al., Eosinophilic airway inflammation and exacerbations of COPD: a randomised controlled trial, *Eur. Respir. J.* 29 (2007) 906–913. doi:10.1183/09031936.00146306.
- [67] M. Hoppentocht, P. Hagedoorn, H.W. Frijlink, A.H. de Boer, Developments and strategies for inhaled antibiotic drugs in tuberculosis therapy: A critical evaluation, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 23–30. doi:10.1016/j.ejpb.2013.10.019.
- [68] B.E. Gilbert, V. Knight, Pulmonary delivery of antiviral drugs in liposome aerosols, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 7 (1996) 148–154. doi:10.1016/S1045-1870(96)81012-0.

- [69] Recherche : Triamcinolone acetonide - Vidal.fr, (n.d.). <http://www.vidal.fr/recherche/index/q:Triamcinolone+acetonide/> (accessed March 28, 2015).
- [70] J.H. Toogood, F.A. White, J.C. Baskerville, L.J. Fraher, B. Jennings, Comparison of the antiasthmatic, oropharyngeal, and systemic glucocorticoid effects of budesonide administered through a pressurized aerosol plus spacer or the Turbuhaler dry powder inhaler, *J. Allergy Clin. Immunol.* 99 (1997) 186–193. doi:10.1016/S0091-6749(97)70094-0.
- [71] B. Pj, Effect of corticosteroids on airway hyperresponsiveness., *Am. Rev. Respir. Dis.* 141 (1990) S70–6.
- [72] L.A. Laitinen, A. Laitinen, T. Haahtela, A comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and a β_2 -agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: A randomized, double-blind, parallel-group controlled trial, *J. Allergy Clin. Immunol.* 90 (1992) 32–42. doi:10.1016/S0091-6749(06)80008-4.
- [73] E.H. Bel, M.C. Timmers, A.H. Zwinderman, J.H. Dijkman, P.J. Sterk, The Effect of Inhaled Corticosteroids on the Maximal Degree of Airway Narrowing to Methacholine in Asthmatic Subjects, *Am. Rev. Respir. Dis.* 143 (1991) 109–113. doi:10.1164/ajrccm/143.1.109.
- [74] Ernst P, Spitzer WO, Suissa S, et al, Risk of fatal and near-fatal asthma in relation to inhaled corticosteroid use, *JAMA.* 268 (1992) 3462–3464. doi:10.1001/jama.1992.03490240070039.
- [75] D.B. Allen, L. Bielory, H. Derendorf, R. Dluhy, G.L. Colice, S.J. Szeffler, Inhaled corticosteroids: past lessons and future issues, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) S1–40.
- [76] A. Tunek, K. Sjödin, G. Hallström, Reversible Formation of Fatty Acid Esters of Budesonide, an Antiasthma Glucocorticoid, in Human Lung and Liver Microsomes, *Drug Metab. Dispos.* 25 (1997) 1311–1317.
- [77] A. Miller-Larsson, H. Mattsson, E. Hjertberg, M. Dahlbäck, A. Tunek, R. Brattsand, Reversible Fatty Acid Conjugation of Budesonide Novel Mechanism for Prolonged Retention of Topically Applied Steroid in Airway Tissue, *Drug Metab. Dispos.* 26 (1998) 623–630.
- [78] H. Derendorf, Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety, *Respir. Med.* 91, Supplement 1 (1997) 22–28. doi:10.1016/S0954-6111(97)90102-5.
- [79] H. Derendorf, G. Hochhaus, B. Meibohm, H. Möllmann, J. Barth, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids, *J. Allergy Clin. Immunol.* 101 (1998) S440–S446. doi:10.1016/S0091-6749(98)70156-3.
- [80] S.J. Szeffler, J. Herron, M. Lloyd, S. Rohatagi, J.E. Williams, S. Kundu, et al., High doses of the novel inhaled steroid ciclesonide have no effect on HPA-axis function in patients with moderate-to-severe persistent asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) S216. doi:10.1016/S0091-6749(03)80749-2.
- [81] C.F. LaForce, J.W. Baker, D. Amin, S. Rohatagi, P. Mendes, J. Williams, et al., Ciclesonide, a novel inhaled steroid, has no effect on hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA)-axis function in mild-to-moderate asthmatics, *J. Allergy Clin. Immunol.* 111 (2003) S218. doi:10.1016/S0091-6749(03)80755-8.
- [82] P.T. Daley-Yates, A.C. Price, J.R. Sisson, A. Pereira, N. Dallow, Beclomethasone dipropionate: absolute bioavailability, pharmacokinetics and metabolism following intravenous, oral, intranasal and inhaled administration in man, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 51 (2001) 400–409. doi:10.1046/j.0306-5251.2001.01374.x.
- [83] A.E. Mackie, J.E. McDowall, P. Ventresca, A. Bye, C. Falcoz, P.T. Daley-Yates, Systemic Exposure to Fluticasone Propionate Administered via Metered-Dose Inhaler Containing Chlorofluorocarbon or Hydrofluoroalkane Propellant, *Clin. Pharmacokinet.* 39 (2012) 17–22. doi:10.2165/00003088-200039001-00003.
- [84] L. Thorsson, C. Kenyon, S.P. Newman, L. Borgström, Lung deposition of budesonide in asthmatics: a comparison of different formulations, *Int. J. Pharm.* 168 (1998) 119–127. doi:10.1016/S0378-5173(98)00087-8.
- [85] S. Rohatagi, A. Bye, C. Falcoz, A.E. Mackie, B. Meibohm, H. Möllmann, et al., Dynamic Modeling of Cortisol Reduction after Inhaled Administration of Fluticasone Propionate, *J. Clin. Pharmacol.* 36 (1996) 938–941. doi:10.1002/j.1552-4604.1996.tb04761.x.
- [86] H. Derendorf, Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety, *Respir. Med.* 91, Supplement 1 (1997) 22–28. doi:10.1016/S0954-6111(97)90102-5.
- [87] I. Tillie-Leblond, C. Iliescu, A. Deschildre, Physiopathologie de la réaction inflammatoire dans l'asthme, *Arch. Pédiatrie.* 11, Supplement 2 (2004) S58–S64. doi:10.1016/S0929-693X(04)90001-2.

- [88] W.K. Dolen, Inhaled Glucocorticoids in Asthma: Mechanisms and Clinical Actions, *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 81 (1998) 186. doi:10.1016/S1081-1206(10)62809-8.
- [89] F.D. Finkelman, J.A. Boyce, D. Vercelli, M.E. Rothenberg, Key advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2009, *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010) 312–318. doi:10.1016/j.jaci.2009.12.936.
- [90] R. Dahl, Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma, *Respir. Med.* 100 (2006) 1307–1317. doi:10.1016/j.rmed.2005.11.020.
- [91] P.H. Brown, G. Blundell, A.P. Greening, G.K. Crompton, Do large volume spacer devices reduce the systemic effects of high dose inhaled corticosteroids?, *Thorax.* 45 (1990) 736–739. doi:10.1136/thx.45.10.736.
- [92] P.H. Brown, A.P. Greening, G.K. Crompton, Large volume spacer devices and the influence of high dose beclomethasone dipropionate on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function., *Thorax.* 48 (1993) 233–238. doi:10.1136/thx.48.3.233.
- [93] T. Jh, J. B, B. J, A. J, J. Sa, Dosing regimen of budesonide and occurrence of oropharyngeal complications., *Eur. J. Respir. Dis.* 65 (1984) 35–44.
- [94] A.J. Williams, M.S. Baghat, D.E. Stableforth, R.M. Cayton, P.M. Sheno, C. Skinner, Dysphonia caused by inhaled steroids: recognition of a characteristic laryngeal abnormality., *Thorax.* 38 (1983) 813–821. doi:10.1136/thx.38.11.813.
- [95] O. Selroos, M. Halme, Effect of a volumatic spacer and mouth rinsing on systemic absorption of inhaled corticosteroids from a metered dose inhaler and dry powder inhaler., *Thorax.* 46 (1991) 891–894. doi:10.1136/thx.46.12.891.
- [96] L. Cg, M. T, S. N, Glucocorticoids and asthma. Studies of resistance and systemic effects of glucocorticoids., *Eur. J. Respir. Dis. Suppl.* 136 (1983) 69–79.
- [97] S. Pedersen, G. Fuglsang, Urine cortisol excretion in children treated with high doses of inhaled corticosteroids: a comparison of budesonide and beclomethasone, *Eur. Respir. J.* 1 (1988) 433–435.
- [98] C.R. Keenan, D. Radojicic, M. Li, A. Radwan, A.G. Stewart, Heterogeneity in mechanisms influencing glucocorticoid sensitivity: The need for a systems biology approach to treatment of glucocorticoid-resistant inflammation, *Pharmacol. Ther.* (n.d.). doi:10.1016/j.pharmthera.2015.01.006.
- [99] D. Dusser, D. Montani, P. Chanez, J. De Blic, C. Delacourt, A. Deschildre, et al., Mild asthma: an expert review on epidemiology, clinical characteristics and treatment recommendations, *Allergy.* 62 (2007) 591–604. doi:10.1111/j.1398-9995.2007.01394.x.
- [100] E. Callard preedy, P. Prokopovich, 2 - History of inhaler devices, in: P. Prokopovich (Ed.), *Inhaler Devices*, Woodhead Publishing, 2013; pp. 13–28. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978085709496450002X> (accessed April 2, 2015).
- [101] K. Nikander, M. Turpeinen, P. Wollmer, The Conventional Ultrasonic Nebulizer Proved Inefficient in Nebulizing a Suspension, *J. Aerosol Med.* 12 (1999) 47–53. doi:10.1089/jam.1999.12.47.
- [102] B. Dautzenberg, M.H. Becquemin, J.P. Chaumuzeau, P. Diot, Bonnes pratiques de l'aérosolthérapie par nébulisation, *Rev. Mal. Respir.* 24 (2007) 751–757. doi:10.1016/S0761-8425(07)91149-3.
- [103] Aérosolthérapie par Nébulisation - Le Moniteur des Pharmacies n° 2805 du 28/11/2009-Revues- Le Moniteur des pharmacies.fr, *Monit. Pharm.* (n.d.). <http://www.lemoniteurdespharmacies.fr/revues/le-moniteur-des-pharmacies/sommaire-du-dernier-numero/n-2805/aerosoltherapie-par-nebulisation.html> (accessed April 15, 2015).
- [104] I.J. Smith, M. Parry-Billings, The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16 (2003) 79–95. doi:10.1016/S1094-5539(02)00147-5.
- [105] Running a domiciliary nebuliser service - Google Scholar, (n.d.). https://scholar.google.fr/scholar?q=Running+a+domiciliary+nebuliser+service&btnG=&hl=fr&as_sdt=0%2C5 (accessed April 12, 2015).
- [106] G.C. Smaldone, Assessing New Technologies: Patient-Device Interactions and Deposition, *Respir. Care.* 50 (2005) 1151–1160.
- [107] The Montreal Protocol, (n.d.). http://ozone.unep.org/new_site/fr/montreal_protocol.php (accessed March 23, 2015).

- [108] F. T. Medihaler therapy for bronchial asthma; a new type of aerosol therapy., *Postgrad. Med.* 20 (1956) 667–673.
- [109] G. Pitcairn, S. Reader, D. Pavia, S. Newman, Deposition of Corticosteroid Aerosol in the Human Lung by Respimat® Soft Mist™ Inhaler Compared to Deposition by Metered Dose Inhaler or by Turbuhaler® Dry Powder Inhaler, *J. Aerosol Med.* 18 (2005) 264–272. doi:10.1089/jam.2005.18.264.
- [110] R. Dalby, M. Spallek, T. Voshaar, A review of the development of Respimat® Soft Mist™ Inhaler, *Int. J. Pharm.* 283 (2004) 1–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.06.018.
- [111] S.P. Newman, J. Brown, K.P. Steed, S.J. Reader, H. Kladders, Lung deposition of fenoterol and flunisolide delivered using a novel device for inhaled medicines : Comparison of respimat with conventional metered-dose inhalers with and without spacer devices, *Chest.* 113 (1998) 957–963. doi:10.1378/chest.113.4.957.
- [112] H.-K. Chan, E. Daviskas, S. Eberl, M. Robinson, G. Bautovich, I. Young, Deposition of aqueous aerosol of technetium-99m diethylene triamine penta-acetic acid generated and delivered by a novel system (AERx) in healthy subjects, *Eur. J. Nucl. Med.* 26 (1999) 320–327. doi:10.1007/s002590050393.
- [113] S. Sangwan, J.M. Agosti, L.A. Bauer, B.A. Otulana, R.J. Morishige, D.C. Cipolla, et al., Aerosolized Protein Delivery in Asthma: Gamma Camera Analysis of Regional Deposition and Perfusion, *J. Aerosol Med.* 14 (2001) 185–195. doi:10.1089/08942680152484117.
- [114] M. Enayati, M.-W. Chang, F. Bragman, M. Edirisinghe, E. Stride, Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* 382 (2011) 154–164. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.11.038.
- [115] J. Xie, J.C.M. Marijnissen, C.-H. Wang, Microparticles developed by electrohydrodynamic atomization for the local delivery of anticancer drug to treat C6 glioma in vitro, *Biomaterials.* 27 (2006) 3321–3332. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.034.
- [116] A. Rezvanpour, W.B. Krantz, C.-H. Wang, Scaling analysis of the electrohydrodynamic atomization (EHDA) process for pharmaceutical particle fabrication, *Chem. Eng. Sci.* 80 (2012) 81–90. doi:10.1016/j.ces.2012.06.007.
- [117] R.P.A. Hartman, J.-P. Borra, D.J. Brunner, J.C.M. Marijnissen, B. Scarlett, The evolution of electrohydrodynamic sprays produced in the cone-jet mode, a physical model, *J. Electrostat.* 47 (1999) 143–170. doi:10.1016/S0304-3886(99)00034-0.
- [118] J.D. Rabinowitz, M. Wensley, P. Lloyd, D. Myers, W. Shen, A. Lu, et al., Fast Onset Medications through Thermally Generated Aerosols, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309 (2004) 769–775. doi:10.1124/jpet.103.062893.
- [119] J.D. Rabinowitz, P.M. Lloyd, P. Munzar, D.J. Myers, S. Cross, R. Damani, et al., Ultra-fast absorption of amorphous pure drug aerosols via deep lung inhalation, *J. Pharm. Sci.* 95 (2006) 2438–2451. doi:10.1002/jps.20694.
- [120] G. Reychler, J.F. Dessanges, L. Vecellio, Aérosols : présent et futur, *Rev. Mal. Respir.* 24 (2007) 1013–1023. doi:10.1016/S0761-8425(07)92765-5.
- [121] R.M. Auty, K. Brown, M.G. Neale, P.D. Snashall, Respiratory tract deposition of sodium cromoglycate is highly dependent upon technique of inhalation using the spinhaler, *Br. J. Dis. Chest.* 81 (1987) 371–380. doi:10.1016/0007-0971(87)90186-0.
- [122] A.H. Jones, C.G. Langdon, P.S. Lee, S.A. Lingham, J.P. Nankani, R.M.A. Follows, et al., Pulmicort® turbuhaler® once daily as initial prophylactic therapy for asthma, *Respir. Med.* 88 (1994) 293–299. doi:10.1016/0954-6111(94)90059-0.
- [123] A comparison of the lung deposition of budesonide from Easyhaler®, Turbuhaler® and pMDI plus spacer in asthmatic patients, (n.d.). <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S09546111101911072> (accessed April 14, 2015).
- [124] J.M. Negro Álvarez, J.C. Miralles López, R. Félix Toledo, J.A. Pagán Alemán, F.J. García Sellés, J.D. López Sánchez, et al., Pressurised metered-dose inhalers (MDIs) versus dry powder inhalers devices (DPIs) to rapid-acting inhaled β_2 -agonists for asthma in children, *Allergol. Immunopathol. (Madr.).* 30 (2002) 245–249. doi:10.1016/S0301-0546(02)79129-5.
- [125] L. Thorsson, D. Geller, Factors guiding the choice of delivery device for inhaled corticosteroids in the long-term management of stable asthma and COPD: Focus on budesonide, *Respir. Med.* 99 (2005) 836–849. doi:10.1016/j.rmed.2005.02.012.

- [126] M. AUBIER, R. WETTENGER, S.J.M. GANS, Efficacy of HFA-beclomethasone dipropionate extra-fine aerosol (800 μ g day⁻¹) versus HFA-fluticasone propionate (1000 μ g day⁻¹) in patients with asthma, *Respir. Med.* 95 (2001) 212–220. doi:10.1053/rmed.2000.1025.
- [127] C.L. Leach, P.J. Davidson, R.J. Boudreau, Improved airway targeting with the CFC-free HFA-beclomethasone metered-dose inhaler compared with CFC-beclomethasone, *Eur. Respir. J.* 12 (1998) 1346–1353.
- [128] M. Govoni, A. Piccinno, G. Lucci, G. Poli, D. Acerbi, R. Baronio, et al., The systemic exposure to inhaled beclomethasone/formoterol pMDI with valved holding chamber is independent of age and body size, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 30 (2015) 102–109. doi:10.1016/j.pupt.2014.04.003.
- [129] B.L. Chawes, M. Govoni, E. Kreiner-Møller, N.H. Vissing, P. Poorisrisak, L. Mortensen, et al., Systemic exposure to inhaled beclomethasone/formoterol DPI is age and body size dependent, *Respir. Med.* 108 (2014) 1108–1116. doi:10.1016/j.rmed.2014.05.007.
- [130] J.G. Ayres, A.B. Millar, A.P. Sykes, Clinical efficacy and safety of fluticasone propionate 1 mg twice daily administered via a HFA 134a pressurized metered dose inhaler to patients with severe asthma, *Respir. Med.* 94, Supplement 2 (2000) S42–S50. doi:10.1016/S0954-6111(00)80149-3.
- [131] K. Blake, R. Mehta, T. Spencer, R.L. Kunka, L. Hendeles, Bioavailability of inhaled fluticasone propionate via chambers/masks in young children, *Eur. Respir. J.* 39 (2012) 97–103. doi:10.1183/09031936.00185510.
- [132] A.B. Tonnel, J. Bons, M. Legendre, A. Prud'Homme, B. Bugnas, I. Evano-Celli, et al., Clinical efficacy and safety of fluticasone propionate 250 μ g twice daily administered via a HFA 134a pressurized metered dose inhaler to patients with mild to moderate asthma, *Respir. Med.* 94, Supplement 2 (2000) S29–S34. doi:10.1016/S0954-6111(00)80147-X.
- [133] T. Sebti, F. Vanderbist, K. Amighi, Evaluation of the content homogeneity and dispersion properties of fluticasone DPI compositions, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 17 (2007) 223–229. doi:10.1016/S1773-2247(07)50040-7.
- [134] J. Steinfeld, G. Yiu, S.D. Miller, Dose-Ranging Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Four Doses of Fluticasone Propionate/Salmeterol Multidose Dry Powder Inhaler (FS MDPI) Compared with Fluticasone Propionate (Fp) MDPI and FS DPI in Subjects with Persistent Asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 135 (2015) AB6. doi:10.1016/j.jaci.2014.12.954.
- [135] D.S. Pearlman, D. Peden, J.J. Condemi, S. Weinstein, M. White, L. Baitinger, et al., Efficacy and Safety of Fluticasone Propionate/Salmeterol HFA 134A MDI in Patients with Mild-to-Moderate Persistent Asthma, *J. Asthma.* 41 (2004) 797–806. doi:10.1081/JAS-200038368.
- [136] A. Cukier, C.M.A. Jacob, N.A. Rosario Filho, J. Fiterman, E.O. Vianna, J.L. Hetzel, et al., Fluticasone/formoterol dry powder versus budesonide/formoterol in adults and adolescents with uncontrolled or partly controlled asthma, *Respir. Med.* 107 (2013) 1330–1338. doi:10.1016/j.rmed.2013.06.018.
- [137] B. Johal, M. Howald, M. Fischer, J. Marshall, G. Venthoye, Fine Particle Profile of Fluticasone Propionate/Formoterol Fumarate Versus Other Combination Products: the DIFFUSE Study, *Comb. Prod. Ther.* 3 (2013) 39–51. doi:10.1007/s13556-013-0003-9.
- [138] A. Papi, D. Price, J. Sastre, K. Kaiser, M. Lomax, T. McIver, et al., Efficacy of fluticasone propionate/formoterol fumarate in the treatment of asthma: A pooled analysis, *Respir. Med.* 109 (2015) 208–217. doi:10.1016/j.rmed.2014.10.019.
- [139] K. McKeage, Fluticasone Propionate/Formoterol Fumarate: A Review of Its Use in Persistent Asthma, *Drugs.* 73 (2013) 195–206. doi:10.1007/s40265-013-0016-4.
- [140] D.J. Ball, P.H. Hirst, S.P. Newman, B. Sonet, B. Streef, F. Vanderbist, Deposition and pharmacokinetics of budesonide from the Miat Monodose inhaler, a simple dry powder device, *Int. J. Pharm.* 245 (2002) 123–132. doi:10.1016/S0378-5173(02)00338-1.
- [141] T. Engel, J.H. Heinig, H.-J. Malling, B. Scharling, K. Nikander, F. Madsen, Clinical comparison of inhaled budesonide delivered either via pressurized metered dose inhaler or Turbuhaler®, *Allergy.* 44 (1989) 220–225. doi:10.1111/j.1398-9995.1989.tb02266.x.
- [142] T.E. Tarara, M.S. Hartman, H. Gill, A.A. Kennedy, J.G. Weers, Characterization of Suspension-Based Metered Dose Inhaler Formulations Composed of Spray-Dried Budesonide Microcrystals Dispersed in HFA-134a, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1607–1614. doi:10.1023/B:PHAM.0000041455.13980.f1.

- [143] F.C. Hampel Jr., P. Martin, W.S. Mezzanotte, Early Bronchodilatory Effects of Budesonide/Formoterol Pressurized Metered-Dose Inhaler (pMDI) Compared With Fluticasone Propionate/Salmeterol Dry Powder Inhaler (DPI) and Albuterol pMDI in Adults With Asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121 (2008) S220–S221. doi:10.1016/j.jaci.2007.12.872.
- [144] J. Zangrilli, L.E. Mansfield, T. Uryniak, C.D. O'Brien, Efficacy of budesonide/formoterol pressurized metered-dose inhaler versus budesonide pressurized metered-dose inhaler alone in Hispanic adults and adolescents with asthma: a randomized, controlled trial, *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 107 (2011) 258–265.e2. doi:10.1016/j.anai.2011.05.024.
- [145] L. Blais, A. Forget, S. Ramachandran, Relative effectiveness of budesonide/formoterol and fluticasone propionate/salmeterol in a 1-year, population-based, matched cohort study of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD): Effect on COPD-related exacerbations, emergency department visits and hospitalizations, medication utilization, and treatment adherence, *Clin. Ther.* 32 (2010) 1320–1328. doi:10.1016/j.clinthera.2010.06.022.
- [146] S. Newman, A. Salmon, R. Nave, A. Drollmann, High lung deposition of ^{99m}Tc-labeled ciclesonide administered via HFA-MDI to patients with asthma, *Respir. Med.* 100 (2006) 375–384. doi:10.1016/j.rmed.2005.09.027.
- [147] T. Teramoto, E. Matsui, T. Fukao, K. Sakai, H. Yonezawa, Z. Kato, et al., Repeated-Dose Pharmacokinetics of Inhaled Ciclesonide (CIC-HFA) in Japanese Children with Bronchial Asthma: A Phase I Study, *Allergol. Int.* 61 (2012) 619–624. doi:10.2332/allergolint.11-OA-0378.
- [148] C.G. Langdon, M. Adler, S. Mehra, M. Alexander, A. Drollmann, Once-daily ciclesonide 80 or 320 µg for 12 weeks is safe and effective in patients with persistent asthma, *Respir. Med.* 99 (2005) 1275–1285. doi:10.1016/j.rmed.2005.05.024.
- [149] B. O'Connor, G. Bonnaud, T. Haahtela, J.M. Luna, H. Querfurt, T. Wegener, et al., Dose-ranging study of mometasone furoate dry powder inhaler in the treatment of moderate persistent asthma using fluticasone propionate as an active comparator, *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 86 (2001) 397–404. doi:10.1016/S1081-1206(10)62485-4.
- [150] A. Wardlaw, P. Larivee, J. Eller, D.W. Cockcroft, L. Ghaly, A.G. Harris, Efficacy and safety of mometasone furoate dry powder inhaler vs fluticasone propionate metered-dose inhaler in asthma subjects previously using fluticasone propionate, *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* 93 (2004) 49–55. doi:10.1016/S1081-1206(10)61446-9.
- [151] G. Caramori, K.F. Chung, I.M. Adcock, Profile of fluticasone furoate/vilanterol dry powder inhaler combination therapy as a potential treatment for COPD, *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 9 (2014) 249–256. doi:10.2147/COPD.S32604.
- [152] A. Dj, L. Se, An overview of the toxicology of HFA-134a (1,1,1,2-tetrafluoroethane), *Hum. Exp. Toxicol.* 14 (1995) 715–720.
- [153] G. Colombo, C. Terzano, P. Colombo, A. Petroianni, A. Ricci, F. Buttini, Methacholine dry powder inhaler as a new tool for bronchial challenge test, *Int. J. Pharm.* 352 (2008) 165–171. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.10.025.
- [154] A. Nolting, S. Sista, W. Abramowitz, Single-dose study to compare the pharmacokinetics of HFA flunisolide and CFC flunisolide, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 424–432. doi:10.1002/jps.10030.
- [155] M. j. Kontny, G. Destefano, P. d. Jager, D. p. McNAMARA, J. s. Turi, L. Van Campen, Issues Surrounding MDI Formulation Development with Non-CFC Propellants, *J. Aerosol Med.* 4 (1991) 181–187. doi:10.1089/jam.1991.4.181.
- [156] P. Rogueda, Novel hydrofluoroalkane suspension formulations for respiratory drug delivery, *Expert Opin. Drug Deliv.* 2 (2005) 625–638. doi:10.1517/17425247.2.4.625.
- [157] R.O. Williams III, J. Liu, Formulation of a protein with propellant HFA 134a for aerosol delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 7 (1999) 137–144. doi:10.1016/S0928-0987(98)00015-3.
- [158] D. Ganderton, D. Lewis, R. Davies, B. Meakin, G. Brambilla, T. Church, Modulite®: a means of designing the aerosols generated by pressurized metered dose inhalers, *Respir. Med.* 96, Supplement 4 (2002) S3–S8. doi:10.1016/S0954-6111(02)80018-X.
- [159] R. Ashayer, P.F. Luckham, S. Manimaaran, P. Rogueda, Investigation of the molecular interactions in a pMDI formulation by atomic force microscopy, *Eur. J. Pharm. Sci.* 21 (2004) 533–543. doi:10.1016/j.ejps.2003.12.003.

- [160] J.D. Brain, Inhalation, Deposition, and Fate of Insulin and Other Therapeutic Proteins, *Diabetes Technol. Ther.* 9 (2007) S–4. doi:10.1089/dia.2007.0228.
- [161] K. Thalberg, D. Lindholm, A. Axelsson, Comparison of different flowability tests for powders for inhalation, *Powder Technol.* 146 (2004) 206–213. doi:10.1016/j.powtec.2004.08.003.
- [162] X. Ming Zeng, G.P. Martin, C. Marriott, J. Pritchard, The use of lactose recrystallised from carbopol gels as a carrier for aerosolised salbutamol sulphate, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 51 (2001) 55–62. doi:10.1016/S0939-6411(00)00142-9.
- [163] S.S. Desai, A.A. Aher, P.T. Kadaskar, Methods for reduction of cohesive forces between carrier and drug in DPI formulation, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39 (2012) 1589–1598. doi:10.3109/03639045.2012.728229.
- [164] J.A. Hersey, Ordered mixing: A new concept in powder mixing practice, *Powder Technol.* 11 (1975) 41–44. doi:10.1016/0032-5910(75)80021-0.
- [165] Q. (Tony) Zhou, D.A.V. Morton, Drug–lactose binding aspects in adhesive mixtures: Controlling performance in dry powder inhaler formulations by altering lactose carrier surfaces, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 275–284. doi:10.1016/j.addr.2011.07.002.
- [166] I.J. Smith, M. Parry-Billings, The inhalers of the future? A review of dry powder devices on the market today, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 16 (2003) 79–95. doi:10.1016/S1094-5539(02)00147-5.
- [167] P.G.C. Petean, M.L. Aguiar, Determining the adhesion force between particles and rough surfaces, *Powder Technol.* 274 (2015) 67–76. doi:10.1016/j.powtec.2014.12.047.
- [168] G. Pilcer, K. Amighi, Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery, *Int. J. Pharm.* 392 (2010) 1–19. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.017.
- [169] P. Begat, D.A.V. Morton, J.N. Staniforth, R. Price, The Cohesive-Adhesive Balances in Dry Powder Inhaler Formulations I: Direct Quantification by Atomic Force Microscopy, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1591–1597. doi:10.1023/B:PHAM.0000041453.24419.8a.
- [170] D. Traini, P.M. Young, F. Thielmann, M. Acharya, The Influence of Lactose Pseudopolymorphic Form on Salbutamol Sulfate–Lactose Interactions in DPI Formulations, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 34 (2008) 992–1001. doi:10.1080/03639040802154889.
- [171] P.M. Young, D. Cocconi, P. Colombo, R. Bettini, R. Price, D.F. Steele, et al., Characterization of a surface modified dry powder inhalation carrier prepared by “particle smoothing,” *J. Pharm. Pharmacol.* 54 (2002) 1339–1344. doi:10.1211/002235702760345400.
- [172] D. Lu, A.J. Hickey, Liposomal dry powders as aerosols for pulmonary delivery of proteins, *AAPS PharmSciTech.* 6 (2005) E641–E648. doi:10.1208/pt060480.
- [173] M. Chougule, B. Padhi, A. Misra, Development of Spray Dried Liposomal Dry Powder Inhaler of Dapsone, *AAPS PharmSciTech.* 9 (2008) 47–53. doi:10.1208/s12249-007-9024-6.
- [174] K. Edwards, M. Johnsson, G. Karlsson, M. Silvander, Effect of polyethyleneglycol-phospholipids on aggregate structure in preparations of small unilamellar liposomes., *Biophys. J.* 73 (1997) 258–266.
- [175] I.W. Kellaway, S.J. Farr, Liposomes as drug delivery systems to the lung, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 5 (1990) 149–161. doi:10.1016/0169-409X(90)90012-H.
- [176] E. Fattal, N. Tsapis, Nanomedicine technology: current achievements and new trends, *Clin. Transl. Imaging.* 2 (2014) 77–87. doi:10.1007/s40336-014-0053-3.
- [177] G. Blume, G. Cevc, Liposomes for the sustained drug release in vivo, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1029 (1990) 91–97. doi:10.1016/0005-2736(90)90440-Y.
- [178] P. Muralidharan, E. Mallory, M. Malapit, D. Hayes, H.M. Mansour, Inhalable PEGylated Phospholipid Nanocarriers and PEGylated Therapeutics for Respiratory Delivery as Aerosolized Colloidal Dispersions and Dry Powder Inhalers, *Pharmaceutics.* 6 (2014) 333–353. doi:10.3390/pharmaceutics6020333.
- [179] R. Díaz-López, D. Libong, N. Tsapis, E. Fattal, P. Chaminade, Quantification of pegylated phospholipids decorating polymeric microcapsules of perfluorooctyl bromide by reverse phase HPLC with a charged aerosol detector, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 702–707. doi:10.1016/j.jpba.2008.06.027.
- [180] B. Ozbakir, B.J. Crielaard, J.M. Metselaar, G. Storm, T. Lammers, Liposomal corticosteroids for the treatment of inflammatory disorders and cancer, *J. Controlled Release.* 190 (2014) 624–636. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.039.

- [181] W. Wijagkanalan, Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Teshima, H. Sasaki, M. Hashida, Enhanced Anti-Inflammation of Inhaled Dexamethasone Palmitate Using Mannosylated Liposomes in an Endotoxin-Induced Lung Inflammation Model, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 1183–1192. doi:10.1124/mol.108.050153.
- [182] H. Benameur, G. De Gand, R. Brasseur, J.P. Van Vooren, F.J. Legros, Liposome-incorporated dexamethasone palmitate: Chemical and physical properties, *Int. J. Pharm.* 89 (1993) 157–167. doi:10.1016/0378-5173(93)90239-C.
- [183] M. Saari, M.T. Vidgren, M.O. Koskinen, V.M.H. Turjanmaa, M.M. Nieminen, Pulmonary distribution and clearance of two beclomethasone liposome formulations in healthy volunteers, *Int. J. Pharm.* 181 (1999) 1–9. doi:10.1016/S0378-5173(98)00398-6.
- [184] R. Vanbever, J.D. Mintzes, J. Wang, J. Nice, D. Chen, R. Batycky, et al., Formulation and Physical Characterization of Large Porous Particles for Inhalation, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1735–1742. doi:10.1023/A:1018910200420.
- [185] V. Codrons, F. Vanderbist, R.K. Verbeeck, M. Arras, D. Lison, V. Pr at, et al., Systemic delivery of parathyroid hormone (1-34) using inhalation dry powders in rats, *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 938–950. doi:10.1002/jps.10346.
- [186] L. Dellamary, D.J. Smith, A. Bloom, S. Bot, G.-R. Guo, H. Deshmuk, et al., Rational design of solid aerosols for immunoglobulin delivery by modulation of aerodynamic and release characteristics, *J. Controlled Release.* 95 (2004) 489–500. doi:10.1016/j.jconrel.2003.12.013.
- [187] T. Yang, F.-D. Cui, M.-K. Choi, J.-W. Cho, S.-J. Chung, C.-K. Shim, et al., Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: In vitro and in vivo evaluation, *Int. J. Pharm.* 338 (2007) 317–326. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.02.011.
- [188] C. Gomez Gaete, Développement de vecteurs hybrides nano/microparticulaires pour la libération de corticostéroïdes, Paris 11, 2007. <http://www.theses.fr/2007PA114822> (accessed April 20, 2015).
- [189] S. Jaspert, Mise au point et évaluation des microparticules lipidiques solides en vue du développement galénique de préparations pour inhalation   libération prolongée/ Development and evaluation of solid lipid microparticles as sustained release system for pulmonary drug delivery, (2007). <http://bictel.ulg.ac.be/ETD-db/collection/available/ULgetd-02092007-143647/> (accessed April 20, 2015).
- [190] E. Fattal, A. Bochot, N. Tsapis, Microtechnologies pour la libération contr l e des molécules fragiles, *Actual. Chim.* (2007) 16–19.
- [191] P. O'Hara, A.J. Hickey, Respirable PLGA Microspheres Containing Rifampicin for the Treatment of Tuberculosis: Manufacture and Characterization, *Pharm. Res.* 17 (2000) 955–961. doi:10.1023/A:1007527204887.
- [192] J. Fu, J. Fiegel, E. Krauland, J. Hanes, New polymeric carriers for controlled drug delivery following inhalation or injection, *Biomaterials.* 23 (2002) 4425–4433. doi:10.1016/S0142-9612(02)00182-5.
- [193] D.J. Armstrong, P.N.C. Elliott, J.L. Ford, D. Gadsdon, G.P. McCarthy, C. Rostron, et al., Poly-(d,l-Lactic Acid) Microspheres Incorporating Histological Dyes for Intra-pulmonary Histopathological Investigations, *J. Pharm. Pharmacol.* 48 (1996) 258–262. doi:10.1111/j.2042-7158.1996.tb05913.x.
- [194] C. Evora, I. Soriano, R.A. Rogers, K.M. Shakesheff, J. Hanes, R. Langer, Relating the phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages to surface chemistry: the effect of 1,2-dipalmitoylphosphatidylcholine, *J. Controlled Release.* 51 (1998) 143–152. doi:10.1016/S0168-3659(97)00149-1.
- [195] J. Fiegel, J. Fu, J. Hanes, Poly(ether-anhydride) dry powder aerosols for sustained drug delivery in the lungs, *J. Controlled Release.* 96 (2004) 411–423. doi:10.1016/j.jconrel.2004.02.018.
- [196] M.T. Newhouse, P.H. Hirst, S.P. Duddu, Y.H. Walter, T.E. Tarara, A.R. Clark, et al., Inhalation of a dry powder tobramycin pulmosphere formulation in healthy volunteers*, *Chest.* 124 (2003) 360–366. doi:10.1378/chest.124.1.360.
- [197] R. Vehring, Pharmaceutical Particle Engineering via Spray Drying, *Pharm. Res.* 25 (2008) 999–1022. doi:10.1007/s11095-007-9475-1.
- [198] S.P. Duddu, S.A. Sisk, Y.H. Walter, T.E. Tarara, K.R. Trimble, A.R. Clark, et al., Improved Lung Delivery from a Passive Dry Powder Inhaler Using an Engineered PulmoSphere® Powder, *Pharm. Res.* 19 (2002) 689–695. doi:10.1023/A:1015322616613.

- [199] S.P. Duddu, S.A. Sisk, Y.H. Walter, T.E. Tarara, K.R. Trimble, A.R. Clark, et al., Improved Lung Delivery from a Passive Dry Powder Inhaler Using an Engineered PulmoSphere® Powder, *Pharm. Res.* 19 (2002) 689–695. doi:10.1023/A:1015322616613.
- [200] D.E. Geller, S. Madge, Technological and behavioral strategies to reduce treatment burden and improve adherence to inhaled antibiotics in cystic fibrosis, *Respir. Med.* 105, Supplement 2 (2011) S24–S31. doi:10.1016/S0954-6111(11)70024-5.
- [201] L. Wang, S. Bot, D. Smith, G.R. Guo, B. Phillips, L. Dellamary, et al., Basic immunological properties of spray-dried lipid microparticles developed for nasal and systemic administration of vaccines, *STP Pharma Sci.* 12 (2002) 53–61.
- [202] J.G. Weers, J. Bell, H.-K. Chan, D. Cipolla, C. Dunbar, A.J. Hickey, et al., Pulmonary Formulations: What Remains to be Done?, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 23 (2010) S–5. doi:10.1089/jamp.2010.0838.
- [203] M.A. Boraey, S. Hoe, H. Sharif, D.P. Miller, D. Lechuga-Ballesteros, R. Vehring, Improvement of the dispersibility of spray-dried budesonide powders using leucine in an ethanol–water cosolvent system, *Powder Technol.* 236 (2013) 171–178. doi:10.1016/j.powtec.2012.02.047.
- [204] J. Raula, F. Thielmann, M. Naderi, V.-P. Lehto, E.I. Kauppinen, Investigations on particle surface characteristics vs. dispersion behaviour of l-leucine coated carrier-free inhalable powders, *Int. J. Pharm.* 385 (2010) 79–85. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.036.
- [205] G. Pilcer, T. Sebti, K. Amighi, Formulation and Characterization of Lipid-Coated Tobramycin Particles for Dry Powder Inhalation, *Pharm. Res.* 23 (2006) 931–940. doi:10.1007/s11095-006-9789-4.
- [206] J. Raula, A. Lähde, E.I. Kauppinen, Aerosolization behavior of carrier-free l-leucine coated salbutamol sulphate powders, *Int. J. Pharm.* 365 (2009) 18–25. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.08.017.
- [207] J. Raula, A. Rahikkala, T. Halkola, J. Pessi, L. Peltonen, J. Hirvonen, et al., Coated particle assemblies for the concomitant pulmonary administration of budesonide and salbutamol sulphate, *Int. J. Pharm.* 441 (2013) 248–254. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.11.036.
- [208] Surface modified aerosol particles, a method and apparatus for production thereof and powders and dispersions containing said particles, n.d. <http://www.google.com/patents/US8349295> (accessed April 30, 2015).
- [209] Y. Kawashima, T. Serigano, T. Hino, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Design of inhalation dry powder of pranlukast hydrate to improve dispersibility by the surface modification with light anhydrous silicic acid (AEROSIL 200), *Int. J. Pharm.* 173 (1998) 243–251. doi:10.1016/S0378-5173(98)00243-9.
- [210] Y. Kawashima, T. Serigano, T. Hino, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Design of inhalation dry powder of pranlukast hydrate to improve dispersibility by the surface modification with light anhydrous silicic acid (AEROSIL 200), *Int. J. Pharm.* 173 (1998) 243–251. doi:10.1016/S0378-5173(98)00243-9.
- [211] Q.T. Zhou, L. Qu, I. Larson, P.J. Stewart, D.A.V. Morton, Improving aerosolization of drug powders by reducing powder intrinsic cohesion via a mechanical dry coating approach, *Int. J. Pharm.* 394 (2010) 50–59. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.04.032.
- [212] K. Stank, H. Steckel, Physico-chemical characterisation of surface modified particles for inhalation, *Int. J. Pharm.* 448 (2013) 9–18. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.03.009.
- [213] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, et al., Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, *Science.* 276 (1997) 1868–1872. doi:10.1126/science.276.5320.1868.
- [214] H.-K. Chan, P.C.L. Kwok, Novel Particle Production Technologies for Inhalation Products, in: P. Colombo, D. Traini, F. Buttini (Eds.), *Inhal. Drug Deliv.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2013: pp. 47–62. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118397145.ch4/summary> (accessed May 28, 2015).
- [215] B. Patel, V. Gupta, F. Ahsan, PEG–PLGA based large porous particles for pulmonary delivery of a highly soluble drug, low molecular weight heparin, *J. Controlled Release.* 162 (2012) 310–320. doi:10.1016/j.jconrel.2012.07.003.
- [216] A. Rawat, Q.H. Majumder, F. Ahsan, Inhalable large porous microspheres of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation, *J. Controlled Release.* 128 (2008) 224–232. doi:10.1016/j.jconrel.2008.03.013.
- [217] F. Ungaro, G. De Rosa, A. Miro, F. Quaglia, M.I. La Rotonda, Cyclodextrins in the production of large porous particles: Development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 28 (2006) 423–432. doi:10.1016/j.ejps.2006.05.005.

- [218] Y. Yang, N. Bajaj, P. Xu, K. Ohn, M.D. Tsifansky, Y. Yeo, Development of highly porous large PLGA microparticles for pulmonary drug delivery, *Biomaterials*. 30 (2009) 1947–1953. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.12.044.
- [219] A. Ben-Jebria, D. Chen, M.L. Eskew, R. Vanbever, R. Langer, D.A. Edwards, Large Porous Particles for Sustained Protection from Carbachol-Induced Bronchoconstriction in Guinea Pigs, *Pharm. Res.* 16 (1999) 555–561. doi:10.1023/A:1018879331061.
- [220] A.M. Healy, M.I. Amaro, K.J. Paluch, L. Tajber, Dry powders for oral inhalation free of lactose carrier particles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 75 (2014) 32–52. doi:10.1016/j.addr.2014.04.005.
- [221] D.-D. Pham, E. Fattal, N. Ghermani, N. Guiblin, N. Tsapis, Formulation of pyrazinamide-loaded large porous particles for the pulmonary route: Avoiding crystal growth using excipients, *Int. J. Pharm.* 454 (2013) 668–677. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.04.016.
- [222] N.Y.K. Chew, H.-K. Chan, Use of Solid Corrugated Particles to Enhance Powder Aerosol Performance, *Pharm. Res.* 18 (2001) 1570–1577. doi:10.1023/A:1013082531394.
- [223] D. Lechuga-Ballesteros, C. Charan, C.L.M. Stults, C.L. Stevenson, D.P. Miller, R. Vehring, et al., Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 287–302. doi:10.1002/jps.21078.
- [224] R. Vehring, W.R. Foss, D. Lechuga-Ballesteros, Particle formation in spray drying, *J. Aerosol Sci.* 38 (2007) 728–746. doi:10.1016/j.jaerosci.2007.04.005.
- [225] L.M. Nolan, L. Tajber, B.F. McDonald, A.S. Barham, O.I. Corrigan, A.M. Healy, Excipient-free nanoporous microparticles of budesonide for pulmonary delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 (2009) 593–602. doi:10.1016/j.ejps.2009.05.007.
- [226] A.M. Healy, B.F. McDonald, L. Tajber, O.I. Corrigan, Characterisation of excipient-free nanoporous microparticles (NPMPs) of bendroflumethiazide, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 1182–1186. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.020.
- [227] O.N. Ógáin, J. Li, L. Tajber, O.I. Corrigan, A.M. Healy, Particle engineering of materials for oral inhalation by dry powder inhalers. I—Particles of sugar excipients (trehalose and raffinose) for protein delivery, *Int. J. Pharm.* 405 (2011) 23–35. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.11.039.
- [228] O. NíÓgáin, L. Tajber, O.I. Corrigan, A.M. Healy, Spray drying from organic solvents to prepare nanoporous/nanoparticulate microparticles of protein: excipient composites designed for oral inhalation, *J. Pharm. Pharmacol.* 64 (2012) 1275–1290. doi:10.1111/j.2042-7158.2012.01488.x.
- [229] R. Salama, S. Hoe, H.-K. Chan, D. Traini, P.M. Young, Preparation and characterisation of controlled release co-spray dried drug–polymer microparticles for inhalation 1: Influence of polymer concentration on physical and in vitro characteristics, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 486–495. doi:10.1016/j.ejpb.2007.12.019.
- [230] N. Tsapis, D. Bennett, B. Jackson, D.A. Weitz, D.A. Edwards, Trojan particles: Large porous carriers of nanoparticles for drug delivery, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 12001–12005. doi:10.1073/pnas.182233999.
- [231] N. Anton, X. Li, T.M. Chau, M. Zhao, N. Messaddeq, T. Vandamme, Microencapsulation of nanoemulsions: novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery, *Int. J. Nanomedicine*. (2011) 1313. doi:10.2147/IJN.S20353.
- [232] M. Jansson, R.L. Thurmond, T.P. Trouard, M.F. Brown, Magnetic alignment and orientational order of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers containing palmitoyllysophosphatidylcholine, *Chem. Phys. Lipids*. 54 (1990) 157–170. doi:10.1016/0009-3084(90)90009-G.
- [233] L. Douziech-Eyrolles, H. Marchais, K. Hervé, E. Munnier, M. Soucé, C. Linassier, et al., Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Int. J. Nanomedicine*. 2 (2007) 541–550.
- [234] A. Amirfazli, Nanomedicine: Magnetic nanoparticles hit the target, *Nat. Nanotechnol.* 2 (2007) 467–468. doi:10.1038/nnano.2007.234.
- [235] D. Upadhyay, S. Scalia, R. Vogel, N. Wheate, R.O. Salama, P.M. Young, et al., Magnetised Thermo Responsive Lipid Vehicles for Targeted and Controlled Lung Drug Delivery, *Pharm. Res.* 29 (2012) 2456–2467. doi:10.1007/s11095-012-0774-9.

- [236] F. Tewes, C. Ehrhardt, A.M. Healy, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)-loaded Trojan microparticles for targeted aerosol delivery to the lung, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86 (2014) 98–104. doi:10.1016/j.ejpb.2013.09.004.
- [237] H. Cabral-Marques, R. Almeida, Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 121–129. doi:10.1016/j.ejpb.2009.05.002.
- [238] The Effect of Operating and Formulation Variables on the Morphology of Spray-Dried Protein Particles, *Pharmaceutical Development and Technology*, Informa Healthcare, (n.d.). <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10837459709031441> (accessed April 30, 2015).
- [239] MedicinesComplete, (n.d.). <https://www.medicinescomplete.com/about/> (accessed May 5, 2015).
- [240] M.N.G. Dukes, Corticotrophins and corticosteroids, in: M.N.G.D. and L. Beeley (Ed.), *Side Eff. Drugs Annu.*, Elsevier, 1986: pp. 338–345. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378608086800460> (accessed May 5, 2015).
- [241] K.Y. Kim, W.R. Marshall, Drop-size distributions from pneumatic atomizers, *AIChE J.* 17 (1971) 575–584. doi:10.1002/aic.690170318.
- [242] J.M. Meacham, M.J. Varady, F.L. Degertekin, A.G. Fedorov, Droplet formation and ejection from a micromachined ultrasonic droplet generator: Visualization and scaling, *Phys. Fluids 1994-Present.* 17 (2005) 100605. doi:10.1063/1.1921249.
- [243] R. Salcedo, J. Paiva, Pharmaceuticals: Efficient cyclone systems for fine particle collection, *Filtr. Sep.* 47 (2010) 36–39. doi:10.1016/S0015-1882(10)70037-9.
- [244] *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications, Second Edition* - Google Livres, (n.d.). https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=sz-669oFo6AC&oi=fnd&pg=PA99&dq=Microencapsulation+techniques+for+Parenteral+Depot+Systems,+in+Microencapsulation:+Methods+and+industrial+applications,+&ots=_y_NWQoHzI&sig=I9tIrkpzgigeYUGSJfCRuFrpN2c#v=onepage&q=Microencapsulation%20techniques%20for%20Parenteral%20Depot%20Systems%2C%20in%20Microencapsulation%3A%20Methods%20and%20industrial%20applications%2C&f=false (accessed May 5, 2015).
- [245] L. Tajber, O.I. Corrigan, A.M. Healy, Spray drying of budesonide, formoterol fumarate and their composites—II. Statistical factorial design and in vitro deposition properties, *Int. J. Pharm.* 367 (2009) 86–96. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.029.
- [246] A. Chawla, K.M.G. Taylor, J.M. Newton, M.C.R. Johnson, Production of spray dried salbutamol sulphate for use in dry powder aerosol formulation, *Int. J. Pharm.* 108 (1994) 233–240. doi:10.1016/0378-5173(94)90132-5.
- [247] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, M. Besnard, A. Bochot, et al., Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 116–126. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.013.
- [248] Definity (Perflutren Lipid Microsphere) Drug Information: Description, User Reviews, Drug Side Effects, Interactions - Prescribing Information at, RxList. (n.d.). <http://www.rxlist.com/definity-drug.htm> (accessed May 5, 2015).
- [249] C. Bosquillon, C. Lombry, V. Pr eat, R. Vanbever, Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance, *J. Controlled Release.* 70 (2001) 329–339. doi:10.1016/S0168-3659(00)00362-X.
- [250] V. Codrons, F. Vanderbist, B. Ucakar, V. Pr eat, R. Vanbever, Impact of formulation and methods of pulmonary delivery on absorption of parathyroid hormone (1–34) from rat lungs, *J. Pharm. Sci.* 93 (2004) 1241–1252. doi:10.1002/jps.20053.
- [251]  .S. Holmberg, B.T. Philipson, Sodium Hyaluronate in Cataract Surgery, *Ophthalmology.* 91 (1984) 53–59. doi:10.1016/S0161-6420(84)34340-8.
- [252] Acide hyaluronique, Wikip edia. (2015). http://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Acide_hyaluronique&oldid=112927496 (accessed May 5, 2015).
- [253] M. Doi, T. Ishida, S. Sugio, T. Imagawa, M. Inoue, Physicochemical properties of dexamethasone palmitate, a high fatty acid ester of an anti-inflammatory drug: Polymorphism and crystal structure, *J. Pharm. Sci.* 78 (1989) 417–422. doi:10.1002/jps.2600780515.

- [254] O. von Deimling, M. Müller, E. Eisenhardt, The non-specific esterases of mouse lung, *Histochemistry*. 78 (1983) 271–284. doi:10.1007/BF00489504.
- [255] J. Li, J. Yang, W. Wang, J. Yu, J. Fu, X. Wang, A Novel Liposomal Dexamethasone Palmitate Formulation and Anti-inflammatory Effects on Mice, *Chin. J. Chem.* 27 (2009) 1411–1414. doi:10.1002/cjoc.200990237.
- [256] M. Doi, T. Ishida, S. Sugio, T. Imagawa, M. Inoue, Physicochemical properties of dexamethasone palmitate, a high fatty acid ester of an anti-inflammatory drug: Polymorphism and crystal structure, *J. Pharm. Sci.* 78 (1989) 417–422. doi:10.1002/jps.2600780515.

Travaux expérimentaux

Chapitre 1

Optimisation de microparticules de palmitate de dexaméthasone destinées à être administrées par la voie pulmonaire

Résumé

Nous avons optimisé une formulation d'une prodrogue de la dexaméthasone, le palmitate de dexaméthasone (DXP) destinée à être administrée par voie pulmonaire sous forme de poudre. Les formulations de DXP ont été préparées par spray-drying avec du 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) et de l'acide hyaluronique (AH) comme excipients biodégradables et biocompatibles. Les concentrations élevées en DXP ont présenté une forte influence sur l'agréation des microparticules, la concentration en DXP a donc été maintenue en dessous de 15% pour obtenir des particules ayant une distribution de taille monodisperse. Les particules obtenues sont respectivement de 4 μm et 13 μm pour les petites et grosses particules poreuses avec des densités tassées respectives de 0,1 à 0,15g / cm^3 et 0,05 g / cm^3 . L'évaluation aérodynamique a montré que pour des concentrations en DXP de 10 à 15%, les fractions de particules fines (FPF) et les fractions alvéolaires (AF) étaient plutôt basses. Parallèlement, la poudre dosée à 5% de DXP a présenté un bon profil de dépôt pulmonaire avec une FPF de 40% environ et une AF autour de 30%. Un meilleur dépôt a été observé pour les grosses particules poreuses. Par ailleurs, l'incubation de la poudre dans du PBS à 37 ° C a montré une libération relativement lente avec moins de 5% de DXP dans le surnageant après 21 jours. La calorimétrie différentielle à balayage a confirmé l'insertion de la molécule de DXP dans les bicouches de la DPPC favorisant ainsi une éventuelle libération prolongée de la DXP de la matrice.

Optimization of spray-dried Dexamethasone palmitate microparticles for pulmonary delivery

Alain N'Guessan^{a,b}, Elias Fattal^a, Claire Gueutin, Armand Koffi^b, Nicolas Tsapis^a.

^a Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, CNRS UMR 8612, LabEx LERMIT, Châtenay-Malabry, France.

^bUniversity Félix Houphouet-Boigny, School of Pharmacy, Abidjan, Côte d'Ivoire

Abstract

We optimize a formulation of a prodrug of dexamethasone, dexamethasone palmitate (DXP) for pulmonary delivery as a dry powder. Formulations were prepared by spray drying DXP with 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPPC) and Hyaluronic Acid (HA) as biodegradable and biocompatible excipients. DXP has a strong influence of microparticle aggregation and weight concentration was kept below 15% to yield microparticles with a rather monodisperse size distribution. Large porous particles around 13 μm and small porous particles around 4 μm were produced with tap densities around 0.05g/cm³ and 0.1-0.15g/cm³ respectively. The aerodynamic evaluation showed that for DXP concentrations from 10 to 15%, the FPF and the AF were rather low. On the contrary the 5% DXP powder possesses a good lung deposition profile with a FPF around 40% and an AF around 30%. Slightly better deposition was observed for large porous particles. Incubation of the powder in PBS at 37°C shows a rather slow release with less than 5% of DXP in the supernatant after 21 days. Differential scanning calorimetry confirms that DXP is inserted within the DPPC bilayers once powders were hydrated, therefore favoring a sustained release.

Key words: *Dexamethasone palmitate, pulmonary delivery, spray drying.*

1. Introduction

Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways, usually associated with airway hyper-responsiveness and variable airflow obstruction that can be reversed either spontaneously or under treatment [1]. Allergen sensitization is an important risk factor for asthma [2]. For the past 40 years, the prevalence of asthma has increased in all countries in parallel with that of allergy. It is estimated that as many as 300 million people of all ages in the world suffer from asthma [1]. Antiasthmatic treatments can be administered via different routes of administration such as parenteral or oral (prednisone) but the pulmonary route is often preferred, as it allows delivering the medication right to the site of action where it is needed. Lung delivery can be achieved by nebulization of drug solutions [3] or suspensions of nanoparticles, or using either metered dose inhalers [4] or dry powders for inhalation [5].

Antiasthmatic treatments vary depending on the extent of the disease but for quick relief they mostly consist in a combination of beta2 adrenergic agonists and corticosteroids. Beta2 adrenergic agonists such as albuterol, levalbuterol, metaproterenol or terbutaline are used as bronchodilators helping to relax airway muscles within 5 minutes [6]. It leads to an increase of the airflow, facilitating patient breathing. Beta2 adrenergic agonists help relieving asthma symptoms for 3 to 6 hours. Corticosteroids such as beclomethasone propionate, fluticasone furoate or propionate, budesonide, ciclesonide, or flunisolide are used for their anti-inflammatory effects and required several administrations per day. A lung delivery system with a prolonged effect would be of great interest to reduce the number of administrations of corticosteroids since these are also used for long term treatment of lung inflammation [7].

Among dry powders for inhalation, large porous particles (LPPs), characterized by geometric sizes greater than 4-5 μm and mass densities lower than 0.4 g/cm^3 , have been recently introduced for both local and systemic applications by the pulmonary route to the lungs [8,9]. A major advantage of LPPs relative to conventional inhaled therapeutic aerosol particles is their aerosolization efficiency [8,10]. This allows the supply of large drug masses using a simple inhalation device [8]. These characteristics suggest that inhalation of LPPs may be beneficial in the treatment of asthma by delivering the corticosteroids directly to the primary site of inflammation to achieve therapeutic local drug concentrations with low systemic exposure.

To favor prolonged efficacy of the corticosteroid it appeared interesting to combine LPPs with a corticosteroid prodrug. We have chosen to use a prodrug of dexamethasone since this corticosteroid is often used as a reference to evaluate the efficacy of other molecules [7].

Dexamethasone palmitate is of particular interest since its aliphatic chain may help modulating its release from lipid-based LPPs.

As excipients, dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) and hyaluronic acid (HA) have been chosen due to their biocompatibility, biodegradability and ability to yield porous particles [11]. To optimize DXP encapsulation into DPPC-HA microparticles obtained by spray-drying for lung delivery, we have tested two spray-drying conditions to produce small (batch A) and large (batch B) particles. We also have varied the DXP concentration with respect to the lipid content. Physico-chemical characterization of the powders will be presented as well as aerosolization efficacy using a multistage liquid impinger and drug release in sink conditions.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Dexamethasone palmitate (DXP) was provided by Interchim (France), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) by Corden Pharma (Switzerland) and hyaluronic acid, sodium salt 95% (HA) (MW = 1 000 kDa) by Acros Organics. All chemicals used were of analytical grade. Organic solvents were provided by Carlo Erba (Italy) and were of analytical grade. Water was purified using a RIOS/MilliQ system from Millipore (France).

2.2 Microparticle preparation and yield calculation

Various dosages of microparticles (0 - 80%, DXP w/w) were prepared by spray-drying using a mini spray-dryer BÜCHI B-290 (France equipped with a 0.7mm diameter two-fluid nozzle, which operates in a co-current mode. An aqueous solution of HA was prepared dissolving 200 mg of HA into 150 ml of water, under stirring at room temperature. An ethanolic solution of DPPC±DXP was prepared by dissolving a total of 800mg of DPPC and DXP into 350 ml of ethanol absolute. Ethanolic and aqueous solutions were then mixed at a ratio of 70/30 (v/v) prior to spray-drying and the mixture maintained under moderate stirring while fed into the spray-dryer.

The final solid concentration in the solvent mixture was fixed at 2g/l (Table 2). The spray-drying parameters such as the feed-flow rate, inlet temperature and aspiration were maintained constant, only the air-flow rate changed according to the two batches of microparticles (A, small particles

and B, large particles, Table 1). Powder samples obtained were stored at room temperature under vacuum in a desiccator immediately after spray-drying to limit moisture. The yield was calculated as a percentage of the mass of the powder collected divided by the initial mass of solids in the solution prior to spray-drying.

2.3. Particle size distribution

Powders size distributions were measured by light diffraction using a Mastersizer 2000 equipped with a Scirocco dry disperser (Malvern Instruments, France) at a dispersing pressure of 3 bars. The refractive index used was 1.5. Data obtained were expressed in terms of the particle diameter at 10%, 50% and 90% of the volume distribution (D_{10} , D_{50} and D_{90} respectively). The span of the volume distribution, a measure of the width of the distribution relative to the median diameter was calculated according to Eq 1. A large span is indicative of a more heterogeneous size distribution. Values presented are the average of at least 3 determinations.

$$Span = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}} \quad (\text{Eq. 1})$$

2.4. Tap density and aerodynamic diameter

Powder tap density (ρ) was determined using a tapping apparatus (Pharma test PT-TD1). Accurately weighed powder samples were filled into a 5 ml graduated cylinder and the height measured following 1000 taps which allowed the density to plateau [12]. Assuming an efficient packing, the tap density of monodisperse spheres is approximately a 21% underestimate of the true particle density due to the void spaces between particles. Although polydispersity may reduce the void volume between particles, this is probably counterbalanced by an imperfect packing [13]. Measurements were performed in duplicate.

Then the theoretical aerodynamic diameter (D_{aer}) was determined by calculation (Eq. 2):

$$D_{\text{aer}} = D_{50} \sqrt{\rho} \quad (\text{Eq. 2})$$

In this equation, D_{50} is the particle volume median diameter (μm) and ρ the particle density (g/cm^3) assumed to be equal to the tap density.

2.5. Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was performed using a LEO1530 microscope (LEO Electron Microscopy Inc., Thornwood, USA) operating between 1 and 3 kV with a filament current of about 0.5 mA. Powder samples were deposited on carbon conductive double-sided tape (Euromedex, France) and were coated with a palladium–platinum layer of about 4 nm using a Cressington sputter-coater 208HR with a rotary planetary-tilt stage, equipped with a MTM-20 thickness controller.

2.6. Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC analysis was performed on hydrated samples (0 to 15% DXP) on a differential scanning calorimeter (DSC7, Perkin-Elmer, USA). About 10 mg of powder was hydrated with 100 μ l of water 12 h before experiments. Then about 15 mg of hydrated samples were loaded into 40 μ l aluminum pans and analyzed. The DSC runs were conducted from 20 to 80 °C at a rate of 5 °C/min. Calibration was achieved using Indium ($T_{\text{onset}} = 156.60$ °C) as well as n-decane ($T_{\text{onset}} = - 29.66$ °C). Experiments were performed at least in duplicate. Enthalpies were normalized with respect to DPPC weight in the sample.

2.7. Aerosolization characterization

The aerodynamic particle size distribution was determined using a Multi-Stage Liquid Impinger (MSLI). A dry powder inhalation device (Aerolizer®, Novartis, Switzerland) was filled with a size 4 capsule containing the powder. The test was carried out at 60 L/min for 4 s with a ratio of pressure $P_3/P_2 < 0.5$. Five capsules loaded with an average of 10 mg powder were taken for each test. Drug deposition in the device, the piece mimicking the throat, the four stages and the filter was determined by HPLC analysis. For accuracy, each test was repeated three times. The particles with aerodynamic diameters smaller than 5 μ m and 3.4 μ m were determined by interpolation from the cumulative amount of respective stages and considered as the fine particle fraction (FPF) (%) and as the alveolar particle fraction (AF) (%) expressed as a percentage of the initial dose [12].

2.8. HPLC method

Determination of DXP concentration in the microparticles was performed by HPLC. A Water™ 2707 autosampler chromatographic system was employed equipped with a Waters™ 1525 binary

HPLC pump, a Waters™ 2998 photodiode array detector, and a Waters™ Empower software. The analysis was performed at 240 nm using a SymmetryShield™ RP18 column (5 µm, 250×4.6 mm; Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Column temperature was maintained at 20 °C using a column Heater (Model 1500, Waters Corporation). The mobile phase involved a variable composition of solvent A (mixture of water:methanol in the 30:70 (v/v) ratio + 0.1 % formic acid) and solvent B (mixture of water:methanol in the 8:92 (v/v) ratio + 0.1 % formic acid). The mobile phase was pumped through the column with a flow rate of 1.2 ml/min (Table 3). The developed method showed good linearity for low concentrations between 1 and 25 µg/mL ($y = 50896x - 1239.3$; with $r^2 = 1$) and for higher concentrations between 25 and 250 µg/mL ($y = 50974x - 2594.6$; with $r^2 = 1$). Experiments were performed at least in triplicate.

2.9 DXP release from microparticles

Drug release from microparticles prepared with 5% DXP (Batch B) was carried out the following way: 25 mg of microparticles were accurately weighted, resuspended in 25 mL of PBS (corresponding to a concentration of DXP of 50ug/mL) and the preparation was protected from light and placed in an oven at 37 °C under magnetic stirring. At each time point, the suspension was vortexed and 1 mL was collected. 100 µL of the vortexed sample was diluted to the tenth (1/10) in acetonitrile, in order to determine total DXP concentration. The remaining 900 µL were centrifuged (13.000 rpm, 15 min) (Mini Spin Eppendorf centrifuge) and 100 µL of the supernatant were diluted to the tenth in acetonitrile, to determine DXP the supernatant. After filtration (0.45 µm PVDF filter), samples were stored at 4°C until analysis by HPLC. Experiments were performed in duplicate.

3. Results and discussions

3.1 Microparticle preparation, SEM observations.

To optimize DXP encapsulation into DPPC-HA microparticles obtained by spray-drying, we have tested two spray-drying conditions to produce small (Batch A) and large (Batch B) particles. We have varied the DXP concentration with respect to the lipid content, leading to various concentrations of DXP microparticles (0 – 80%, w/w). We obtained white and fluffy powders with yields ranging from 33.7 ± 0.3 % to 23.6 ± 0.3 % (w/w) with a clear tendency of yield decrease as DXP concentration increases. Indeed, spray-drying of the 80 % DXP formulation did not give enough powder to perform size measurements, with particles sticking to

the spray-dryer glassware. This result is in agreement with previous ones obtained when incorporating dexamethasone in a similar formulation [11,14]: the higher the drug content, the more sticky the powder. The variation of the air flow rate influences the diameter of the droplets exiting the nozzle: the higher the flow rate, the smaller the droplets. It allowed to produce two batches of microparticles (Batch A, Batch B). There were no differences between them from their macroscopic aspect. SEM images show rather spherical particles with rough surfaces (Figure 1). There is clearly coexistence of small and large particles. Some holes may be distinguished on the larger particles proving that they are rather porous. Particles tend to be more aggregated as DXP percentage in the formulation increases with even fused particles observed at 65 and 75% DXP (Figure 1, K and L)

3.2. Particle size distribution

Particle size distributions of batch A measured by laser diffraction are presented in Table 4 and Fig 2. The volume median diameter (D_{50}) is stable around $4.5\mu\text{m}$ up to 50% of DXP and then increases up to $10.7\mu\text{m}$ as DXP concentration increases from 55 to 75%. The same trend is observable for D_{10} (Figure 2). This increase most probably arise from aggregation of particles as DXP concentration increases, as attested by SEM observations. Indeed when focusing on D_{90} values, one can observe a dramatic increase above 55% DXP, attesting aggregation. The span that reflects the width of the distribution is rather stable around 3.1 ± 0.3 . Although not very monodisperse, the size distribution is not extensively polydisperse.

Given the tendency to aggregation observed at high DXP concentrations, we decided to limit the experiments from 0% to 15% DXP and focus on the effect of the air flow rate to compare batches A and B (Figure 3). The D_{50} of the batch B particles is rather stable around $13\mu\text{m}$ for 0 to 15% DXP, about 3 times larger than the one obtained for batch A. This difference of size is explained by the difference of air flow rate: the lower the flow rate, the larger the droplets exiting the nozzle and then the larger the particles.

3.3 Tap density and determination of the theoretical aerodynamic diameter

Tap density measurements were performed on batches A and B as a function of DXP concentration (Table 5, Fig. 4). For Batch A, the tap density first increases from $0.087\pm 0.004\text{ g/cm}^3$ to $0.14\pm 0.01\text{ g/cm}^3$ as DXP concentration increases from 0 to 5%. Then tap density remains stable before decreasing down to $0.114\pm 0.006\text{ g/cm}^3$ for 15% DXP. For Batch B, the tap

density is rather stable around 0.06 g/cm^3 . These results further prove the porosity of the particles. From tap density measurements, using equation 2, we have calculated the aerodynamic diameter. For Batch A, one finds a rather stable aerodynamic diameter around 1.5 microns, whereas for Batch B Daer is around 3 microns.

3.4 Aerosolization characterization

Aerosolization properties of the formulations were tested using a multi-stage liquid impinger (MSLI). For both batches we observe a decrease of the FPF as the percentage of DXP increases. For Batch A, the FPF decreases from 36% to 24%, whereas for Batch B the decrease is more pronounced from 40% to 14% (Table 6 and Fig 5). As similar decrease is observed for the alveolar fraction as the DXP percentage increases: from 25% to 15% for batch A and from 30% to 7.5% for batch B (Table 6 and Fig 5). The highest FPF around 40% is obtained for both batches prepared with 5% DXP but the highest AF is obtained for batch B. For in vivo experiments, we will focus on batch B prepared with 5% DXP.

3.5. In vitro release studies of DXP

DXP release from 5% DXP microparticles (Batch B) was followed during several days. About 2% of DXP was immediately released after vortexing. This burst effect corresponds to a concentration of $1 \mu\text{g/mL}$. Then a gradual and rather slow release was observed for 21 days from 2% to about 5% (Fig. 6). It should be noted that no dexamethasone was detected during this experiment. Although the release conditions are very different from what would happen in vivo, results indicate a sustained release from the microparticles. In vivo, we expect that esterases and lipases would accelerate considerably the release, as observed by others [15]. In addition, one should note that the solubility of DXP in PBS was not measurable. The fact that we detect DXP in our release experiment might be favoured by the presence of DPPC. Although this phospholipid is very hydrophobic, it possesses a critical micellar concentration of 0.46 nM at 20°C [16]. The very few micelles probably help solubilising DXP.

3.6 Differential scanning calorimetry (DSC)

To better understand DXP release, DSC was performed on hydrated samples to assess the possible interactions between DPPC and DXP (0% to 15%). For hydrated microparticles made without DXP, the DSC thermogram exhibit a very flat pretransition of DPPC due to the

interaction with HA and the typical main phase transition of DPPC at $T_{\text{onset}} = 42.3^{\circ}\text{C}$ with an enthalpy $\Delta H = 45.8\text{J/g}$ (Fig 7). This result is in agreement with those obtained for similar microparticles [11]. When hydrated, lipid bilayers swell forming typical liquid crystalline phases of DPPC. As DXP content increases, the pretransition does not show anymore. The onset temperature of the main DPPC transition shifts down to 39°C and the enthalpy of DPPC decreases (Fig 7 and Fig 8). At 15% DXP, one can also observe the appearance of a thermal event with a T_{onset} of 55.7°C . We do believe this event correspond to a phase transition of DXP, although nothing can be found in the literature. Indeed when DSC experiments were conducted with higher DXP content, the peak became more important (data not shown). The combination of the decrease of the onset temperature of DPPC and of its enthalpy (Fig 8) is the signature of the insertion of DXP within the DPPC bilayer as observed for cholesterol [17]. This insertion is rather logical since DXP possesses an aliphatic chain of 16 carbons, the exact same length as DPPC aliphatic chains. DXP insertion within bilayers further explains the slow release observed upon incubation.

4. Conclusion

We have optimized a formulation of DXP by spray-drying for lung delivery. DXP has a strong influence of microparticle aggregation and weight concentration should be kept below 15% by weight to yield microparticles with a rather monodisperse size distribution. Large porous particles around $13\ \mu\text{m}$ and small porous particles around $4\ \mu\text{m}$ were produced with tap densities around 0.05g/cm^3 and $0.1\text{-}0.15\text{g/cm}^3$ respectively. The aerodynamic evaluation showed that for DXP concentrations from 10 to 15%, the FPF and the AF were rather low. On the contrary the 5% DXP powder possesses a good lung deposition profile with a FPF around 40% and an AF around 30%. Slightly better deposition was observed for large porous particles. Incubation of the powder in PBS at 37°C shows a rather slow release with less than 5% of DXP in the supernatant after 21 days. Differential scanning calorimetry confirms that DXP is inserted within the DPPC bilayers once powders were hydrated, therefore favoring a sustained release. The large porous particles of DXP have an interesting potential for prolonged release once administered in the lungs. Animal experiments should be performed in the future to validate this hypothesis.

Tables and Figures

Table 1. Operational conditions used in Spray drying method.

| Parameters | Operational conditions | |
|-------------------------|------------------------|---------|
| | Batch A | Batch B |
| Feed flow rate (ml/min) | 17 | 17 |
| Inlet temperature (°C) | 150 ± 2 | 150 ± 2 |
| Outlet temperature (°C) | 50 ± 6 | 55 ± 4 |
| Aspiration setting (%) | 100 | 100 |
| Air-flow rate (l/h) | 536 | 414 |

Table 2. Compositions of the spray-dried solutions used for the preparation of microparticles

| | |
|---------------|---------|
| DXP (% , w/w) | 0 - 80 |
| DXP (mg) | 0 - 800 |
| DPPC (mg) | 800 - 0 |
| EtOH (ml) | 350 |
| HA (mg) | 200 |
| Water (ml) | 150 |

Table 3: Mobile phase program for gradient elution

| Time (min) | Flow rate (ml/min) | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
|------------|-----------------------|---------------|---------------|
| 0 | 1.2 | 100 | 0 |
| 5 | 1.2 | 0 | 100 |
| 25 | 1.2 | 0 | 100 |
| 27 | 1.2 | 100 | 0 |
| 35 | 1.2 | 100 | 0 |

Table 4: Batch A size distribution as a function of DXP percentage in the formulation

| Parameters | 0% DXP | 5% DXP | 10% DXP | 15% DXP | 20% DXP | 25% DXP | 30% DXP | 35% DXP |
|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| D ₁₀ (μm) | 1.0 ± 0.0 | 1.0 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 1.1 ± 0.1 | 1.1 ± 0.0 | 1.2 ± 0.0 | 1.2 ± 0.0 | 1.3 ± 0.0 |
| D ₅₀ (μm) | 4.5 ± 0.1 | 4.6 ± 0.1 | 4.3 ± 0.1 | 4.3 ± 0.1 | 4.19 ± 0.2 | 4.4 ± 0.0 | 4.6 ± 0.0 | 4.6 ± 0.0 |
| D ₉₀ (μm) | 13.0 ± 0.1 | 14.4 ± 0.2 | 11.8 ± 0.2 | 13.5 ± 0.3 | 14.7 ± 0.9 | 14.3 ± 0.1 | 15.6 ± 0.0 | 15.9 ± 0.2 |
| Span | 3.1 ± 0.1 | 3.0 ± 0.1 | 2.5 ± 0.0 | 2.9 ± 0.1 | 3.1 ± 0.2 | 3.0 ± 0.0 | 3.1 ± 0.0 | 3.2 ± 0.0 |
| Yield (%) | 33.7 ± 0.3 | 31.9 ± 0.5 | 28.7 ± 0.4 | 26.5 ± 0.3 | 24.0 ± 0.7 | 31.3 ± 0.2 | 26.2 ± 0.4 | 24.1 ± 0.3 |
| Parameters | 40% DXP | 45% DXP | 50% DXP | 55% DXP | 60% DXP | 65% DXP | 70% DXP | 75% DXP |
| D ₁₀ (μm) | 1.3 ± 0.0 | 1.4 ± 0.0 | 1.5 ± 0.0 | 1.7 ± 0.0 | 1.7 ± 0.0 | 1.9 ± 0.0 | 2.2 ± 0.0 | 3.5 ± 0.1 |
| D ₅₀ (μm) | 4.7 ± 0.1 | 4.8 ± 0.0 | 4.7 ± 0.1 | 5.3 ± 0.1 | 5.4 ± 0.2 | 7.4 ± 0.1 | 6.8 ± 0.1 | 10.7 ± 0.2 |
| D ₉₀ (μm) | 16.1 ± 0.1 | 15.9 ± 0.1 | 15.4 ± 0.2 | 16.4 ± 0.3 | 24.7 ± 0.4 | 23.5 ± 0.3 | 20.8 ± 1.0 | 37.3 ± 0.7 |
| Span | 3.2 ± 0.0 | 3.0 ± 0.0 | 3.0 ± 0.1 | 2.8 ± 0.0 | 4.1 ± 1.7 | 3.5 ± 0.1 | 3.2 ± 1.0 | 3.0 ± 0.1 |
| Yield (%) | 25.7 ± 0.2 | 26.3 ± 0.8 | 25.7 ± 0.5 | 26.0 ± 0.2 | 23.6 ± 0.3 | 24.2 ± 0.5 | 24.0 ± 0.4 | 24.0 ± 0.3 |

Table 5: Aerodynamic parameters of the batches A and B of DXP microparticles

| Parameters | Batch A | | | | Batch B | | | |
|-----------------------------|-------------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0% | 5% | 10% | 15% | 0% | 5% | 10% | 15% |
| ρ (g/cm ³) | 0.087±0.004 | 0.14±0.01 | 0.14±0.009 | 0.114±0.006 | 0.056±0.003 | 0.053±0.003 | 0.065±0.003 | 0.066±0.002 |
| D ₅₀ (μm) | 4.5 ± 0.1 | 4.6 ± 0.1 | 4.3 ± 0.1 | 4.3 ± 0.1 | 13.1±0.1 | 13.7±0.3 | 12.3±0.3 | 12.8±0.1 |
| D _{aer} (μm) | 1.3 ± 0.1 | 1.7 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1 | 1.5 ± 0.1 | 3.1±0.1 | 3.2±0.2 | 3.1±0.1 | 3.3±0.1 |

Table 6: Fine particle fractions (FPF) and Alveolar fractions (AF) of batches A and B of DXP microparticles determined using an MSLI.

| % DXP | Batch A | | Batch B | |
|-------|------------|------------|------------|------------|
| | FPF (%) | AF (%) | FPF (%) | AF (%) |
| 5 | 36.3 ± 0.3 | 25.4 ± 0.4 | 40.7 ± 7.0 | 30.4 ± 6.1 |
| 10 | 31.3 ± 1.1 | 20.9 ± 0.9 | 21.8 ± 1.0 | 12.9 ± 0.7 |
| 15 | 24.0 ± 0.6 | 14.9 ± 0.5 | 14.3 ± 1.1 | 7.4 ± 0.6 |

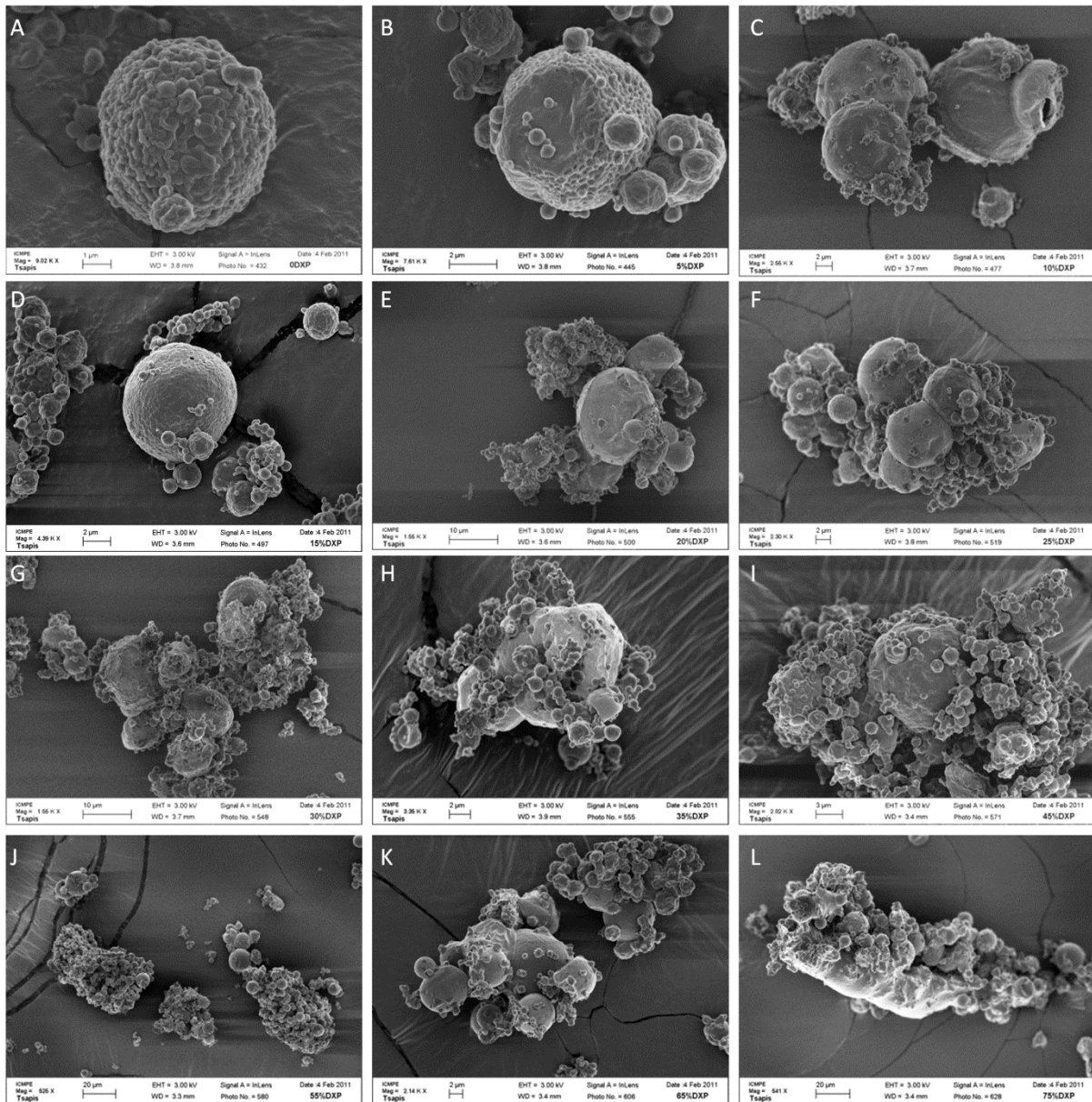


Fig 1 : Typical SEM images of spray-dried powders: (A) 0% DXP, (B) 5% DXP, (C) 10% DXP, (D) 15% DXP, (E) 20% DXP, (F) 25% DXP, (G) 30% DXP w/w, (H) 35% DXP, (I) 45% DXP, (J) 55% w/w DXP, (K) 65% w/w DXP, (L) 75% w/w DXP.

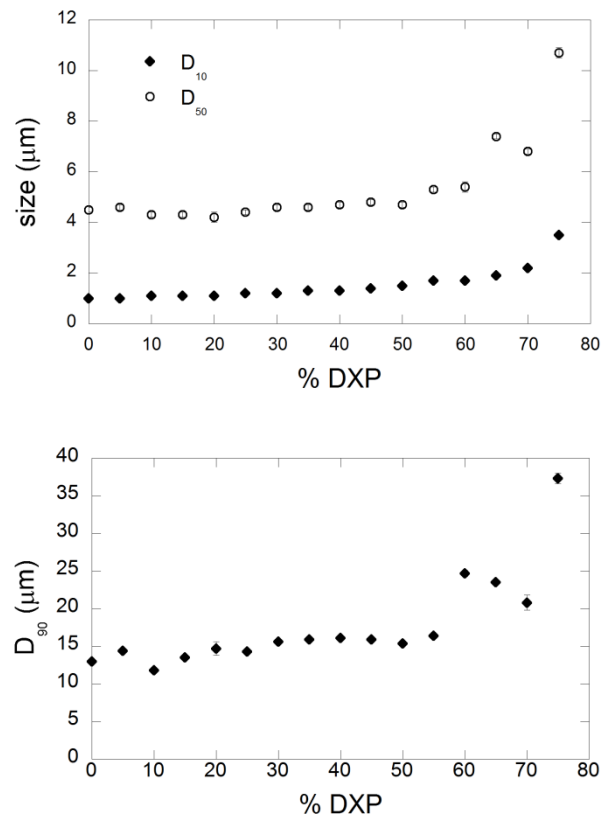


Fig 2: Influence of DXP concentration on particle size distribution of Batch A: D₁₀ and D₅₀ are plotted on the top, whereas the D₉₀ is plotted on the bottom. Values are presented as the mean±SD (n=3).

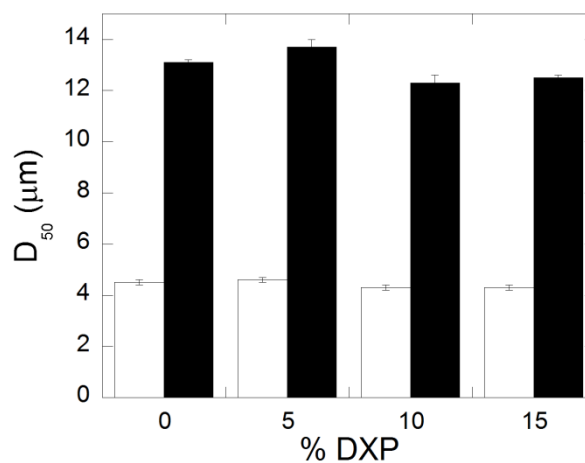


Fig 3: Volume median diameters (D₅₀) of batches A (white) and B (black) as a function of DXP concentration. Values are presented as the mean±SD (n=3).

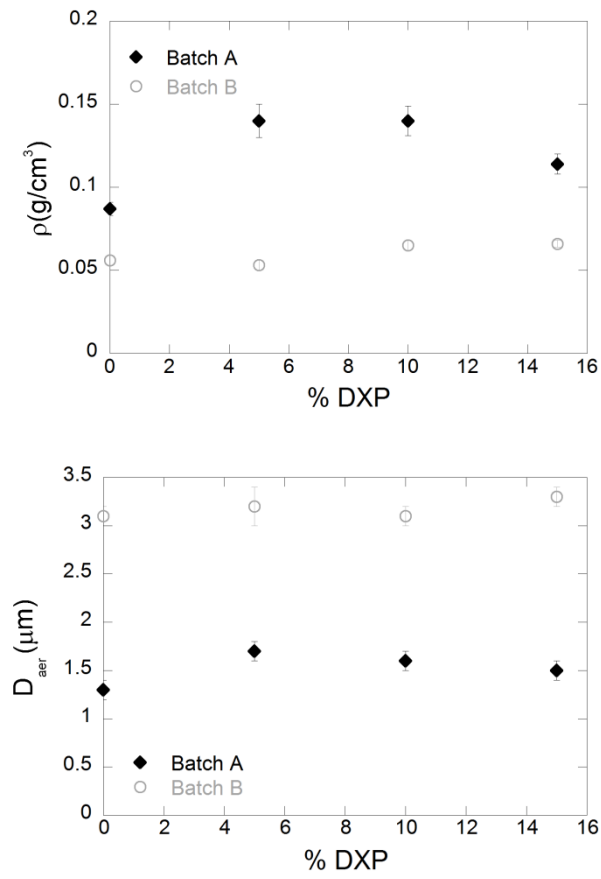


Fig 4: Tap density (top) and aerodynamic diameters (bottom) for the two batches of DXP microparticles.

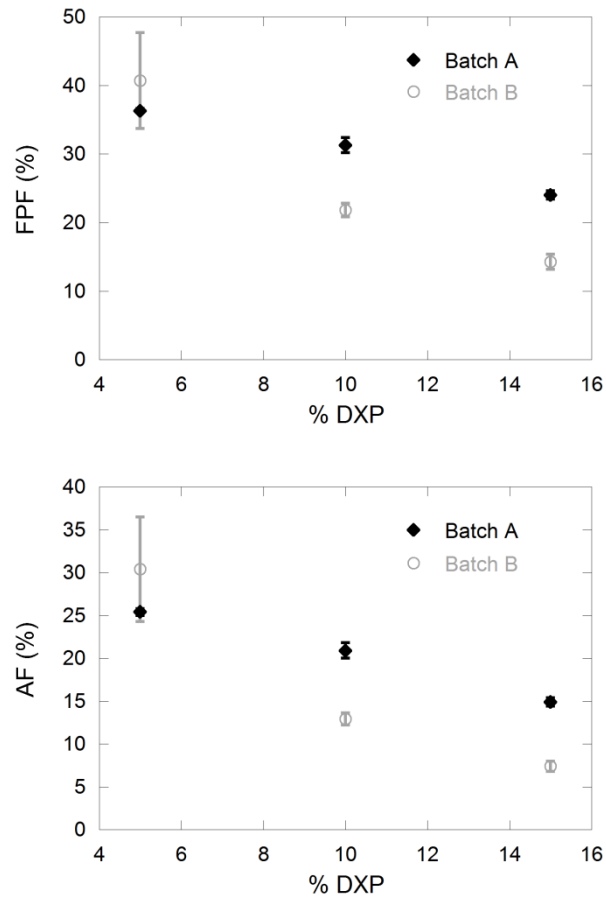


Fig 5: Fine particle fractions (FPF) (top) and Alveolar fractions (AF) (bottom) of the two batches of DXP microparticles determined using an MSLI (n=3). Values are presented as the mean \pm SD.

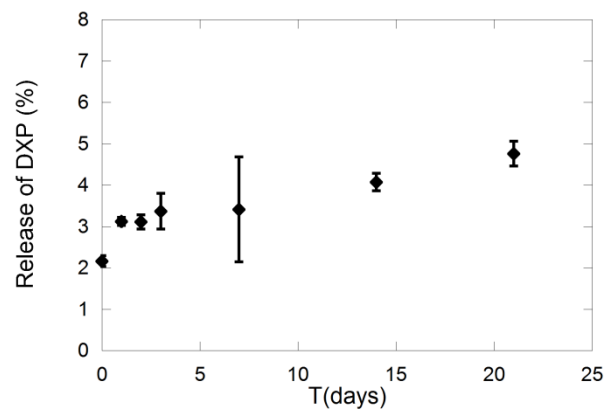


Fig 6: In vitro DXP release from 5% DXP (Batch B) microparticles in PBS at 37°C.

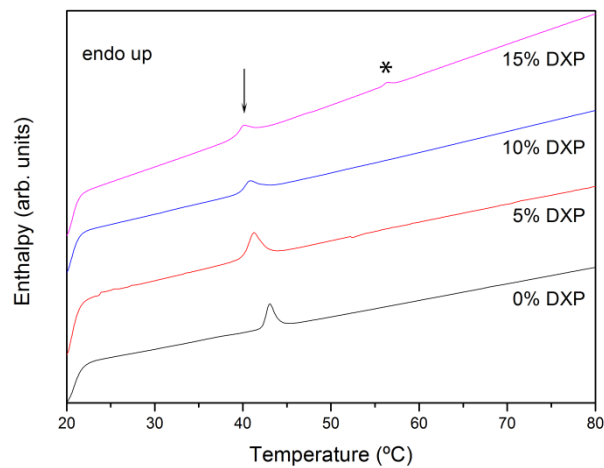


Fig 7: DSC thermograms obtained from hydrated powders upon heating at 5°C/min with different concentrations of DXP (0 to 15%). The arrow indicates the position of the DPPC main transition around 40°C, whereas the star indicates what we believe corresponds to a transition associated to DXP.

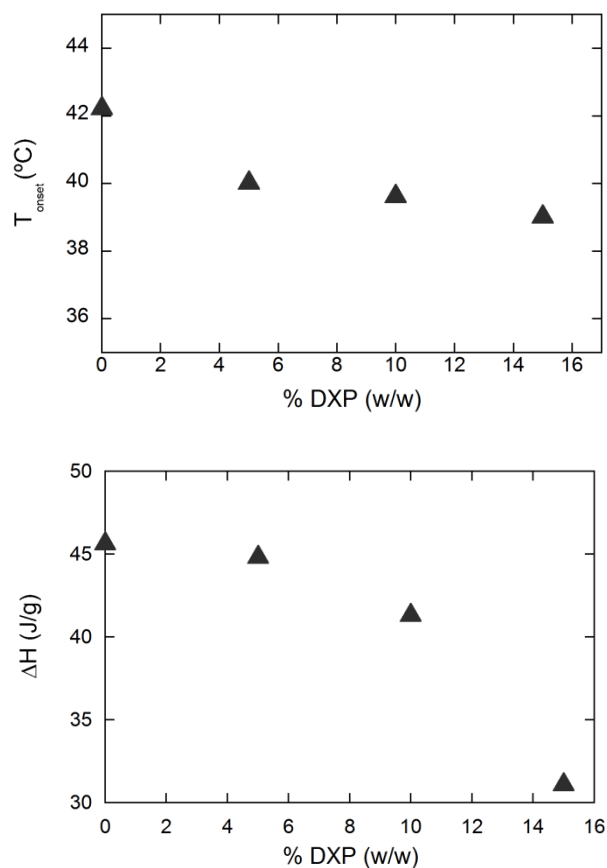


Fig 8: Variation of the onset temperature (top) and of the enthalpy (bottom) of DPPC main transition as a function of DXP concentration in the powder. Values are presented as mean \pm SD. Error bars are smaller than the size of the symbols.

References

- [1] GINA Report, Global Strategy for Asthma Management and Prevention | Documents / Resources | GINA, (n.d.). <http://www.ginasthma.org/documents/4> (accessed June 2, 2015).
- [2] E.D. Bateman, S.S. Hurd, P.J. Barnes, J. Bousquet, J.M. Drazen, M. FitzGerald, et al., Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, *Eur. Respir. J.* 31 (2008) 143–178. doi:10.1183/09031936.00138707.
- [3] G.J. Rodrigo, Advances in acute asthma:, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 21 (2015) 22–26. doi:10.1097/MCP.000000000000123.
- [4] W.E. Berger, G.W. Bensch, S.F. Weinstein, D.P. Skoner, B.M. Prenner, T. Shekar, et al., Bronchodilation with mometasone furoate/formoterol fumarate administered by metered-dose inhaler with and without a spacer in children with persistent asthma, *Pediatr. Pulmonol.* 49 (2014) 441–450. doi:10.1002/ppul.22850.
- [5] B.L. Chawes, M. Govoni, E. Kreiner-Møller, N.H. Vissing, P. Pooririsak, L. Mortensen, et al., Systemic exposure to inhaled beclometasone/formoterol DPI is age and body size dependent, *Respir. Med.* 108 (2014) 1108–1116. doi:10.1016/j.rmed.2014.05.007.
- [6] D. Spina, Current and novel bronchodilators in respiratory disease:, *Curr. Opin. Pulm. Med.* 20 (2014) 73–86. doi:10.1097/MCP.000000000000012.
- [7] H.W. Kelly, Comparison of Inhaled Corticosteroids: An Update, *Ann. Pharmacother.* 43 (2009) 519–527. doi:10.1345/aph.1L546.
- [8] D.A. Edwards, Delivery of biological agents by aerosols, *AICHE J.* 48 (2002) 2–6. doi:10.1002/aic.690480102.
- [9] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, et al., Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, *Science.* 276 (1997) 1868–1872. doi:10.1126/science.276.5320.1868.
- [10] C.A. Dunber, A.J. Hickey, P. Holzner, Dispersion and Characterization of Pharmaceutical Dry Powder Aerosols, *KONA Powder Part. J.* 16 (1998) 7–45. doi:10.14356/kona.1998007.
- [11] C. Gómez Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, E. Fattal, Morphology, structure and supramolecular organization of hybrid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine–hyaluronic acid microparticles prepared by spray drying, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 12–21. doi:10.1016/j.ejps.2008.02.003.
- [12] European Pharmacopoeia Online 8.1, (n.d.). <http://online6.edqm.eu/ep801/mobile/> (accessed May 10, 2015).
- [13] R. Vanbever, J.D. Mintzes, J. Wang, J. Nice, D. Chen, R. Batycky, et al., Formulation and Physical Characterization of Large Porous Particles for Inhalation, *Pharm. Res.* 16 (1999) 1735–1742. doi:10.1023/A:1018910200420.
- [14] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, M. Besnard, A. Bochot, et al., Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 116–126. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.013.
- [15] X. Lu, M.D. Howard, M. Mazik, J. Eldridge, J.J. Rinehart, M. Jay, et al., Nanoparticles Containing Anti-inflammatory Agents as Chemotherapy Adjuvants: Optimization and In Vitro Characterization, *AAPS J.* 10 (2008) 133–140. doi:10.1208/s12248-008-9013-z.
- [16] R. Smith, C. Tanford, The critical micelle concentration of 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions, *J. Mol. Biol.* 67 (1972) 75–83. doi:10.1016/0022-2836(72)90387-7.
- [17] A. Kessel, N. Ben-Tal, S. May, Interactions of Cholesterol with Lipid Bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations, *Biophys. J.* 81 (2001) 643–658. doi:10.1016/S0006-3495(01)75729-3.

Chapitre 2

**Evaluation in vivo de particules poreuses de palmitate de dexaméthasone
après administration pulmonaire à des rats sains.**

Résumé

Nous avons évalué les paramètres pharmacocinétiques des microparticules poreuses de palmitate de dexaméthasone (DXP), une prodrogue de la dexaméthasone (DXM) élaborées par spray drying et administrées par voie pulmonaire. 3 mg de la poudre correspondant à 150 µg de DXP ont été administrés à des rats sains par voie intratrachéale par insufflation, puis le liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF) et des échantillons de sang ont été collectés à différents temps jusqu'à 24h. Les concentrations de DXP et de DXM ont été déterminées par analyse par HPLC après extraction dans le plasma et le BALF. Les paramètres pharmacocinétiques ont été évalués selon un modèle non compartimental. Nous observons que la DXP demeure à de très haute concentration jusqu'à 6h dans le liquide de revêtement épithélial (ELF) des poumons. La DXM peut être détectée à une concentration assez importante dans l'ELF jusqu'à 24h. En outre, la concentration en DXP diminue selon deux temps caractéristiques. Le passage de la DXP des poumons vers le sang est très faible alors que la DXM semble être absorbée dans le sang plus facilement. Ces résultats suggèrent qu'une fois administrée, la DXP subit deux différents procédés: hydrolyse en DXM en raison de la présence des estérases dans les poumons et distribution dans le tissu pulmonaire. Cette formulation semble prometteuse pour réduire l'exposition systémique et prolonger l'effet du médicament au niveau local.

Dexamethasone palmitate porous particles: in vivo evaluation after lung delivery in rats

Alain N'Guessan^{a,b}, Elias Fattal^a, Claire Gueutin^a, Armand Koffi^b, Nicolas Tsapis^a.

^aUniv Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, CNRS UMR 8612, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France.

^bUniversity Félix Houphouet-Boigny, School of Pharmacy, Abidjan, Côte d'Ivoire

Corresponding authors :

- N. Tsapis, Univ Paris-Sud, Institut Galien Paris-Sud, CNRS UMR 8612, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry, France, nicolas.tsapis@u-psud.fr
- A. N'Guessan, University Felix Houphouet-Boigny, Faculty of Pharmacy, dr.ngues@gmail.com

Abstract

We have evaluated the pharmacokinetics parameters of dexamethasone palmitate (DXP) a prodrug of dexamethasone (DXM) formulated into microparticles by spray drying and administered to the lungs. 3mg of the powder corresponding to 150µg of DXP were intratracheally administered to rats by insufflation before collecting bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and blood samples up to 24h. Both DXP and DXM concentrations were determined by HPLC analysis after extraction in plasma and BALF. PK parameters were evaluated according to a non-compartmental model. We observe that the DXP remains for up to 6h in the epithelial lining fluid (ELF) of the lungs at very high concentration. DXM can be detected at rather important concentration in ELF up to 24h. In addition, DXP concentration decreases according to two characteristic times. The passage of DXP from the lungs to the bloodstream is very poor whereas DXM seems to be absorbed in the blood more easily. These results suggest that once administered DXP undergoes two different processes: hydrolysis into DXM due to the presence of esterases in the lungs and distribution in the lung tissue. This formulation appears promising to reduce systemic exposure and prolong the effect of the drug locally.

Key words: *Dexamethasone palmitate, Dexamethasone, pulmonary delivery, pharmacokinetics.*

1. Introduction

Inhaled corticosteroids (ICS) are known for their potent anti-inflammatory effect and their action is well established. Their pulmonology indications are numerous, the main ones being the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [1]. Asthma is a chronic inflammatory disorder of the airways, usually associated with airway hyper-responsiveness and variable airflow obstruction, that is often reversible spontaneously or under treatment. Allergen sensitization is an important risk factor for asthma [2,3]. ICS are effective in the treatment of asthma because of their ability to interfere with multiple inflammatory processes involved in asthma [4–6]. Inhalation offers advantages for the treatment of asthma using corticosteroids as compared with the systemic route. It helps, with efficiency and optimal tolerance to locally treat a condition that required the use of higher doses of drug by systemic route. The inhaled corticosteroids allow a rapid onset of action and induce fewer side effects than does administration by other routes [7–9]. However, these benefits are often associated with limited lung deposition and short duration of action because of respiratory protection mechanisms [10]. Thus, the ideal inhaled corticosteroid should have: long residence time in the lung; intrinsic activity; low oral bioavailability and high systemic clearance resulting in negligible systemic side effects. However, most currently marketed ICS need more daily administrations, which restricts their use in a chronic disease such as asthma [11–13]. The objective of this work is to optimize an innovative inhaled particle to modulate the active ingredient release in lung so as to reduce the drug daily administrations in order to improve compliance by patients [14]. To achieve this aim, we developed in a previous study, different formulations of DXP. The aerodynamic diameters of the powders obtained were in accordance with bronchoalveolar drug administration (2.0 to 2.2 μm and from 3.1 to 3.3 μm , respectively for batch A and B). The fine particle fractions (FPF) were from 24.0 to 36.3% for batch A and from 14.3 to 40.7% for batch B. Finally, the alveolar fractions (AF) were from 14.9 to 25.4% for batch A and from 7.4 to 30.4% for batch B. In order to confirm these encouraging results, 5DXPB formulation was selected for its aerodynamic behaviour (FPF: 40.7 ± 7.0 and AF: 30.4 ± 6.1) for *in vivo* study on rats [15–17]. The pharmacokinetic characteristics of the other currently available ICS have been well documented. In contrast, the PK of DXP had not been reported for the inhaled route of administration. So the interest of this work will allow us to determine the lung and plasma pharmacokinetics parameters for DXP and for DXM its active metabolite. These parameters will guide us on the lung amount of the administered dose of DXP and its active metabolite, residence time in lung and the proportion that reaches the systemic circulation.

2. Materials and methods

2.1 Materials

Dexamethasone palmitate (DXP) was provided by Interchim (France), Dexamethasone (DXM) and Dexamethasone acetate (DXA) were provided by Chemos GmbH (Germany), Testosterone decanoate (TD) was provided by Sigma–Aldrich (France), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) by Corden Pharma (Switzerland) and hyaluronic acid, sodium salt 95% (HA) (MW = 1 000 kDa) by Acros Organics. Acetonitrile was of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade. All chemicals used were of analytical grade. Organic solvents were provided by Carlo Erba (Italy) and were of analytical grade when not specified. Water was purified using a RIOS/MilliQ system from Millipore (France).

2.2 Microparticles preparation

DXP-loaded microparticles were prepared as detailed in N'Guessan et al. (Chapitre 1). An aqueous solution of HA was prepared dissolving 200 mg of HA into 150 ml of water upon magnetic stirring at room temperature. An ethanolic solution was prepared by dissolving 750mg of DPPC and 50mg of DXP into 350 ml of ethanol absolute. Ethanolic and aqueous solutions were then mixed at a ratio of 70/30 (v/v) prior to spray-drying and the mixture maintained under moderate stirring while fed into the spray-dryer. Spray drying was performed using a mini spray-dryer BÜCHI B-290 (France) equipped with a 0.7 mm diameter two-fluid nozzle, which operates in a co-current mode according to conditions detailed in Table 1 [18,19].

Table 1. Spray drying conditions used to obtain the DXP microparticles.

| Parameters | Operational conditions |
|-------------------------|------------------------|
| Feed flow rate (mL/min) | 17 |
| Inlet temperature (°C) | 150 ± 2 |
| Outlet temperature (°C) | 55 ± 4 |
| Aspiration setting (%) | 100 |
| Air-flow rate (L/h) | 414 |

2.3 Animals

Sprague Dawley male rats with average weight of 300g were obtained from Harlan Laboratory (Gannat, France). All animal experiments were carried out in accordance with the Principles of Laboratory Animal Care as adopted and propagated by the EU guidelines for Animal Experiments (86/609/EEC and 2010/63/EU) and Legislation in force in France (Decree No. 2013-118 of February 1, 2013). They were housed 4 per cage while on study in accordance to EEC guidelines. The light/dark cycle was 12 h/12 h. The temperature in the animal room was ambient room temperature of approximately 25 °C and the ambient humidity was in the range of approximately 35–60%. Animals were allowed access to food and water ad libitum throughout the duration of the study.

2.4 Pharmacokinetics and bronchoalveolar distribution study

Rats were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (100 mg.kg⁻¹) and xylazine (10 mg.kg⁻¹) and then intratracheally administered with 3mg of DXP powder corresponding to 150µg of DXP using a Microsprayer (PennCentury, Philadelphia, PA) [20–22]. Powder was delivered through the insufflation device by rapidly pushing a 2 cm³ bolus of air through the device. After administration, rats were supported vertically for 1 min. Blood and bronchoalveolar fluid were collected at t=30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 18h and 24h after administration. For each rat, blood was taken at 3 different time points via the jugular vein [23,24]. At least 3 different rats were used for each time point. Before taking the blood, the rats were anesthetized by isoflurane inhalation. Blood samples (1mL) were collected in citrated tubes and immediately separated at 4000 rpm during 5 min at room temperature (20°C) using a microcentrifuge (Minispin Eppendorf). Plasma was aspirated and frozen at -80°C until further analysis. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected by lavaging lungs three times with 1mL of PBS per intratracheal lavage. The lungs were massaged and the fluid withdrawn immediately and collected in centrifuge tube kept on ice. The rats were euthanized by cardiac puncture under deep isoflurane anesthesia before BALF collection. The trachea was cannulated using an 18 gauge needle adaptor for subsequent injection and retrieval of BALF. Then BALF collected was frozen at -80°C until further analysis.

2.5 Extraction method of DXP or DXM in plasma and BALF.

Two extraction methods were tested, one using acetone and one using a mixture chloroform : methanol (9:1 v:v) were evaluated. Acetone extraction was performed as follows: in a light protected eppendorf since DXP is light sensitive (Canioni et al., private communication), 100µL of plasma or BALF, 100µL of known concentration of DXM or DXP and 100µL of known concentration of internal standard (DXA for DXM or TD for DXP) were mixed with a vortex during 30s. DXP, DXM and the internal standards were dissolvent in acetonitrile. Then 400µL of cold acetone (-20°C) were added in the tube. Sample was vortexed during 30s, placed at 4°C for 15 min to obtain protein precipitation before being centrifuged during 10 min at 10,000 rpm using a microcentrifuge (minispin eppendorf). The supernatant was transferred into clean amber vial and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 30°C. The residue was then reconstituted into 100µL of acetonitrile prior to analysis using HPLC [23]. The chloroform:methanol method was performed as follows: in an amber glass tube, 100µL of plasma or BALF, 100µL of known concentration of DXM or DXP and 100µL of known concentration of internal standard (DXA for DXM or TD for DXP) were mixed with a vortex during 30s . DXP, DXM and the internal standards were dissolvent in acetonitrile. Then 3mL of a mixture chloroform:methanol (9:1, v:v) were added in the tube. Sample was vortexed during 3 min to obtain protein precipitation then was centrifuged during 10 min at 10,000 rpm using a centrifuge (Jouan GR 412, France). The organic phase in the bottom was transferred into a clean amber vial and evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 30°C. The residue was then reconstituted into 100µL of acetonitrile and vortexed prior to analysis using HPLC conditions described below [25]. The extraction yields of the two methods were determined. The method presenting the best extraction efficiency was used for the samples analysis.

2.6 HPLC method

Determination of DXM or DXP concentration in plasma and BALF was performed by HPLC. A WaterTM 2707 autosampler chromatographic system was employed equipped with a WatersTM 1525 binary HPLC pump, a WatersTM 2998 photodiode array detector, and a WatersTM Breeze software. The analysis was performed at 240 nm using a SymmetryShieldTM RP18 column (5 µm, 250×4.6 mm; Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Column temperature was maintained at 40 °C using a column Heater (Model 1500, Waters Corporation). The mobile phases involved a variable composition of solvent A (water : acetonitrile in the 60:40 (v:v) ratio and solvent B (water : acetonitrile in the 15:85 (v:v) ratio. For DXP determination, the solvent B

was pumped in isocratic mode for 40 min through the column with a flow rate of 1.2 ml/min and for DXM the mobile phases were with the same flow (1.2 mL/min) for 47 min with a gradient elution as described in the Table 2. The sample volume injected was of 50 μ L.

Table 2: Elution gradient for DXM quantification in plasma and BALF

| Time (min) | Flow rate (ml/min) | Solvent A (%) | Solvent B (%) |
|------------|--------------------|---------------|---------------|
| 0 | 1.2 | 100 | 0 |
| 12 | 1.2 | 0 | 100 |
| 27 | 1.2 | 0 | 100 |
| 29 | 1.2 | 100 | 0 |
| 47 | 1.2 | 100 | 0 |

2.7 Data Analysis

PK of DXP and DXM in plasma and ELF were tested to be non compartmental. PK parameters were calculated using GraphPad Prism (Version 5 software for windows, Inc.).

3 Results and discussion

DXP microparticle formulation was optimized for lung delivery as detailed in N'Guessan et al (Chapitre 1). Briefly, spherical microparticles with a median diameter of 13.7 μ m, a tap density of 0.05g/cm³ were obtained (Figure 1).

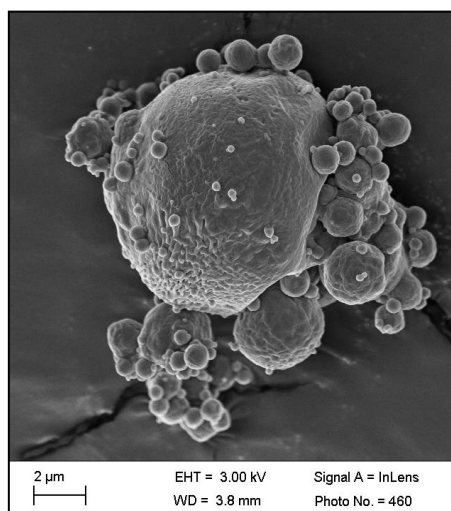


Fig. 1: Typical SEM image of DXP microparticles obtained by spray drying.

The in vitro aerodynamic evaluation showed that the fine particle fraction was around 40% with an alveolar fraction of about 30% (Chapitre 1).

Two extraction methods were tested to extract both DXP and the actual drug DXM. On one hand, the chloroform-methanol method presented better extraction yields for DXP with $84.3 \pm 1.6\%$ for extraction from BALF, and $65.8 \pm 6.9\%$ for extraction from plasma, as well as for DXM with $86.6 \pm 3.4\%$ extraction from BALF and $82.9 \pm 6.7\%$ extraction from plasma. On the other hand the acetone method was less efficient with only $23.6 \pm 4.2\%$ of DXP extraction from plasma and $31.1 \pm 2.0\%$ DXM extraction from plasma. Given these results, the chloroform-methanol extraction method was selected for the determination of DXP and DXM concentrations in BALF and plasma in the remaining of the article. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for each molecule are presented in Table 3. The results of DXP and DXM obtained in BALF were converted to epithelial lining fluid (ELF) concentrations according to the theoretical volume of ELF reported in the literature ($30 \mu\text{L}/\text{kg}$) and to the volume of PBS used for bronchoalveolar lavage (1mL). Thus, for a rat of 300g, the dilution factor determined by calculation was 333 [26]. Although this method of calculation does not take into account individual dilution factor of each rat, it allows all the same to achieve the results on the whole, acceptable.

Table 3: Limits of detection and quantification of the different molecules after extraction from plasma or BALF.

| Parameters | | Plasma | BALF | ELF |
|------------|---------------------------------|--------|------|-----|
| DXM | LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 0.133 | 0.1 | 33 |
| | LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 0.04 | 0.03 | 10 |
| DXP | LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 0.17 | 0.1 | 33 |
| | LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | 0.06 | 0.03 | 10 |

The results of DXP and DXM concentrations obtained in ELF are presented in figure 2. Results were presented as semi-log plots. These results show that the concentration of DXP in the ELF 30 min after administration is maximal $C_{\text{DXP-ELF-max}} = 10794 \mu\text{g}/\text{mL}$. It corresponds to about 65% of the theoretical initial concentration given the administered dose. Then the DXP concentration decreases and can be described by three different phases. The first phase occurs between 30min and 3h corresponding to a slow decrease of DXP amount from $10794 \mu\text{g}/\text{mL}$ (65% of initial

theoretical concentration) to 5657 $\mu\text{g/mL}$ (34% of initial theoretical concentration). This first phase can be fitted by a single exponential decrease $y = y_A \exp(-k_1/t)$ with $k_1 = 0.247 \text{ h}^{-1}$ and a characteristic half-time $t_{1/2A} = \frac{\ln 2}{k_1} = 2.8 \pm 0.4 \text{ h}$. The second phase corresponds to a faster decrease between 3h and 6h from 5657 $\mu\text{g/mL}$ to 204 $\mu\text{g/mL}$, which corresponds to 1.2% of the initial theoretical concentration. This second decrease can be fitted by a single exponential decrease $y = y_B \exp(-k_2/t)$ with $k_2 = 1.09 \text{ h}^{-1}$ and a characteristic half-time $t_{1/2B} = \frac{\ln 2}{k_2} = 0.63 \pm 0.01 \text{ h}$. The last phase suggests a slow elimination of DXP from ELF although it cannot be modeled since the last two concentrations at 18h and 24h were below the LOQ of DXP in ELF. For DXM in ELF, one can observe a rapid decrease of concentration between 30 min and 4h, then the concentration remains stable but very low below the LOQ.

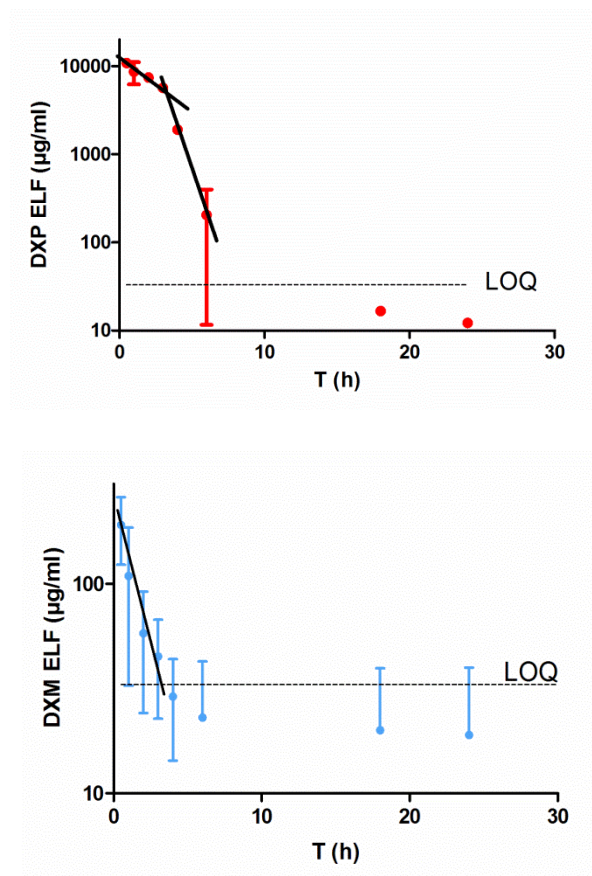


Figure 2: Concentration of DXP (top) and DXM (bottom) in ELF after intratracheal insufflation of 3mg of DXP microparticles (DXP dose=150 μg). LOQs are represented as dashed curves. The LOD is 10 $\mu\text{g/mL}$. Data are presented as mean \pm SEM (Standard error of the mean), $n=3$.

The decrease can be fitted by a single exponential decrease $y = y_A \exp(-k_1/t)$ with $k_1 = 0.743 \text{ h}^{-1}$ and a characteristic half-time $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} = 0.93 \pm 0.20 \text{ h}$. The area under the curve (AUC) of DXP in ELF was $26\,703 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ whereas for DXM the exposure was much lower with an AUC around $674 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ (Table 4).

The concentrations found in the plasma were very low for DXP with values between the LOQ and the LOD (Figure 3). The systemic exposure to DXP in the plasma therefore cannot be determined. For DXM, the concentrations found in plasma are low but above the LOQ and seem to follow a two-step decrease (Figure 3). The first decrease takes place between 30min and 4h and can be fitted by a single exponential decrease $y = y_A \exp(-k_1/t)$ with $k_1 = 0.207 \text{ h}^{-1}$ and a characteristic half-time $t_{1/2A} = \frac{\ln 2}{k_1} = 3.34 \pm 0.33 \text{ h}$.

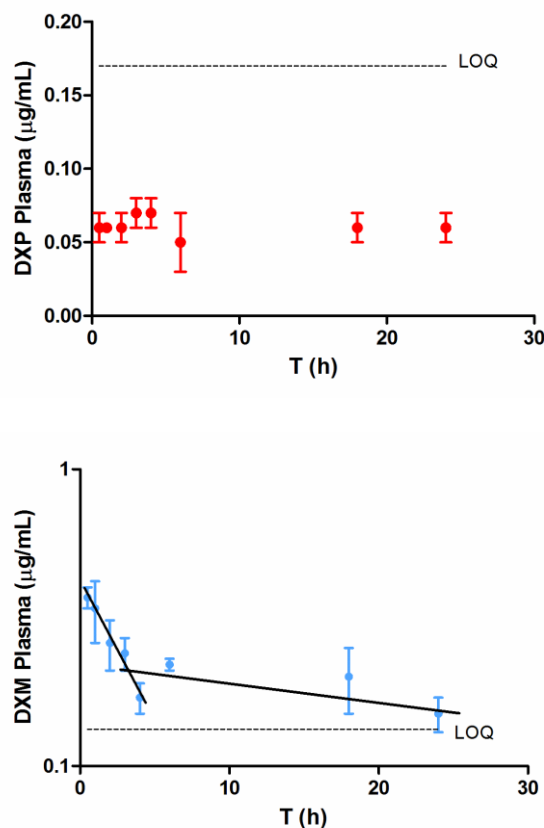


Figure 3: Concentration of DXP (top) and DXM (bottom) in plasma after intratracheal insufflation of 3mg of DXP microparticles (DXP dose=150 μg). LOQs are represented as dashed curves. Data are presented as mean \pm SEM (Standard error of the mean), $n=3$.

The second phase corresponds to a slower decrease between 4h and 24h and can be fitted by a single exponential decrease $y = y_B \exp(-k_2/t)$ with $k_2 = 0.0182 \text{h}^{-1}$ and a characteristic half-time $t_{1/2B} = \frac{\ln 2}{k_2} = 38 \text{h} \pm 10 \text{h}$. The plasmatic exposure to DXM can be quantified by calculating the AUC and one finds $4.89 \mu\text{g.h/mL}$ (Table 4).

The ELF/plasma AUC ratio is around 138 for DXM and could not be calculated for DXP. This suggests a very pronounced local delivery and a rather low passage of molecules from the lungs to the blood stream. Experimental concentrations could be explained by three main phenomena as described in Figure 4: powder solubilization, DXP hydrolysis into DXM, DXP/DXM distribution in lung tissue and DXP/DXM passage in the blood stream. Indeed, the first part of the DXP curve in ELF may correspond to the solubilization of particles to release DXP molecules along with hydrolysis of DXP into DXM occurring due to the presence of esterases in the ELF [27,28]. The fast decrease of DXP concentration in ELF probably corresponds to DXP distribution in lung tissue. This distribution is favored by DXP lipophilicity. DXP lipophilicity also explains the very low DXP concentration detected in the bloodstream [29–31]. One can notice that DXM is cleared faster from ELF ($t_{1/2A}$ of about 1h) than from the plasma ($t_{1/2A}$ of about 3h) due to the route of administration and the physico-chemical properties of the molecule. DXM is absorbed in the blood more efficiently than DXP since it is less lipophilic. The second decrease of DXM concentration observed in the plasma with a very long half-life of 38h most probably correspond to the elimination phase of the drug.

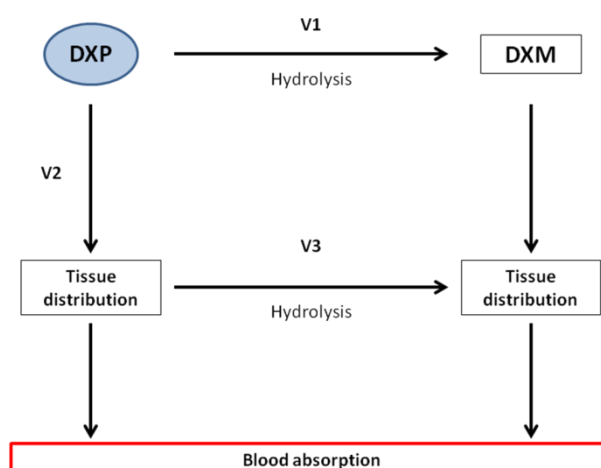


Figure 4: Schematic description of what may happen after DXP microparticles are delivered to the lungs.

One can hypothesize that the lung tissue contains a very high content of DXP that is slowly converted into DXM which in turn is absorbed in the bloodstream [32]. Our analytical conditions were not sufficient to quantify properly DXM in ELF but this molecule could be detected up to 24h suggesting a prolonged local effect.

Table 4: PK parameters (mean \pm SEM) after intratracheal insufflations of 3mg of DXP powder corresponding to a dose of 150 μ g of DXP (93 μ g of DXM).

| Parameters | ELF | Plasma | |
|-------------------------|--------------------------|-----------------|----------------|
| C_{max} (μ g/mL) | 191 | 0.37 | |
| t_{max} (h) | 0.5 | 0.5 | |
| AUC (μ g.h/mL) | 674 | 4.89 | |
| DXM | AUC/Dose (h/mL) | 7.22 | 0.053 |
| | $t_{1/2A}$ (h) | 0.93 \pm 0.20 | 3.34 \pm 0.3 |
| | $t_{1/2B}$ (h) | NA | 38 \pm 10 |
| | AUC_{ELF}/AUC_{Plasma} | 138 | |
| | C_{max} (μ g/mL) | 10 794 | NA |
| | t_{max} (h) | 0.5 | NA |
| | $t_{1/2A}$ (h) | 2.8 \pm 0.4 | NA |
| DXP | $t_{1/2B}$ (h) | 0.63 \pm 0.01 | NA |
| | AUC (μ g.h/mL) | 26 703 | NA |
| | AUC/Dose (h/mL) | 178 | NA |

C_{max} , maximal concentration in ELF and in plasma; t_{max} , time of maximal concentration in ELF and in plasma ; AUC, area under the curve of ELF and plasma concentrations ; $t_{1/2}$, terminal half-life in ELF and in plasma.

DXM and DXP were not dosed in the lung tissue since it has been demonstrated that it is difficult to fully exsanguinate the animal and therefore to separate what accounts for tissue from what accounts for remaining blood. Although inhaled corticosteroids are prescribed daily, the

literature is very scarce about comparison between ELF and plasma concentrations after lung administration on animal models. A recent article by Mo et al. [33] present the pharmacokinetic study of prednisolone administered by intratracheal instillation at the dose of 1mg/kg to guinea pigs of about 300g. They compared ethanol/water 3/1 (v/v) solutions of prednisolone and L-carnitine esters of prednisolone. The resulting AUC of prednisolone after prednisolone succinate-L-carnitine administration was around $100 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}=0.1 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. If one divides this value by the dose of prednisolone the $\text{AUC}_{\text{PRED}}/\text{dose}= 0.0033 \text{ h}/\text{mL}$, whereas we find 0.053 h/mL for DXM in plasma, signature of a higher systemic exposure for rather similar doses (1mg/kg equivalent prednisolone and 0.3mg/kg equivalent DXM). Concentrations in ELF could not be compared since these authors measured drug in tissue and not in the lavage fluid. However prednisolone succinate-L-carnitine could be quantified in the lung tissue up to 6h after administration. These results are in agreement with what we have obtained. Since Mo et al. have shown an anti-asthmatic efficacy, our microparticles of DXP might hold great potential to prevent inflammation in the lungs.

4. Conclusion

Pharmacokinetics parameters of DXP and DXM in lung and plasma were evaluated after intratracheally insufflation of DXP microparticles obtained by spray drying, optimized for lung delivery. Although a thorough model of what is happening after DXP microparticle lung administration is not proposed, one can notice that the prodrug (DXP) remains for up to 6h in the ELF at very high concentration, that the drug itself (DXM) can be detected at rather important concentration in ELF up to 24h. The passage of DXP from the lungs to the bloodstream is very poor whereas DXM seems to be absorbed in the blood more easily. Overall however the systemic exposure seems low compared to the lung exposure which suggests limited side effects. Therapeutic efficacy of this formulation remains to be evaluated in the future by using asthmatic animal models.

Acknowledgments:

A. N'Guessan fellowship is supported by University Félix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire, Univ Paris-Sud, Châtenay-Malabry and Institut Galien Paris-Sud CNRS UMR 8612. Authors would like to thank V. Domergue-Dupont, L. Aragão-Santiago, C. Ruge and D.D. Pham for

support with animal experiments. Institut Galien Paris-Sud is a member of the Laboratory of Excellence LERMIT supported by a grant from ANR (ANR-10-LABX-33).

References

- [1] P.J. Barnes, Inhaled Glucocorticoids for Asthma, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 868–875. doi:10.1056/NEJM199503303321307.
- [2] E.D. Bateman, S.S. Hurd, P.J. Barnes, J. Bousquet, J.M. Drazen, M. FitzGerald, et al., Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary, *Eur. Respir. J.* 31 (2008) 143–178. doi:10.1183/09031936.00138707.
- [3] S. Croisant, Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease, *Adv. Exp. Med. Biol.* 795 (2014) 17–29. doi:10.1007/978-1-4614-8603-9_2.
- [4] D.B. Allen, L. Bielory, H. Derendorf, R. Dluhy, G.L. Colice, S.J. Szeffler, Inhaled corticosteroids: past lessons and future issues, *J. Allergy Clin. Immunol.* 112 (2003) S1–40.
- [5] P.J. Barnes, S. Pedersen, Efficacy and Safety of Inhaled Corticosteroids in Asthma, *Am. Rev. Respir. Dis.* 148 (1993) S1–S26. doi:10.1164/ajrccm/148.4_Pt_2.S1.
- [6] C. Crim, L.N. Pierre, P.T. Daley-Yates, A review of the pharmacology and pharmacokinetics of inhaled fluticasone propionate and mometasone furoate, *Clin. Ther.* 23 (2001) 1339–1354. doi:10.1016/S0149-2918(01)80113-2.
- [7] B.E. Gilbert, V. Knight, Pulmonary delivery of antiviral drugs in liposome aerosols, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.* 7 (1996) 148–154. doi:10.1016/S1045-1870(96)81012-0.
- [8] M. Beck-Broichsitter, J. Gauss, C.B. Packhaeuser, K. Lahnstein, T. Schmehl, W. Seeger, et al., Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model, *Int. J. Pharm.* 367 (2009) 169–178. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.09.017.
- [9] M. Boisson, M. Jacobs, N. Grégoire, P. Gobin, S. Marchand, W. Couet, et al., Comparison of Intrapulmonary and Systemic Pharmacokinetics of Colistin Methanesulfonate (CMS) and Colistin after Aerosol Delivery and Intravenous Administration of CMS in Critically Ill Patients, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 7331–7339. doi:10.1128/AAC.03510-14.
- [10] N.A. Hanania, K.R. Chapman, S. Kesten, Adverse effects of inhaled corticosteroids, *Am. J. Med.* 98 (1995) 196–208. doi:10.1016/S0002-9343(99)80404-5.
- [11] J.A.V. Burgt, W.W. Busse, R.J. Martin, S.J. Szeffler, D. Donnell, Efficacy and safety overview of a new inhaled corticosteroid, QVAR (hydrofluoroalkane-beclomethasone extrafine inhalation aerosol), in asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 1209–1226. doi:10.1067/mai.2000.111582.
- [12] D. Czock, D.F. Keller, F.M. Rasche, U. Häussler, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids, *Clin. Pharmacokinet.* 44 (2005) 61–98. doi:10.2165/00003088-200544010-00003.
- [13] M. Hübner, G. Hochhaus, H. Derendorf, Comparative Pharmacology, Bioavailability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Inhaled Glucocorticosteroids, *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 25 (2005) 469–488. doi:10.1016/j.iaac.2005.05.004.
- [14] G.M. Cochrane, R. Horne, P. Chanez, Compliance in asthma, *Respir. Med.* 93 (1999) 763–769. doi:10.1016/S0954-6111(99)90260-3.
- [15] B. Asgharian, O.T. Price, W. Hofmann, Prediction of particle deposition in the human lung using realistic models of lung ventilation, *J. Aerosol Sci.* 37 (2006) 1209–1221. doi:10.1016/j.jaerosci.2006.01.002.

- [16] Z. Zhang, C. Kleinstreuer, J.F. Donohue, C.S. Kim, Comparison of micro- and nano-size particle depositions in a human upper airway model, *J. Aerosol Sci.* 36 (2005) 211–233. doi:10.1016/j.jaerosci.2004.08.006.
- [17] B.L. Chawes, M. Govoni, E. Kreiner-Møller, N.H. Vissing, P. Poorisrisak, L. Mortensen, et al., Systemic exposure to inhaled beclomethasone/formoterol DPI is age and body size dependent, *Respir. Med.* 108 (2014) 1108–1116. doi:10.1016/j.rmed.2014.05.007.
- [18] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, M. Besnard, A. Bochot, et al., Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 116–126. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.013.
- [19] C. Gómez Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, E. Fattal, Morphology, structure and supramolecular organization of hybrid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine-hyaluronic acid microparticles prepared by spray drying, *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* 34 (2008) 12–21. doi:10.1016/j.ejps.2008.02.003.
- [20] W. Wijagkanalan, Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Teshima, H. Sasaki, M. Hashida, Enhanced Anti-Inflammation of Inhaled Dexamethasone Palmitate Using Mannosylated Liposomes in an Endotoxin-Induced Lung Inflammation Model, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 1183–1192. doi:10.1124/mol.108.050153.
- [21] S. Neuhaus, L. Seifert, W. Vautz, J. Nolte, A. Bufe, M. Peters, Comparison of metabolites in exhaled breath and bronchoalveolar lavage fluid samples in a mouse model of asthma, *J. Appl. Physiol.* 111 (2011) 1088–1095. doi:10.1152/jappphysiol.00476.2011.
- [22] M. Kohno, M. Haramoto, O. Nakajima, L. Yang, S. Hinotsu, M. Yokohira, et al., Antedrug Budesonide by Intrapulmonary Treatment Attenuates Bleomycin-Induced Lung Injury in Rats with Minimal Systemic Adverse Effects, *Biol. Pharm. Bull.* 33 (2010) 1206–1211. doi:10.1248/bpb.33.1206.
- [23] M. Khoder, N. Tsapis, V. Domergue-Dupont, C. Gueutin, E. Fattal, Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 281–288. doi:10.1016/j.ejps.2010.06.018.
- [24] R. Nave, H. Watz, H. Hoffmann, H. Boss, H. Magnussen, Deposition and metabolism of inhaled ciclesonide in the human lung, *Eur. Respir. J.* 36 (2010) 1113–1119. doi:10.1183/09031936.00172309.
- [25] K. Alhareth, C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, F. Moussa, HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles, *J. Chromatogr. B.* 887–888 (2012) 128–132. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.025.
- [26] A.V.L. Gontijo, J. Brillault, N. Grégoire, I. Lamarche, P. Gobin, W. Couet, et al., Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 1. Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Grepafloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 3942–3949. doi:10.1128/AAC.02818-14.
- [27] O. von Deimling, M. Müller, E. Eisenhardt, The non-specific esterases of mouse lung, *Histochemistry.* 78 (1983) 271–284. doi:10.1007/BF00489504.
- [28] A. Basu, R.H. Glew, R.W. Evans, G. Bandik, Isolation and characterization of a fatty acyl esterase from rat lung, *Arch. Biochem. Biophys.* 261 (1988) 384–393.
- [29] H. Derendorf, G. Hochhaus, B. Meibohm, H. Möllmann, J. Barth, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids, *J. Allergy Clin. Immunol.* 101 (1998) S440–S446. doi:10.1016/S0091-6749(98)70156-3.
- [30] J.W. Georgitis, The 1997 asthma management guidelines and therapeutic issues relating to the treatment of asthma*, *Chest.* 115 (1999) 210–217. doi:10.1378/chest.115.1.210.

- [31] S. Edsbäcker, C.-J. Johansson, Airway Selectivity: An Update of Pharmacokinetic Factors Affecting Local and Systemic Disposition of Inhaled Steroids, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (2006) 523–536. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_355.x.
- [32] M. Johnson, Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled glucocorticoids, *J. Allergy Clin. Immunol.* 97 (1996) 169–176. doi:10.1016/S0091-6749(96)80217-X.
- [33] J. Mo, L.Y. Lim, Z.-R. Zhang, l-Carnitine ester of prednisolone: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a type I prodrug, *Int. J. Pharm.* 475 (2014) 123–129. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.049.

Discussion générale

L'objectif de ce travail était de formuler de grosses particules poreuses (GPP) à base de palmitate de dexaméthasone (DXP) comme molécule modèle pour une libération prolongée intrapulmonaire. Ce travail s'est déroulé en trois grandes étapes. La première partie a consisté à préparer des microparticules de DXP et à les caractériser. Puis nous nous sommes attelés à développer une méthode d'extraction et de dosage de la DXP et de son métabolite actif, la dexaméthasone (DXM) dans les fluides biologiques : plasma et liquide de lavage broncho-alvéolaire. Cette méthode de dosage nous a permis dans la dernière partie de ce travail de conduire l'étude pharmacocinétique des particules formulées, administrées par voie pulmonaire chez le rat sain. Cette discussion générale est donc pour nous, l'occasion d'évaluer l'ensemble des résultats obtenus tout au long de ce travail.

1. Formulation de microparticules poreuses à base de palmitate de dexaméthasone

Pour formuler les microparticules de DXP, nous nous sommes référés aux résultats des travaux de thèse de Carolina Gomez-Gaete qui a optimisé des particules similaires avec la DXM comme principe actif, pour une administration intravitréenne. Nous avons donc utilisé des conditions opératoires de spray drying proches de celles de Gomez-Gaete (Tableau 1) : température d'entrée (110 °C), température de sortie (53-55 °C), aspiration (100%) et flux d'air (600 L/h). Nous avons également choisi pour nos différentes formulations d'utiliser les mêmes excipients à savoir la DPPC et l'AH avec une proportion d'AH (20% p/p) qui a donné les meilleurs résultats lors de cette étude [1]. Ces excipients sont biocompatibles et biodégradables et ont largement été utilisés dans de nombreux médicaments à inhaler [2,3]. Le screening a porté sur 20 formulations en faisant varier la concentration en DXP de 0 à 80% (p/p), avec des concentrations en DPPC variant en sens contraire de 80 à 0% (p/p). Initialement, nous avons choisi de formuler un lot A de 17 formulations avec les conditions opératoires de spray drying détaillées dans le tableau 1. Les différentes poudres obtenues étaient de couleur blanche et d'aspect floconneux. L'analyse granulométrique a permis de déterminer des diamètres géométriques médians (D_{50}) qui se stabilisent autour de 4,5 μ m pour les particules dont la teneur en DXP varie entre 0 et 55% (p/p). Puis on observe une augmentation de la taille jusqu'à 10,7 μ m pour les concentrations en DXP de 55% à 75%. Ces résultats se rapprochent de ceux de Gomez-Gaete qui avoisinent 6,7 μ m pour la même teneur en AH (20%) [4]. En outre, cette augmentation de la taille des particules lorsque la teneur en DXP augmente pourrait très probablement découler de l'agrégation des particules entre elles liée à la forte teneur en DXP dont la température de fusion avoisine 60-65°C [5]. En effet, la

DXP étant en grande quantité dans la formulation, sous l'effet de la forte température de la chambre de séchage (150°C) et bien que la température de sortie du spray-dryer soit autour de 50°C, la DXP pourrait fondre et favoriser ainsi l'agglomération des particules entre elles. Cette cohésivité interparticulaire a également été relevée par Gomez-Gaete avec la DXM, mais uniquement pour les particules ne contenant pas d'AH dans la formulation [6]. Compte tenu de la forte tendance à l'agrégation observée aux concentrations élevées en DXP, nous avons délibérément décidé de limiter la suite des expériences aux faibles concentrations en DXP (0% à 15%). Et vu la faible taille des particules de ce premier lot (A), nous avons procédé à la préparation d'un 2^e lot (B) de particules en réduisant le débit d'air (Tableau 1) dans la chambre de chauffage tout en conservant constants les autres paramètres. Cela a permis d'atomiser des gouttelettes plus grosses [7]. Les particules obtenues avec ces nouvelles conditions opératoires possèdent un diamètre géométrique médian 3 fois plus grand (13,7 µm) pour les mêmes teneurs en DXP (0 à 15%) et les mêmes compositions en DPPC et AH.

Tableau 1. Conditions opératoires utilisées pour le Spray drying des formulations de DXP [1].

| Paramètres | Conditions opératoires | |
|-------------------------------|------------------------|---------|
| | Lot A | Lot B |
| Débit d'alimentation (mL/min) | 17 | 17 |
| Température d'entrée (°C) | 150 ± 2 | 150 ± 2 |
| Température de sortie (°C) | 50 ± 6 | 55 ± 4 |
| Aspiration (%) | 100 | 100 |
| Débit d'air (L/h) | 536 | 414 |

L'observation au microscope électronique à balayage des différentes poudres a révélé des particules sphériques, poreuses, creuses de tailles variables mais cohérentes avec celles mesurées par granulométrie laser. Les soupçons d'agrégats interparticulaires ont été confirmés par des images de particules agrégées les unes sur les autres. Et plus la concentration en DXP augmente et plus cette agrégation est importante. Des mesures de densité tassée ont été réalisées sur les lots A et B. Les résultats obtenus varient de 0,087 à 0,14 g/cm³ pour le lot A et se stabilisent plutôt autour de 0,06 g/cm³ pour le lot B (Tableau 2). Ces faibles densités démontrent bien la bonne porosité de ces particules [8]. Les diamètres aérodynamiques (D_{aer})

équivalents déterminés par calcul sont respectivement de 1,5 μm et 3 μm pour les lots A et B. Ces résultats paraissent prometteurs pour un bon dépôt pulmonaire [9]. Nous avons donc mené des tests complémentaires pour mieux quantifier les propriétés aérodynamiques des formulations en utilisant un impacteur multi-étage à cascade (Tableau 2) [10]. Pour les deux lots on observe une diminution de la fraction de particules fines (FPF) au fur et à mesure que la concentration en DXP augmente. En effet, pour le lot A, la FPF diminue de 36% à 24% lorsque le pourcentage de DXP augmente de 0 à 15%. Cette diminution de la FPF est plus prononcée pour les particules du lot B, passant de 40% à 14% lorsque le pourcentage de DXP augmente de 0 à 15%. Une diminution similaire est observée pour la fraction alvéolaire (AF) lorsque la teneur en DXP augmente: de 25% à 15% pour le lot A et de 30% à 7,5% pour le lot B. Les plus grandes valeurs de FPF (40%) ont été obtenues pour les particules à 5% de DXP des deux lots A et B et la plus grande valeur d'AF a été obtenue pour les particules à 5% du lot B. Au vu des excellents résultats aérodynamiques des particules à 5% de DXP du lot B, nous avons choisi de retenir cette formulation pour l'étude pharmacocinétique *in vivo* chez le rat sain.

Tableau 2 : Paramètres aérodynamiques des lots A et B des microparticules de DXP

| Paramètres | Lot A | | | Lot B | | |
|------------------------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 5% | 10% | 15% | 5% | 10% | 15% |
| ρ (g/cm ³) | 0.14±0.01 | 0.14±0.009 | 0.114±0.006 | 0.053±0.003 | 0.065±0.003 | 0.066±0.002 |
| D ₅₀ (μm) | 4.6 ± 0.1 | 4.3 ± 0.1 | 4.3 ± 0.1 | 13.7±0.3 | 12.3±0.3 | 12.8±0.1 |
| D _{aer} (μm) | 1.7 ± 0.1 | 1.6 ± 0.1 | 1.5 ± 0.1 | 3.2±0.2 | 3.1±0.1 | 3.3±0.1 |
| FPF (%) | 36.3 ± 0.3 | 31.3 ± 1.1 | 24.0 ± 0.6 | 40.7 ± 7.0 | 21.8 ± 1.0 | 14.3 ± 1.1 |
| AF (%) | 25.4 ± 0.4 | 20.9 ± 0.9 | 14.9 ± 0.5 | 30.4 ± 6.1 | 12.9 ± 0.7 | 7.4 ± 0.6 |

Cependant, avant d'entamer l'étude *in vivo*, il nous est paru utile d'explorer la cinétique de libération *in vitro* de la DXP à partir de la formulation du lot B à 5% de DXP [11]. Les résultats de ce test ont mis en évidence une libération immédiate d'environ 2% de DXP 6h après la dispersion à l'aide d'un vortex de 25 mg de la poudre dans 25 mL de PBS à 37°C (correspondant à une concentration de 50 $\mu\text{g/mL}$ de DXP). Ce pourcentage correspond à une concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ de DXP. Puis une libération lente et progressive d'environ 2% à 5% a été observée au bout de 21 jours d'étude. Il convient de noter que nous n'avons pas détecté de quantité significative de DXM au cours de cette expérience. Bien que les conditions de libération soient très différentes de ce qui se passerait *in vivo*, ces résultats laissent penser à

une éventuelle libération prolongée de la DXP à partir des particules. Nous nous attendons à ce que, *in vivo*, les estérases et les lipases présentes naturellement dans les voies respiratoires, favorisent la libération de la DXP telle qu'observée par certains auteurs [12]. Du coup la libération *in vivo* sera forcément plus rapide qu'*in vitro*. En outre, il faut noter que la DXP est très peu soluble dans le PBS et donc la détection de molécules libres de DXP dans le milieu de dissolution pourrait être liée à la présence de DPPC dans les particules qui favorise le transfert de la DXP vers le milieu de dissolution [13]. Pour mieux comprendre la cinétique de libération de la DXP, nous avons exploré les possibles interactions entre la DPPC et la DXP par une étude calorimétrique différentielle à balayage (DSC) sur des échantillons hydratés contenant de 0% à 15% de DXP. Pour les particules dépourvues de DXP (0%), le thermogramme a révélé une prétransition très plate de la DPPC en raison de l'interaction avec l'AH et une transition de phase principale typique de la DPPC à $T_{\text{onset}} = 42,3^{\circ}\text{C}$ avec une enthalpie de AH = 45.8J / g. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Gomez-Gaete pour des microparticules similaires. Lorsqu'elles sont hydratées, les bicouches lipidiques gonflent et forment des phases liquides cristallines typiques de la DPPC [14]. Lorsque la teneur en DXP augmente, on observe la disparition de la prétransition et la température de transition principale de la DPPC diminue de 42 à 39°C avec aussi une diminution de l'enthalpie de la DPPC. A 15% de DXP, on peut observer l'apparition d'un nouvel événement thermique avec une T_{onset} de 55,7°C. Nous pensons que cet événement thermique pourrait bien correspondre à une transition de phase de la DXP bien qu'aucune référence n'ait été trouvée dans la littérature ou bien à la formation d'une nouvelle phase mixte DPPC-DXP. En effet, lorsque les expériences de DSC ont été réalisées avec une teneur plus élevée en DXP, le pic est devenu plus important. Pour les pourcentages de DXP compris entre 5 et 10%, la combinaison de la diminution de la température de transition de la DPPC et de l'enthalpie du pic de transition confirme l'insertion de la DXP dans la bicouche de DPPC comme il a été observé dans d'autres études réalisées avec le cholestérol [15]. Cette insertion paraît plutôt logique puisque la DXP possède une chaîne aliphatique de 16 atomes de carbone, exactement la même longueur que les chaînes aliphatiques de la DPPC. Outre la faible solubilité de la DXP, l'insertion de la DXP au sein des bicouches de DPPC explique en outre, la libération lente et progressive observée lors de l'étude de la cinétique de libération réalisée *in vitro*.

2. Développement et validation d'une méthode de dosage par HPLC de la DXP et la DXM dans le plasma et le liquide de lavage bronchoalveolaire.

Pour quantifier la DXP et la DXM dans le plasma et le liquide de lavage bronchoalveolaire (BALF), il nous a fallu mettre au point une méthode de dosage par HPLC car n'ayant pas trouvé de méthodes de dosage adaptées dans la littérature. A cet effet, nous avons testé deux techniques d'extraction : l'une utilisant l'acétone comme solvant d'extraction et l'autre, un mélange chloroforme-méthanol [16,17]. La méthode au chloroforme-méthanol (9/1, v/v) a présenté les meilleurs taux d'extraction pour la DXP qui sont respectivement de 84,3 % et 65,8% dans le BALF et le plasma. Pour la DXM, la méthode au chloroforme-méthanol a également donné les meilleurs résultats avec respectivement 86,6 % et 82,9% dans le BALF et le plasma. Nous avons donc choisi cette méthode pour l'extraction de la DXP et la DXM dans le BALF et le plasma. Quant au dosage de ces deux molécules, deux méthodes HPLC ont été retenues après plusieurs tests réalisés sur différentes méthodes. Les analyses ont été effectuées à 240 nm en utilisant une colonne SymmetryShield™ RP18 (5 µm, 250 x 4,6 mm). La température de la colonne a été maintenue à 40°C. Deux phases mobiles (A et B) ont été utilisées : solvant A (eau/acétonitrile, 60/40 (v/v)) et solvant B (eau/acétonitrile, 15/85 (v/v)). Pour le dosage de la DXP, le solvant B a été utilisé en mode isocratique pendant 40 min avec un débit de 1,2 mL/min. Pour le dosage de la DXM, les 2 solvants ont été utilisés avec le même débit (1,2 mL/min) pendant 47 min selon un gradient d'élution décrit dans l'article 2. Des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) pour chaque molécule ont été déterminées.

Tableau 3: Limites de détection et de quantification de DXM et DXP après extraction.

| Paramètres | | Plasma | BALF | ELF |
|------------|-------------|--------|------|-----|
| DXM | LOQ (µg/mL) | 0.133 | 0.1 | 33 |
| | LOD (µg/mL) | 0.04 | 0.03 | 10 |
| DXP | LOQ (µg/mL) | 0.17 | 0.1 | 33 |
| | LOD (µg/mL) | 0.06 | 0.03 | 10 |

Les résultats de la DXP et la DXM obtenus dans le BALF ont été convertis en concentrations du liquide de revêtement épithélial (ELF pour "*epithelial lining fluid*") en tenant compte du

volume théorique d'ELF rapporté dans la littérature (30 $\mu\text{L}/\text{kg}$) [18] et du volume de PBS utilisé pour effectuer le lavage bronchoalvéolaire (3 ml). Ainsi, pour un rat de 300 g, le facteur de dilution déterminé par calcul est de 333. Bien que cette méthode de calcul ne prenne pas en compte le facteur de dilution individuel de chaque rat, il permet tout de même d'obtenir des résultats acceptables dans l'ensemble.

3. Etude pharmacocinétique des microparticules poreuses après administration pulmonaire chez le rat sain.

Suite au screening effectué sur les poudres de DXP préparées par spray drying, la poudre obtenue selon les conditions de séchage B et contenant 5% p/p de DXP a montré de bonnes propriétés morphologiques et aérodynamiques répondant ainsi aux critères requis pour être désignée comme étant de grosses particules poreuses (LPP) et adaptées pour atteindre les poumons profonds après inhalation. En effet, les particules de cette formulation sont sphériques, poreuses, creuses avec un diamètre géométrique médian de 13,7 μm et une densité tassée de 0,05 g/cm^3 [19]. En outre, l'évaluation aérodynamique *in vitro* a donné une FPF d'environ 40% avec une AF de l'ordre de 30%. Aussi avons-nous porté notre choix cette formulation pour une évaluation pharmacocinétique. A cet effet, 3 mg de poudre correspondant à 150 μg de DXP ont été administrés par voie intratrachéale à des rats puis le sang et le liquide de lavage bronchoalvéolaire ont été prélevés à différents temps après l'administration ($t = 30\text{min}, 1\text{h}, 2\text{h}, 3\text{h}, 4\text{h}, 6\text{h}, 18\text{h}$ et 24h) [16,20]. L'analyse des résultats des dosages montre que la concentration de DXP dans l'ELF 30 min après l'administration est maximale (10.794 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ce qui correspond à environ 65% de la concentration initiale théorique de la dose administrée. Ensuite cette concentration diminue progressivement selon trois différentes phases. La première phase se situe entre 30min et 3h et correspond à une diminution lente de la concentration en DXP de 10.794 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (65% dose) à 5.657 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (34% dose). La seconde phase correspond à une diminution plus rapide entre 3h et 6h, la concentration de DXP passant de 5.657 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (34% dose) à 204 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1,2% de la dose). La dernière phase correspond à une lente élimination de la DXP contenue dans les poumons. Quant à la DXM, on observe une diminution rapide de sa concentration dans l'ELF entre 30 min et 4 h, puis elle se stabilise tout en restant en dessous de la LOQ mais au dessus de la LOD. Par ailleurs, nous avons déterminé les aires sous la courbe (AUC) de la DXP et de la DXM dans l'ELF. Elles sont de 26.703 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ et de 674 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$ respectivement pour la DXP et la DXM. Dans le plasma, les concentrations de DXP obtenues sont très faibles avec

des valeurs situées entre la LOQ et la LOD. L'exposition systémique à la DXP est donc négligeable. Pour la DXM, les concentrations plasmatiques obtenues sont faibles mais restent supérieures à la LOQ de la méthode de dosage et semblent suivre une diminution en deux étapes. La première diminution a lieu entre 30min et 4h et la deuxième phase entre 4h et 24h, correspondant à une diminution plus lente de la concentration en DXM. L'exposition systémique de la DXM a été quantifiée par le calcul de l'AUC qui est de l'ordre de 4,89 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$. Le rapport $\text{AUC}_{\text{ELF}}/\text{AUC}_{\text{plasma}}$ calculé est d'environ 138 pour la DXM et n'a pu être déterminé pour la DXP. Ces résultats militent fortement en faveur d'une bonne distribution pulmonaire de la DXP et la DXM avec une faible absorption sanguine de ces molécules ce qui est prometteur pour le traitement local de l'asthme. Ces concentrations expérimentales pourraient être expliquées par trois principaux phénomènes: la phase de solubilisation des particules, l'hydrolyse de la DXP en DXM et la distribution de la DXP et de la DXM dans le tissu pulmonaire ainsi que leur passage dans la circulation sanguine. En effet, la première partie de la courbe de DXP dans l'ELF pourrait correspondre à la phase de solubilisation des particules pour libérer les molécules de DXP combinée certainement à l'hydrolyse de la DXP en DXM, la molécule active, sous l'action des estérases présentes naturellement dans les poumons [12,21]. La diminution rapide de la quantité de DXP dans l'ELF correspond certainement à la distribution de la DXP dans le tissu pulmonaire. Cette distribution est favorisée par la lipophilie de la DXP. Cette lipophilie pourrait également expliquer la très faible quantité de DXP détectée dans le sang [22,23]. Nous avons par ailleurs noté que la DXM était très rapidement éliminée des poumons ($t_{1/2} = 1\text{h}$) contrairement au plasma ($t_{1/2} = 3\text{h}$). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la DXM soit absorbée plus efficacement dans le sang que la DXP car étant moins lipophile que celle-ci. En outre, la seconde diminution de la quantité de DXM observée dans le plasma correspond plus probablement à une lente élimination de la DXM avec une $t_{1/2} = 38\text{h}$. Cette lente élimination nous autorise à penser que le tissu pulmonaire servirait de réservoir de stockage de la DXP à partir duquel elle serait progressivement hydrolysée en DXM qui va agir directement sur les cellules pulmonaires puis être absorbée dans le sang [24]. Ces résultats sont proches de ceux d'une étude qui a montré que des formes réversibles d'ester d'acide gras de budésonide qui en présence de cellules pulmonaires, entraînent la formation d'un pool de dépôt intracellulaire de la prodrogue dans ces cellules. Lorsque la concentration intracellulaire de budésonide libre diminue, l'ester de budésonide est hydrolysé pour donner le budésonide, la forme active du principe actif. Ce processus augmente la rétention du budésonide dans les voies respiratoires, ce qui prolonge sa durée d'action et réduit le risque d'effets systémiques [25]. Malheureusement, notre méthode

de dosage n'étant pas suffisamment sensible, nous n'avons pas pu quantifier de façon précise les faibles concentrations en DXM dans l'ELF. Cela nous aurait permis de suivre le profil d'évolution de la DXM jusqu'à 24h après l'administration des particules afin de confirmer une probable action prolongée sur les poumons. Par ailleurs, bien que les corticostéroïdes inhalés soient largement utilisés en thérapeutique, très peu d'études ont rapporté des résultats comparatifs de concentrations plasmatiques et pulmonaires après une administration intratrachéale sur des modèles animaux. Un article récent de Mo et al. a présenté une étude pharmacocinétique de la prednisolone administrée par instillation intratrachéale à la dose de 1 mg/kg à des cobayes de 300 g environ. Cette étude a comparé les solutions d'éthanol/eau (3/1, v/v) de prednisolone et un ester de L-carnitine de prednisolone. L'AUC résultant de l'administration de prednisolone après l'administration de l'ester de L-carnitine de prednisolone était d'environ $100 \mu\text{g}\cdot\text{h} / \text{L} = 0,1 \mu\text{g}\cdot\text{h} / \text{mL}$. Si l'on divise cette valeur par la dose de prednisolone on trouve $0,0033 \text{ h} / \text{mL}$, alors que nous avons trouvé $0,053 \text{ h} / \text{mL}$ pour la DXM dans le plasma. Ce qui laisse penser à une exposition systémique supérieure pour des doses assez similaires (1 mg/kg de prednisolone équivalent et 0,3 mg/kg d'équivalent DXM). Les concentrations dans l'ELF ne peuvent pas être comparées puisque ces auteurs ont dosé la teneur du médicament dans le tissu et non dans le BALF. Le succinate de L-carnitine de prednisolone a pu être quantifié dans le tissu pulmonaire jusqu'à 6h après l'administration. Les particules formulées par Mo et al. ont montré une bonne efficacité antiasthmatique, ce qui donne un bon potentiel à nos microparticules de DXP pour avoir des effets anti-inflammatoires dans les poumons [26].

4. Libération prolongée des glucocorticoïdes inhalés dans les voies respiratoires

Au terme de ce travail dont l'objectif était d'optimiser des particules poreuses de glucocorticoïdes dont la libération serait prolongée dans les tissus pulmonaires afin de réduire la fréquence d'administration et améliorer l'observance par les patients, il n'est pas inutile de revenir sur cette problématique qui nous a guidé tout au long de ce travail. En effet, les glucocorticoïdes inhalés (GCI) étaient initialement administrés à des doses quotidiennes réparties en trois ou quatre fois [27]. Mais en pratique, cette fréquence d'administration est apparue très contraignante pour les patients notamment dans le cas des pathologies chroniques tel que l'asthme avec pour conséquence un défaut d'observance des traitements. Des améliorations ont donc été apportées à la formulation galénique de ces GCI et à la conception des inhalateurs utilisés. Ce qui a permis de réduire la fréquence d'administration à deux prises

journalières pour des effets thérapeutiques pratiquement similaires à ceux obtenus avec les posologies antérieures [28]. Donc à ce jour, la plupart des GCI sont administrés deux fois par jour. Toutefois, il a été rapporté que près de la moitié des patients utilisant les GCI, en l'occurrence les patients asthmatiques, adhèrent très peu à l'observance de leur traitement malgré leurs effets bénéfiques [29,30]. Or l'efficacité d'un traitement dépend fortement de l'observance des patients à ce traitement. Aussi dans le but d'améliorer l'observance thérapeutique des GCI, de récentes études ont proposé de modifier la formulation des particules de GCI de sorte à moduler leur libération dans les poumons et permettre de réduire la fréquence d'administration à une prise unique journalière [31]. C'est dans cette dynamique que s'inscrit notre travail qui nous a permis de mettre au point des LPP servant de réservoir à la DXP qui s'hydrolyse progressivement pour libérer la DXM responsable de l'activité pharmacologique. Cette prolongation d'action pourrait contribuer à réduire la fréquence d'administration de la DXP à une prise unique quotidienne. Plusieurs études ont comparé les modes d'administration unique et double des GCI [32–38]. Des patients traités une fois par jour avec du budésonide ou du dipropionate de béclo méthasone ont obtenu une efficacité clinique similaire à celle des patients traités deux fois par jour [32–34]. Des résultats similaires ont été obtenus avec des prises journalières uniques de propionate de fluticasone, de ciclesonide et de furoate de mometasone. Une bonne tolérance et des améliorations significatives des signes cliniques ont été observées ainsi que des fonctions pulmonaires améliorées [32,39–42]. Les horaires d'administration des doses uniques n'ont eu aucune influence sur les résultats thérapeutiques du ciclesonide et du fluticasone [43]. Cela permet de réduire le nombre d'inhalations quotidiennes et d'augmenter l'observance des patients à la thérapie aux GCI [25,37,38]. Cependant, il a été rapporté que le traitement en prise unique des GCI bien qu'ayant donné de bons résultats cliniques confirmés par la spirométrie (PEF, FEV1), a présenté quelques insuffisances comparativement au traitement en double prise quotidienne quant au traitement de fond de l'inflammation des voies respiratoires avec des taux significativement plus élevés d'oxyde nitrique exhalé (FeNO) [44,45]. Ces résultats gagneraient à être confirmés par des études randomisées avec un plus grand nombre de patients.

Références

- [1] C. Gomez Gaete, Développement de vecteurs hybrides nano/microparticulaires pour la libération de corticostéroïdes, Paris 11, 2007. <http://www.theses.fr/2007PA114822> (accessed April 20, 2015).
- [2] F. Iskandar, A.B.D. Nandiyanto, W. Widiyastuti, L.S. Young, K. Okuyama, L. Gradon, Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1027–1034. doi:10.1016/j.actbio.2008.11.016.
- [3] A. Hasanovic, C. Hollick, K. Fischinger, C. Valenta, Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 75 (2010) 148–153. doi:10.1016/j.ejpb.2010.03.014.
- [4] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, M. Besnard, A. Bochot, et al., Supramolecular organization and release properties of phospholipid-hyaluronan microparticles encapsulating dexamethasone, *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Für Pharm. Verfahrenstechnik EV.* 70 (2008) 116–126. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.013.
- [5] 14899-36-6 CAS MSDS (Dexamethasone palmitate) Melting Point Boiling Point Density CAS Chemical Properties, (n.d.). http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB41074390.aspx (accessed May 10, 2015).
- [6] C. Gómez Gaete, N. Tsapis, L. Silva, C. Bourgaux, E. Fattal, Morphology, structure and supramolecular organization of hybrid 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine–hyaluronic acid microparticles prepared by spray drying, *Eur. J. Pharm. Sci.* 34 (2008) 12–21. doi:10.1016/j.ejps.2008.02.003.
- [7] H. Cabral-Marques, R. Almeida, Optimisation of spray-drying process variables for dry powder inhalation (DPI) formulations of corticosteroid/cyclodextrin inclusion complexes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 73 (2009) 121–129. doi:10.1016/j.ejpb.2009.05.002.
- [8] F. Tavakoli, J.S. Olfert, Determination of particle mass, effective density, mass–mobility exponent, and dynamic shape factor using an aerodynamic aerosol classifier and a differential mobility analyzer in tandem, *J. Aerosol Sci.* 75 (2014) 35–42. doi:10.1016/j.jaerosci.2014.04.010.
- [9] B. Asgharian, O.T. Price, W. Hofmann, Prediction of particle deposition in the human lung using realistic models of lung ventilation, *J. Aerosol Sci.* 37 (2006) 1209–1221. doi:10.1016/j.jaerosci.2006.01.002.
- [10] European Pharmacopoeia Online 8.1, (n.d.). <http://online6.edqm.eu/ep801/mobile/> (accessed May 10, 2015).
- [11] M. Anderson, A. Omri, The Effect of Different Lipid Components on the In Vitro Stability and Release Kinetics of Liposome Formulations, *Drug Deliv.* 11 (2004) 33–39. doi:10.1080/10717540490265243.
- [12] A. Basu, R.H. Glew, R.W. Evans, G. Bandik, Isolation and characterization of a fatty acyl esterase from rat lung, *Arch. Biochem. Biophys.* 261 (1988) 384–393.
- [13] R. Smith, C. Tanford, The critical micelle concentration of 1- α -dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions, *J. Mol. Biol.* 67 (1972) 75–83. doi:10.1016/0022-2836(72)90387-7.
- [14] N.T. Carolina Gómez-Gaete, Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles., *Int. J. Pharm.* 331 (2007) 153–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.11.028.
- [15] A. Kessel, N. Ben-Tal, S. May, Interactions of Cholesterol with Lipid Bilayers: The Preferred Configuration and Fluctuations, *Biophys. J.* 81 (2001) 643–658. doi:10.1016/S0006-3495(01)75729-3.
- [16] M. Khoder, N. Tsapis, V. Domergue-Dupont, C. Gueutin, E. Fattal, Removal of residual colonic ciprofloxacin in the rat by activated charcoal entrapped within zinc-pectinate beads, *Eur. J. Pharm. Sci.* 41 (2010) 281–288. doi:10.1016/j.ejps.2010.06.018.
- [17] K. Alhareth, C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, F. Moussa, HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles, *J. Chromatogr. B.* 887–888 (2012) 128–132. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.025.
- [18] A.V.L. Gontijo, J. Brillault, N. Grégoire, I. Lamarche, P. Gobin, W. Couet, et al., Biopharmaceutical Characterization of Nebulized Antimicrobial Agents in Rats: 1. Ciprofloxacin, Moxifloxacin, and Grepafloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 3942–3949. doi:10.1128/AAC.02818-14.

- [19] D.A. Edwards, J. Hanes, G. Caponetti, J. Hrkach, A. Ben-Jebria, M.L. Eskew, et al., Large Porous Particles for Pulmonary Drug Delivery, *Science*. 276 (1997) 1868–1872. doi:10.1126/science.276.5320.1868.
- [20] W. Wijagkanalan, Y. Higuchi, S. Kawakami, M. Teshima, H. Sasaki, M. Hashida, Enhanced Anti-Inflammation of Inhaled Dexamethasone Palmitate Using Mannosylated Liposomes in an Endotoxin-Induced Lung Inflammation Model, *Mol. Pharmacol.* 74 (2008) 1183–1192. doi:10.1124/mol.108.050153.
- [21] O. von Deimling, M. Müller, E. Eisenhardt, The non-specific esterases of mouse lung, *Histochemistry*. 78 (1983) 271–284. doi:10.1007/BF00489504.
- [22] H. Derendorf, Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of inhaled corticosteroids in relation to efficacy and safety, *Respir. Med.* 91, Supplement 1 (1997) 22–28. doi:10.1016/S0954-6111(97)90102-5.
- [23] S. Edsbäcker, C.-J. Johansson, Airway Selectivity: An Update of Pharmacokinetic Factors Affecting Local and Systemic Disposition of Inhaled Steroids, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (2006) 523–536. doi:10.1111/j.1742-7843.2006.pto_355.x.
- [24] M. Johnson, Pharmacodynamics and pharmacokinetics of inhaled glucocorticoids, *J. Allergy Clin. Immunol.* 97 (1996) 169–176. doi:10.1016/S0091-6749(96)80217-X.
- [25] R. Brattsand, A. Miller-Larsson, The role of intracellular esterification in budesonide once-daily dosing and airway selectivity, *Clin. Ther.* 25, Supplement 3 (2003) C28–C41. doi:10.1016/S0149-2918(03)80304-1.
- [26] J. Mo, L.Y. Lim, Z.-R. Zhang, l-Carnitine ester of prednisolone: Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a type I prodrug, *Int. J. Pharm.* 475 (2014) 123–129. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.049.
- [27] J. Gaddie, I.W. Reid, C. Skinner, G.R. Petrie, D.J.M. Sinclair, K.N.V. Palmer, AEROSOL BECLOMETHASONE DIPROPIONATE: A DOSE-RESPONSE STUDY IN CHRONIC BRONCHIAL ASTHMA, *The Lancet*. 302 (1973) 280–281. doi:10.1016/S0140-6736(73)90788-5.
- [28] B. Pj, A new approach to the treatment of asthma., *N. Engl. J. Med.* 321 (1989) 1517–1527.
- [29] C. F, D. A, Objective measurements of compliance in asthma treatment., *Ann. Allergy*. 73 (1994) 527–532.
- [30] P.H. Mayo, J. Richman, H.W. Harris, Results of a Program to Reduce Admissions for Adult Asthma, *Ann. Intern. Med.* 112 (1990) 864–871. doi:10.7326/0003-4819-112-11-864.
- [31] M.M. Graves, C.D. Adams, J.M. Portnoy, Adherence in young children with asthma., *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 6 (2006) 124–127. doi:10.1097/01.all.0000216856.85021.11.
- [32] Eisen SA, Miller DK, Woodward RS, Spitznagel E, Przybeck TR, The effect of prescribed daily dose frequency on patient medication compliance, *Arch. Intern. Med.* 150 (1990) 1881–1884. doi:10.1001/archinte.1990.00390200073014.
- [33] E.R. McFadden, T.B. Casale, T.B. Edwards, J.P. Kemp, W.J. Metzger, H.S. Nelson, et al., Administration of budesonide once daily by means of Turbuhaler to subjects with stable asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 104 (1999) 46–52. doi:10.1016/S0091-6749(99)70112-0.
- [34] M. Gagnon, J. CÃfÃ´te, J. Milot, H. Turcotte, L.P. Boulet, COMparative safety and efficacy of single or twice daily administration of inhaled beclomethasone in moderate asthma., *Chest*. 105 (1994) 1732–1737. doi:10.1378/chest.105.6.1732.
- [35] M. Masoli, M. Weatherall, S. Holt, R. Beasley, Budesonide once versus twice-daily administration: meta-analysis, *Respirology*. 9 (2004) 528–534. doi:10.1111/j.1440-1843.2004.00635.x.
- [36] M. Masoli, M. Weatherall, R. Beasley, Fluticasone given once versus twice a day: Meta-analysis, *Respirology*. 10 (2005) 183–188. doi:10.1111/j.1440-1843.2005.00688.x.
- [37] M.E. Purucker, C.J. Rosebraugh, F. Zhou, R.J. Meyer, Inhaled fluticasone propionate by diskus in the treatment of asthma*: A comparison of the efficacy of the same nominal dose given either once or twice a day, *Chest*. 124 (2003) 1584–1593. doi:10.1378/chest.124.4.1584.
- [38] P. Weiner, M. Weiner, Y. Azgad, Long term clinical comparison of single versus twice daily administration of inhaled budesonide in moderate asthma., *Thorax*. 50 (1995) 1270–1273. doi:10.1136/thx.50.12.1270.

- [39] R. Singer, R. Wood-Baker, Review of the effect of the dosing interval for inhaled corticosteroids in asthma control, *Intern. Med. J.* 32 (2002) 72–78. doi:10.1046/j.1445-5994.2002.d01-31.x.
- [40] R. ZuWallack, J. Adelglass, D.P. Clifford, S.P. Duke, P.D. Wire, M. Faris, et al., Long-term efficacy and safety of fluticasone propionate powder administered once or twice daily via inhaler to patients with moderate asthma*, *Chest.* 118 (2000) 303–312. doi:10.1378/chest.118.2.303.
- [41] C. Frois, E.Q. Wu, S. Ray, G.L. Colice, Inhaled corticosteroids or long-acting β -agonists alone or in fixed-dose combinations in asthma treatment: A systematic review of fluticasone/budesonide and formoterol/salmeterol, *Clin. Ther.* 31 (2009) 2779–2803. doi:10.1016/j.clinthera.2009.12.021.
- [42] J.P. Kemp, R.B. Berkowitz, S.D. Miller, J.J. Murray, K. Nolop, J.E. Harrison, Mometasone furoate administered once daily is as effective as twice-daily administration for treatment of mild-to-moderate persistent asthma, *J. Allergy Clin. Immunol.* 106 (2000) 485–492. doi:10.1067/mai.2000.109431.
- [43] H. Hasegawa, N. Inui, T. Fujisawa, J. Sato, H. Nakamura, H. Watanabe, et al., Once-daily inhaled glucocorticosteroid administration in controlled asthma patients, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21 (2008) 663–667. doi:10.1016/j.pupt.2008.03.001.
- [44] H. Medley, S. Orozco, A. Allen, Efficacy and Safety Profile of Fluticasone Furoate Administered Once Daily in the Morning or Evening: A Randomized, Double-Blind, Double-Dummy, Placebo-Controlled Trial in Adult and Adolescent Patients With Persistent Bronchial Asthma, *Clin. Ther.* 34 (2012) 1683–1695. doi:10.1016/j.clinthera.2012.06.024.
- [45] Once-daily inhaled corticosteroids for the treatment of asth... : Current Opinion in Pulmonary Medicine, LWW. (n.d.). http://journals.lww.com/copulmonarymedicine/Fulltext/2004/01000/Once_daily_inhaled_corticosteroids_for_the.4.aspx (accessed May 17, 2015).
- [46] S.J. Szefler, H. Mitchell, C.A. Sorkness, P.J. Gergen, G.T. O'Connor, W.J. Morgan, et al., Management of asthma based on exhaled nitric oxide in addition to guideline-based treatment for inner-city adolescents and young adults: a randomised controlled trial, *The Lancet.* 372 (2008) 1065–1072. doi:10.1016/S0140-6736(08)61448-8.

Conclusion générale et Perspectives

Cette étude nous a permis de formuler par spray drying des microparticules poreuses de palmitate de dexaméthasone (DXP) destinées à être administrées par voie pulmonaire pour le traitement des maladies inflammatoires des voies respiratoires dont la plus fréquente est l'asthme. Nous avons commencé par encapsuler dans des microparticules poreuses un glucocorticoïde modèle, la DXP, une prodrogue lipophile de la dexaméthasone (DXM). La matrice utilisée est essentiellement constituée de la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) et d'acide hyaluronique (AH), deux excipients biocompatibles et biodégradables très utilisés dans la formulation de nombreuses particules à inhaler. La forte propension à la cohésivité interparticulaire observée pour les fortes concentrations en DXP (55 à 75%) nous a amené à limiter l'étude aux formulations de concentrations plus faibles en DXP (0 à 15%) car ayant présenté des tailles géométriques plus homogènes. En outre, les tailles des particules initialement obtenues étant petites (4,3 μm), nous avons jugé utile de modifier les paramètres du spray dryer en diminuant le débit de l'air utilisé pour l'atomisation. Ce qui nous a permis d'avoir des particules de taille 3 fois plus grande (13,7 μm). Par la suite, les résultats de la caractérisation physicochimique ont permis d'isoler la formulation contenant 5% de DXP du lot B dont les propriétés morphologiques et aérodynamiques répondent bien aux critères des grosses particules poreuses. Ce type de particules étant reconnu pour être adapté à l'administration pulmonaire avec une bonne prédiction de dépôt dans la partie basse des voies respiratoires. Elle se présente sous forme de poudre blanche floconneuse constituée de particules sphériques, creuses et poreuses dont les diamètres géométrique et aérodynamique sont respectivement de 13,7 μm et 3,1 μm pour une faible densité estimée à 0,05 g/cm^3 . L'évaluation aérodynamique *in vitro* de cette formulation a montré un bon potentiel avec une fraction de particules fines (FPF) environ de 40% et une fraction alvéolaire (AF) autour de 30%. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a mis en évidence des interactions entre la DXP et la DPPC. Cette configuration moléculaire pourrait ralentir la libération de la DXP à partir de la matrice DPPC-AH et favoriser ainsi une éventuelle libération prolongée de la DXP dans les voies respiratoires.

Après avoir caractérisé les microparticules, nous avons évalué la libération du principe actif *in vitro*. Ainsi, la cinétique de libération *in vitro* a montré une libération relativement lente avec moins de 5% de DXP dans le surnageant après 21 jours confirmant les prévisions de libération prolongée. Nous avons ensuite consacré une bonne partie de nos travaux à la mise au point d'une méthode d'extraction et de dosage de la DXP et de son métabolite actif, la DXM dans

le plasma et le liquide de lavage bronchoalvéolaire (BALF). Cette partie a été très laborieuse car les quantités de DXP et de DXM à déterminer dans le BALF et surtout dans le plasma étaient très faibles. Il nous a donc fallu trouver une méthode analytique par HPLC reproductible et d'une sensibilité acceptable.

La dernière partie de notre travail a été consacrée à l'étude pharmacocinétique après administration pulmonaire de la formulation optimisée chez le rat sain. L'administration intratrachéale de notre formulation et le dosage de la DXP et de la DXM dans le BALF et le plasma ont révélé une distribution pulmonaire rapide (30 min) des deux molécules avec une faible absorption sanguine. Cette distribution serait favorisée d'une part par la bonne dispersibilité de la poudre due à ses propriétés aérodynamiques et d'autre part par le caractère lipophile de la DXP. Cette lipophilie serait également à la base de la très faible quantité de DXP détectée dans le sang. Le profil pharmacocinétique de la DXP et de la DXM à savoir la diminution rapide de la DXP dans le liquide pulmonaire et sa faible concentration plasmatique associées à la très lente élimination plasmatique de la DXM ($t_{1/2} = 38\text{h}$) nous autorise à penser que le tissu pulmonaire servirait de réservoir de stockage de la DXP à partir duquel elle serait progressivement hydrolysée en DXM qui va agir directement sur les cellules pulmonaires puis être par la suite, absorbée dans le sang. Ces résultats *in vivo* viennent corroborer ceux obtenus lors de l'étude calorimétrique différentielle et de la cinétique de libération *in vitro* prédisant des propriétés de libération prolongée aux particules que nous avons formulées. Ce qui donne un bon potentiel à nos microparticules pour espérer avoir des effets anti-inflammatoires prolongés dans les poumons avec la possibilité de réduire le nombre d'administrations et améliorer l'observance thérapeutique des patients.

Au terme de ce travail, plusieurs pistes pourraient être davantage explorées afin d'améliorer les résultats préliminaires que nous avons obtenus. En effet, les propriétés de prolongation d'action détectées sur les microparticules poreuses de DXP, pourraient être améliorées par l'encapsulation de la DXP dans des particules Troyennes avec des polymères tels que le chitosan, le poly (acide lactique co-glycolique) (PLGA) ou le poly-L-acide lactique (PLLA) qui sont déjà très utilisés pour la formulation de particules à libération prolongée dans les poumons. En outre, étant donnée la faible sensibilité de la méthode analytique utilisée, il serait utile de l'améliorer ou de développer une nouvelle méthode de dosage plus sensible de sorte à pouvoir suivre de façon précise les quantités de DXP et de DXM aussi bien dans les

poumons que dans le plasma. Cela permettra de mieux comprendre le mécanisme pharmacocinétique de ces deux molécules. On pourrait également envisager de doser les quantités de DXP et de DXM effectivement présentes dans le tissu pulmonaire afin de confirmer l'hypothèse de stock-réservoir que nous avons émise pour expliquer la libération progressive de la DXM dans le sang. L'utilisation de modèles animaux asthmatiques associée à un suivi de l'évolution des marqueurs inflammatoires pourrait permettre de mieux apprécier l'efficacité thérapeutique de ces particules poreuses de DXP. En ce qui concerne la stabilité des particules, il serait intéressant d'effectuer des études de vieillissement sous différentes conditions de température et d'humidité. D'autre part, le traitement antiasthmatique nécessitant très souvent l'utilisation d'un bronchodilatateur en plus d'un glucocorticoïde, il serait donc intéressant en perspective d'explorer dans le cadre des particules Troyennes l'association synergique de la DXP et d'un bronchodilatateur. Enfin, il serait également important de tester les différents types d'inhalateurs qui seraient appropriés à l'administration de cette formulation afin d'en garantir une bonne dispersibilité et un bon dépôt pulmonaire.

RESUME

Cette étude nous a permis de mettre au point par spray drying un système vecteur innovant de corticostéroïdes destiné à être administré par voie pulmonaire pour le traitement des maladies inflammatoires des voies respiratoires dont la plus fréquente est l'asthme. Cette forme pharmaceutique appelée "grosse particule poreuse" dont la matrice est constituée de deux excipients biocompatibles et biodégradables, la 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC) et l'acide hyaluronique (AH) encapsulant le palmitate de dexaméthasone (DXP). La première partie de ce travail a consisté à optimiser l'encapsulation d'un glucocorticoïde modèle, la DXP, une prodrogue lipophile de la dexaméthasone (DXM) au sein de microparticules poreuses par spray-drying. Les résultats des tests physicochimiques des particules formulées, ont permis d'isoler la poudre à 5% de DXP du lot B dont les propriétés morphologiques et aérodynamiques répondent bien aux critères des grosses particules poreuses. La cinétique de libération *in vitro* a montré une libération relativement lente avec moins de 5% de DXP dans le surnageant après 21 jours confirmant les prévisions de libération prolongée de la DSC. Nous avons ensuite mis au point une méthode d'extraction et de dosage de la DXP et de son métabolite actif, la DXM dans le plasma et le liquide de lavage bronchoalveolaire (BALF). La dernière partie de notre travail a été consacrée à l'étude pharmacocinétique après administration pulmonaire de la formulation optimisée chez le rat sain. Les résultats *in vivo* ont confirmé ceux obtenus lors de l'étude calorimétrique différentielle et de la cinétique de libération *in vitro* prédisant des effets anti-inflammatoires prolongés dans les poumons avec la possibilité de réduire le nombre d'administrations et améliorer l'observance thérapeutique des patients.

MOTS CLES

Microparticules-Grosses particules poreuses-Corticostéroïdes-Spray-Drying

ECOLE DOCTORALE

Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué,

Pôle Pharmacotechnie et Physico-chimie

UFR de Pharmacie, Université Paris-Sud

5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry, France

LABORATOIRES

UMR-CNRS 8612-Laboratoire de Physico-chimie, Pharmacotechnie et Biopharmacie

Equipe V : Vectorisation Pharmaceutiques des Molécules Fragiles

5, rue Jean Baptiste Clément, 92296 Chatenay-Malabry, France

Département de Pharmacotechnie, Biopharmacie, Cosmétologie et de Législation

UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Félix Houphouët-Boigny

Côte d'Ivoire