



HAL
open science

Modèles précliniques ex vivo pour l'étude de la délivrance pulmonaire d'aérosols dans le traitement de pathologies pulmonaires

Yoann Montigaud

► **To cite this version:**

Yoann Montigaud. Modèles précliniques ex vivo pour l'étude de la délivrance pulmonaire d'aérosols dans le traitement de pathologies pulmonaires. Autre. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSEM028 . tel-03188032

HAL Id: tel-03188032

<https://theses.hal.science/tel-03188032v1>

Submitted on 1 Apr 2021

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.



N°d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Ecole des Mines de Saint-Etienne

Ecole Doctorale N° 488
Sciences, Ingénierie, Santé

Spécialité de doctorat : Ingénierie des Procédés
Discipline : Développement et applications de modèles précliniques

Soutenue publiquement le 09/12/2020, par :
Yoann MONTIGAUD

**Modèles précliniques ex vivo pour
l'étude de la délivrance pulmonaire
d'aérosols dans le traitement de
pathologies pulmonaires**

Devant le jury composé de :

HEUZE-VOURC'H Nathalie	Directeur de Recherche Inserm	Université de Tours / INSERM U1100	Rapporteuse
TSAPIS Nicolas	Directeur de Recherche CNRS	Université Paris-Saclay / CNRS 8612	Rapporteur
CREMILLIEUX Yannick	Directeur de Recherche CNRS	Université de Bordeaux / CNRS 5255	Examineur
REYCHLER Gregory	Professeur	Université Catholique de Louvain	Examineur
ROCHE Nicolas	PU-PH	Université Paris Descartes	Examineur
POURCHEZ Jérémie	Directeur de Recherche	Mines Saint-Etienne	Directeur de thèse
PERINEL Sophie	MCU-PH	Université Jean Monnet	Co-encadrante
PREVOT Nathalie	MCU-PH	Université Jean Monnet	Co-encadrante

Spécialités doctorales
 SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX
 MECANIQUE ET INGENIERIE
 GENIE DES PROCEDES
 SCIENCES DE LA TERRE
 SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT

Responsables :
 K. Wolski Directeur de recherche
 S. Drapier, professeur
 F. Gruy, Maître de recherche
 B. Guy, Directeur de recherche
 D. Graillot, Directeur de recherche

Spécialités doctorales
 MATHEMATIQUES APPLIQUEES
 INFORMATIQUE
 SCIENCES DES IMAGES ET DES FORMES
 GENIE INDUSTRIEL
 MICROELECTRONIQUE

Responsables
 O. Roustant, Maître-assistant
 O. Boissier, Professeur
 JC. Pinoli, Professeur
 N. Absi, Maître de recherche
 Ph. Lalevée, Professeur

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

ABSI	Nabil	MR	Génie industriel	CMP
AUGUSTO	Vincent	CR	Image, Vision, Signal	CIS
AVRIL	Stéphane	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
BADEL	Pierre	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	CIS
BALBO	Flavien	PR2	Informatique	FAYOL
BASSEREAU	Jean-François	PR	Sciences et génie des matériaux	SMS
BATTON-HUBERT	Mireille	PR2	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BEIGBEDER	Michel	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
BLAYAC	Sylvain	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
BOISSIER	Olivier	PR1	Informatique	FAYOL
BONNEFOY	Olivier	PR	Génie des Procédés	SPIN
BORBELY	Andras	MR(DR2)	Sciences et génie des matériaux	SMS
BOUCHER	Xavier	PR2	Génie Industriel	FAYOL
BRODHAG	Christian	DR	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
BRUCHON	Julien	MA(MDC)	Mécanique et ingénierie	SMS
CAMEIRAO	Ana	MA(MDC)	Génie des Procédés	SPIN
CHRISTIEN	Frédéric	PR	Science et génie des matériaux	SMS
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR1	Génie Industriel	CMP
DEBAYLE	Johan	MR	Sciences des Images et des Formes	SPIN
DEGEORGE	Jean-Michel	MA(MDC)	Génie industriel	Fayol
DELAFOSSÉ	David	PR0	Sciences et génie des matériaux	SMS
DELORME	Xavier	MA(MDC)	Génie industriel	FAYOL
DESRAYAUD	Christophe	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DJENIZIAN	Thierry	PR	Science et génie des matériaux	CMP
BERGER-DOUCE	Sandrine	PR1	Sciences de gestion	FAYOL
DRAPIER	Sylvain	PR1	Mécanique et ingénierie	SMS
DUTERTRE	Jean-Max	MA(MDC)		CMP
EL MRABET	Nadia	MA(MDC)		CMP
FAUCHEU	Jenny	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	SMS
FAVERGEON	Loïc	CR	Génie des Procédés	SPIN
FEILLET	Dominique	PR1	Génie Industriel	CMP
FOREST	Valérie	MA(MDC)	Génie des Procédés	CIS
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR(DR2)	Sciences de la Terre	SPIN
GAVET	Yann	MA(MDC)	Sciences des Images et des Formes	SPIN
GERINGER	Jean	MA(MDC)	Sciences et génie des matériaux	CIS
GOEURIOT	Dominique	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
GONDRAN	Natacha	MA(MDC)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
GONZALEZ FELIU	Jesus	MA(MDC)	Sciences économiques	FAYOL
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences et génie de l'environnement	SPIN
GROSSEAU	Philippe	DR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	PR1	Génie des Procédés	SPIN
HAN	Woo-Suck	MR	Mécanique et ingénierie	SMS
HERRI	Jean Michel	PR1	Génie des Procédés	SPIN
KERMOUCHE	Guillaume	PR2	Mécanique et Ingénierie	SMS
KLOCKER	Helmut	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	MR(DR2)	Sciences et génie de l'environnement	FAYOL
LERICHE	Rodolphe	CR	Mécanique et ingénierie	FAYOL
MALLIARAS	Georges	PR1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	PR2	Mécanique et ingénierie	CIS
MOUTTE	Jacques	CR	Génie des Procédés	SPIN
NAVARRO	Laurent	CR		CIS
NEUBERT	Gilles			FAYOL
NIKOLOVSKI	Jean-Pierre	Ingénieur de recherche	Mécanique et ingénierie	CMP
NORTIER	Patrice	PR1	Génie des Procédés	SPIN
O CONNOR	Rodney Philip	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
PICARD	Gauthier	MA(MDC)	Informatique	FAYOL
PINOLI	Jean Charles	PR0	Sciences des Images et des Formes	SPIN
POURCHEZ	Jérémy	MR	Génie des Procédés	CIS
ROUSSY	Agnès	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
ROUSTANT	Olivier	MA(MDC)	Mathématiques appliquées	FAYOL
SANAUR	Sébastien	MA(MDC)	Microélectronique	CMP
SERRIS	Eric	IRD		FAYOL
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences et génie des matériaux	SMS
TRIA	Assia	Ingénieur de recherche	Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	PR2	Sciences et génie des matériaux	SMS
VIRICELLE	Jean Paul	DR	Génie des Procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences et génie des matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR0	Génie industriel	CIS
YUGMA	Gallian	CR	Génie industriel	CMP

Remerciements :

À l'issue de ces trois années de thèses (et quelques semaines supplémentaires...), je prends conscience du chemin parcouru. De mes débuts universitaires en PACES sur les bancs de la Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie jusqu'aux laboratoires que j'ai si souvent sali du Centre Ingénierie et Santé, en passant par les locaux vétustes mais à l'ambiance chaleureuse, voire tumultueuse, de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, je suis convaincu d'avoir trouvé ce que je souhaite un chacun : un métier-passion. Cette évolution, à la fois professionnelle et personnelle, n'aurait jamais été possible sans le concours de nombres de personnes. La science se construit par une démarche collaborative, en se reposant sur les briques posées par nos prédécesseurs et je suis convaincu que les chercheurs se construisent de façon similaire, sur les épaules de leurs encadrants.

À ce titre, je tiens, en premier lieu, à remercier mon directeur de thèse, Jérémie POURCHEZ, pour m'avoir encadré pendant ces trois années et pour m'avoir laissé prendre à bras le corps ces travaux de thèse. Je tiens à te signifier à quel point ta confiance, ta disponibilité et ton enthousiasme, parfois quelque peu envahissant, ont été un moteur pour moi. Merci pour toutes ces discussions enrichissantes que nous avons pu avoir. Merci d'avoir cru en moi et merci de m'avoir aidé. à mûrir tant personnellement que scientifiquement. Nos pérégrinations de congrès vont me manquer.

Je souhaite aussi exprimer ma gratitude à mes deux co-encadrantes, les Drs. Nathalie PREVOT et Sophie PERINEL, sans qui ces travaux de thèse n'auraient pu avoir la profondeur clinique et médicale que nous avons réussi à leurs donner. Nathalie, mille fois merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et tes encouragements dans les moments de doutes ou d'échec. Sans toi, ces après-midis de Médecine Nucléaire auraient été bien fades. Sophie, je te remercie pour ton énergie inépuisable, pour tes moqueries à mon égard qui savent si bien faire sourire et tes anecdotes de voyage hilarantes.

Mes remerciements à Lara LECLERC pour avoir été d'un soutien sans faille pendant trois ans. Tu fais du laboratoire un endroit où il fait bon vivre, à coup de ménage et de pizzas. Ton implication et ton aide dans tous les projets liés à ces travaux de thèse ont été d'un grand secours, de même que ta rigueur et ton organisation.

Un grand merci à Coralie LAURENT pour son aide technique et son franc-parler. Mes remerciements, aussi, à Françoise BRESSON dont la maestria m'a permis de me concentrer pleinement sur mon travail de recherche plutôt que sur les imbroglios administratifs.

Merci aux collègues du Centre Ingénierie et Santé et du 158 Cours Fauriel, que l'on ne peut tous citer mais qui n'ont jamais été avare d'encouragements. De même, je remercie l'équipe de

la Rotonde pour sa volonté sans faille et ses travaux de vulgarisation scientifique incroyables, vous avez été une source d'inspiration et de fraîcheur.

Tous mes remerciements vont à Nathalie HEUZE-VOURC'H et Nicolas TSAPIS pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse, ainsi qu'à Yannick CREMILLIEUX, Nicolas ROCHE et Gregory REYCHLER qui ont acceptés d'en être les examinateurs. Je souhaite vous remercier de votre disponibilité. Vous composez un jury pluridisciplinaire devant lequel j'ai hâte de défendre mes travaux.

Mes remerciements vont aussi à tous les collaborateurs externes qui ont pris part aux différents projets émaillant ces travaux de thèse. Un grand merci à Jean-Christophe DUBUS pour sa patience et ses précieux conseils. Merci à Laurent PLANTIER pour son expertise en physiologie pulmonaire, pour son implication et pour la minutie de ses réponses à mes questions. Merci à l'équipe IRM moléculaire de l'Université de Bordeaux (Noël PINAUD, Vi PHAM et anciennement Clémence BAL) pour leur aide et leur gentillesse lors des expérimentations bordelaises. Enfin, un grand merci à Nicolas BARBE pour m'avoir intégré dans son projet.

Merci aux deux internes ayant pris part à ces travaux de thèse, Quentin GEORGES et Jordan BONSIGNORE. Merci aussi à mes stagiaires, Marie SUAU, Sophie CHEVREL, Baptiste MANZOTTI, Cristina MARTIN HUIDOBRO et Ophélie RAVEL, pour leur travail de qualité, qui m'a permis d'avancer plus vite sur différents points de ces travaux de thèse. Merci aussi à Clémence GOY et Arthur REJEAUNIER pour leur aide inestimable sur les comptages des scintigraphies pulmonaires. Enfin, merci à Émilie BONCHE pour son aide lors des toutes dernières expériences.

Je tiens aussi à remercier, les copains, la fine équipe des doctorants de BioPI, Sophie GUILLOU, Özge KÖSE et Mikhael HADIDA, pour l'ambiance qu'ils ont créé dans le laboratoire et pour toutes nos discussions autour d'un verre. Mes remerciements vont aussi à la troupe Pharma, Fanny FARGETTE, Moralice KAYAL, Clotilde BOULAT, Sofia BERRABAH et Aurélie CARNET pour toutes ces années et ces moments à vos côtés. Je me dois aussi de remercier la team des Doudous, Guillaume LE BALLE, Arthur DEMELIER et Elisabeth VINCENT pour ces vacances corses avec vous.

Enfin, rien de tout ce qui suit n'aurait été possible sans le soutien sans faille des copains d'enfance, Joffrey LEBOZEC, Florian ARCAMONE, ainsi que sans l'accompagnement de ma mère, Corinne RENAUX, et de Jamie PERRET, partenaire de vie incroyable.

Table des matières

Liste des abréviations	7
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	12
Liste des équations.....	13
I. Introduction.....	16
A. Du fonctionnement de l'appareil respiratoire	16
1. Anatomie	16
2. Physiologie	22
3. Mécanique respiratoire	26
B. Aérosolthérapie.....	39
1. Rappels pharmacologiques	39
2. Définition d'un aérosol	43
3. Mécanismes de dépôts des aérosols.....	45
4. Différents dispositifs pour une même voie d'administration	57
5. Limites et défis de l'aérosolthérapie	68
C. Modèles d'études de la cartographie des dépôts d'aérosols et de l'absorption pulmonaire des principes actifs.....	71
1. Évaluation des dépôts en aérosolthérapie.....	71
2. Apports et limites des modèles <i>in silico</i>	77
3. Apports et limites des modèles <i>in vitro</i>	81
4. Apports et limites des modèles <i>in vivo</i>	85
5. Apports et limites des modèles <i>ex vivo</i>	90
II. Objectifs et méthodologie utilisée.....	93
A. Objectifs du travail de thèse	93

B.	Matériels et méthodes	96
	1.Collecte et traitement des tractus respiratoires	97
	2.Collecte des données physiologiques	100
	3.Évaluation de l'homogénéité de la ventilation et cartographie des dépôts d'aérosols	100
C.	Valorisation des modèles développés	102
III. Développement de modèles de pathologies respiratoires précliniques <i>ex vivo</i> pour l'étude du dépôt d'aérosols		
104		
A.	Modèle pédiatrique de dysplasie bronchopulmonaire en ventilation passive	105
	1.Introduction	105
	2.Article	106
	3.Informations supplémentaires.....	115
	4.Conclusions et perspectives	116
B.	Modèle adulte de fibrose pulmonaire idiopathique en ventilation passive.....	117
	1.Introduction	117
	2.Article	118
	3.Informations supplémentaires.....	138
	4.Conclusions et perspectives	145
C.	Modèle adulte de bronchopneumopathie chronique obstructive en ventilation passive	146
	1.Introduction	146
	2.Développement du modèle.....	147
	3.Conclusions.....	147
D.	Modèle adulte de ventilation mécanique invasive.....	148
	1.Introduction	148
	2.Article	149
	3.Conclusions et perspectives	157
IV. Applications précliniques des différents modèles <i>ex vivo</i>		
159		

A.	Recherche d'une position optimale pour les nébuliseurs sur un circuit respiratoire en ventilation mécanique.....	159
	1.Introduction	159
	2.Article.....	160
	3.Données supplémentaires	172
	4.Conclusions et perspectives	177
B.	Preuve de concept sur la faisabilité d'aérosolisation des nanoparticules AGuIX® par analyse multimodale de la régionalisation des dépôts pulmonaires	177
	1.Introduction	177
	2.Article.....	179
	3.Informations supplémentaires.....	191
	4.Conclusions et perspectives	198
C.	Étude de la régionalisation des dépôts pulmonaires d'un aérosol émis par une cigarette électronique	199
	1.Introduction	199
	2.Article.....	200
	3.Conclusions et perspectives	209
V.	Amélioration de la pertinence scientifique des modèles <i>ex vivo</i> : vers un modèle perfusé-ventilé	210
	1.Introduction	210
	2.Données préliminaires	210
	3.Conclusions et perspectives	211
VI.	Conclusions.....	212
	Conclusions générales.....	212
	Perspectives.....	213
	Conclusions personnelles	214
VII.	Bibliographie.....	215

VIII.	Annexes	231
I.	Rappels pharmacologiques (suite).....	231
	1.Absorption	231
	2.Distribution.....	240
	3.Métabolisation	245
	4.Élimination	248
II.	Historique des aérosols thérapeutiques.....	249
III.	Développement et optimisation d'une séquence IRM permettant l'évaluation des dépôts régionaux d'un aérosol d'AGuIX	260
	1.Introduction	260
	2.Article.....	261
	3.Informations supplémentaires.....	269
	4.Conclusions et perspectives	271
IV.	Recherche de solutions pour l'aérosolisation de principes actifs bronchodilatateurs avec une cigarette électronique	272
	1.Introduction	272
	2.Données préliminaires	272
	3.Perspectives	273

Liste des abréviations

ABC : « ATP binding cassettes »
ADME : absorption – distribution –
métabolisation – élimination
ATP : adenosine triphosphate
BPCO : bronchopneumopathie chronique
obstructive
C : compliance thoraco-pulmonaire
CE : capacité expiratoire
CI : capacité inspiratoire
CO₂ : dioxyde de carbone
CRF : capacité résiduelle fonctionnelle
CPT : capacité pulmonaire totale
CV : capacité vitale
DM : dispositif(s) médical(aux)
DPI : « dry powder inhalers »
ET : extrathoracique
FPI : fibrose pulmonaire idiopathique
FR : fréquence respiratoire
GTP : guanidine triphosphate
IM : intramusculaire
IT : intrathoracique
IV : intraveineuse
MMAD : « median mass aerodynamic
diameter »
(p)MDI : « (pressurised) metered dose
inhalers »
O₂ : dioxygène
OAT : « organic anion transporters »
OATP : « organic anion transporting
peptides »
OCT : « organic cation transporters »
OCTN : « organic cation/carnitine
transporters »
P_{ao} : pression à l'entrée des cavités nasale
et buccale

P_{alv} : pression alvéolaire
P_{atm} : pression atmosphérique
P_{bs} : pression à la surface du corps
P_{pl} : pression pleurale
P_{tp} : pression transpulmonaire
PA : principe actif
P_{aCO₂} : pression partielle en dioxyde de
carbone
P_{CO₂} : pression partielle en dioxyde de
carbone
PD : pharmacodynamie
PK : pharmacocinétique
P_{O₂} : pression partielle en dioxygène
R : résistances des voies aériennes
RES : système réticulo-endothélial
RV : volume résiduel
SDRA : syndrome de détresse respiratoire
aiguë
SC : sous-cutanée
SLC : « solutes carriers »
SMI : « soft mist inhalers »
TEMP : tomographie d'émission
monophotonique
TEP : tomographie par émission de
positron
V : volume
VAI : voies aériennes inférieures
VAS : voies aériennes supérieures
VC : volume courant
VM : ventilation-minute
VR : volume résiduel
VRE : volume de réserve expiratoire
VRI : volume de réserve inspiratoire

Liste des figures

FIGURE 1 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE HUMAIN, D'APRES (MARIEB ET KELLER 2017). ENCADRE BLEU : VOIES AERIENNES SUPERIEURES (VAS). ENCADRE VERT : VOIES AERIENNES INFERIEURES (VAI). ET : EXTRATHORACIQUE. IT : INTRATHORACIQUE.....	17
FIGURE 2 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES SUBDIVISION DE L'ARBRE TRACHEO-BRONCHIQUE, MODIFIE D'APRES (NETTER 2014).	18
FIGURE 3 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ARBRE TRACHEO-BRONCHIQUE HUMAIN, MODIFIE D'APRES (NETTER 2014).	19
FIGURE 4 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ANATOMIE STRUCTURELLE D'UN ACINUS, D'APRES (NETTER 2014).	20
FIGURE 5 - DIAGRAMME DE LA SURFACE PULMONAIRE DISPONIBLE EN FONCTION DE LA GENERATION DES VOIES AERIENNES, D'APRES (WEST ET LUKS 2015).	21
FIGURE 6 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA VASCULARISATION DES ALVEOLES PULMONAIRES, D'APRES (NETTER 2014).	21
FIGURE 7 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SEGMENTATION PULMONAIRE EN VUE ANTERIEURE, D'APRES (NETTER 2014). ...	22
FIGURE 8 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES FOSSES NASALES, D'APRES (NETTER 2014).	23
FIGURE 9 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE AU NIVEAU TRACHEAL, D'APRES (KAMINSKY 2011).	24
FIGURE 10 - ILLUSTRATION D'UNE ALVEOLE ET DE LA BARRIERE ALVEOLO-CAPILLAIRE, D'APRES (MARIEB ET HOEHN 2016).	24
FIGURE 11 - REPRESENTATION DES ECHANGES GAZEUX AU NIVEAU DE LA PAROI ALVEOLO-CAPILLAIRES, D'APRES (MARIEB ET HOEHN 2016). P_{O_2} : PRESSION PARTIELLE EN DIOXYGENE. P_{CO_2} : PRESSION PARTIELLE EN DIOXYDE DE CARBONE.	26
FIGURE 12 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MUSCLES INSPIRATOIRES ET EXPIRATOIRES, D'APRES (KAMINSKY 2011).	27
FIGURE 13 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS ANATOMIQUES LORS D'UN CYCLE RESPIRATOIRE, D'APRES (MARIEB ET HOEHN 2016).	28
FIGURE 14 - REPRESENTATION DU MODELE PULMONAIRE MONO-ALVEOLAIRE, D'APRES (HENDERSON ET AL. 2016). P_{TM} : PRESSION TRANSMEMBRANAIRE. L : LONGUEUR DU TUBE (REPRESENTANT LES VOIES AERIENNES DE CONDUCTION). R : RAYON INTERNE DU TUBE.	29
FIGURE 15 - SCHEMA DES VOLUMES ET DEBIT PULMONAIRES, MODIFIE D'APRES (WEST ET LUKS 2015).	30
FIGURE 16 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA LOCALISATION DES DIFFERENTES PRESSIONS IMPLIQUEES DANS LE FONCTIONNEMENT DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE, MODIFIE D'APRES (HENDERSON ET AL. 2016; MARIEB ET HOEHN 2016). A : LOCALISATION DES DIFFERENTES PRESSIONS APPLIQUEES SUR L'APPAREIL RESPIRATOIRE. P_{AO} : PRESSION AU NIVEAU DES CAVITES BUCCALE ET/OU NASALES. P_{BS} : PRESSION A LA SURFACE DU CORPS. P_{ALV} : PRESSION ALVEOLAIRE. P_{PL} : PRESSION PLEURALE. P_{AB} : PRESSION ABDOMINALE. B : REPRESENTATION DES DIFFERENTES PRESSIONS APPLIQUEES DIRECTEMENT SUR LES POUMONS. ...	31
FIGURE 17 - ÉVOLUTION DES PRESSIONS INTRAPULMONAIRE/ALVEOLAIRE ET DE LA PRESSION PLEURALE AU COURS DE LA RESPIRATION, D'APRES (HENDERSON ET AL. 2016).	32
FIGURE 18 - VOLUMES ET CAPACITES PULMONAIRES, MODIFIE D'APRES (KAMINSKY 2011).	33
FIGURE 19 - ÉVOLUTION DE LA RESISTANCE DES VOIES AERIENNES EN FONCTION DE LA GENERATION DE BRANCHE ETUDIEE, D'APRES (MARIEB ET HOEHN 2016).	35
FIGURE 20 - ILLUSTRATION DU GRADIENT DE PRESSION PLEURALE CHEZ L'ADULTE SAIN AU REPOS, D'APRES (WEST ET LUKS 2015)...	36
FIGURE 21 - ILLUSTRATION DU GRADIENT DE PRESSION PLEURALE CHEZ L'ADULTE SAIN POUR DE FAIBLES VOLUMES PULMONAIRES PROCHES DU RV, D'APRES (WEST ET LUKS 2015).	37

FIGURE 22 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'HETEROGENEITE DE LA VASCULARISATION PULMONAIRE CHEZ L'INDIVIDU SAIN, D'APRES (KAMINSKY 2011).....	38
FIGURE 23 - ILLUSTRATION DE L'AUTO-ADAPTATION DES RESISTANCES VASCULAIRES PULMONAIRES POUR PERMETTRE UN BON RECOUPEMENT VENTILATION-PERFUSION, D'APRES (MARIEB ET HOEHN 2016).....	39
FIGURE 24 - ILLUSTRATION DES VOIES D'ADMINISTRATION, D'APRES (WHALEN 2014). IV : INTRAVEINEUSE. IM : INTRAMUSCULAIRE. SC : SOUS-CUTANEE.	40
FIGURE 25 - APPORTS RESPECTIFS DE LA PHARMACOCINETIQUE ET DE LA PHARMACODYNAMIE A LA PHARMACOLOGIE, D'APRES (WALLER ET SAMPSON 2018b).	42
FIGURE 26 - DISTRIBUTION CUMULEE DES FRACTIONS COLLECTEES D'UN PA AEROSOLISE, D'APRES (JAAFAR-MAALEJ ET AL. 2009). d84.1, d50 ET d15.9 : DIAMETRE AERODYNAMIQUE DE LA PARTICULE AU 84,1E, 50E ET 15,9E PERCENTILES DE LA DISTRIBUTION AERODYNAMIQUE DE L'AEROSOL DETERMINEE PAR IMPACTION EN CASCADE.....	44
FIGURE 27 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 3 GRANDS MECANISMES DE DEPOT D'UNE PARTICULE AEROSOLISEE, D'APRES (BISGAARD ET AL. 2001).	45
FIGURE 28 - REPRESENTATION GRAPHIQUE DE LA REGIONALISATION DES DEPOTS D'UN AEROSOL EN FONCTION DU DIAMETRE AERODYNAMIQUE DES PARTICULES LE COMPOSANT, D'APRES (HENNING ET AL. 2010).	48
FIGURE 29 - PARAMETRES INFLUANT SUR LES DEPOTS D'AEROSOLS DANS LES POUMONS, D'APRES (JAAFAR-MAALEJ ET AL. 2009)...	49
FIGURE 30 - ILLUSTRATION DU CIBLAGE REGIONAL DES DEPOTS D'AEROSOL EN FONCTION DU PROFIL RESPIRATOIRE, D'APRES (HEYDER 2004).	52
FIGURE 31 - GRAPHE MONTRANT L'EVOLUTION DE LA TAILLE DE PARTICULES DE CHLORURE DE SODIUM DE 0,7 µM EN FONCTION DE LA PROFONDEUR DE SON TRAJET DANS LE TRACTUS RESPIRATOIRE DE DEUX VOLONTAIRES SAINS, D'APRES (BISGAARD ET AL. 2001).	54
FIGURE 32 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES COURBES DE POTENTIEL DES FORCES REPULSIVES ET DES FORCES ATTRACTIVES, AINSI QUE DE LA RESULTANTE DES FORCES SELON LA THEORIE DLVO, MODIFIE D'APRES (OHSHIMA 2014). EN BLEU : COURBE DE POTENTIEL DES FORCES REPULSIVES ELECTROSTATIQUES. EN VERT : COURBE DE POTENTIEL DES FORCES ATTRACTIVES (VAN DER WAALS ET CAPILLAIRE). EN ABCISSE : DISTANCE INTERPARTICULAIRE (H). EN ORDONNEE : POTENTIEL DES FORCES.	56
FIGURE 33 - REPRESENTATION DES DIFFERENTS COMPOSANTS D'UN PMDI, D'APRES (DA ROCHA ET AL. 2011).....	58
FIGURE 34 - SCHEMA DE FONCTIONNEMENT D'UNE VALVE DOSEUSE, D'APRES (BISGAARD ET AL. 2001). A : ETAT INITIAL – RECHARGEMENT DE LA CHAMBRE DOSEUSE. B : ETAT INTERMEDIAIRE – SCELLAGE DE LA CHAMBRE DOSEUSE. C : ETAT FINAL – LIBERATION DE L'AEROSOL.....	59
FIGURE 35 - EXEMPLE DE DIFFERENCES DANS LES MICROSTRUCTURES DES POUDRES DE GRANULOMETRIE IDENTIQUE EN FONCTION DU PROCEDE DE FABRICATION, D'APRES (BISGAARD ET AL. 2001).....	60
FIGURE 36 - ILLUSTRATION DU CHOIX DES DISPOSITIFS D'AEROSOLISATION EN FONCTION DE L'AGE ET DES CAPACITES DE L'ENFANT, D'APRES (BISGAARD ET AL. 2001).	62
FIGURE 37 – REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES COMPOSANTS D'UN SMI, MODIFIE D'APRES (HESS 2008).	62
FIGURE 38 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU FONCTIONNEMENT D'UN NEBULISEUR PNEUMATIQUE VALVE, D'APRES (O'CALLAGHAN ET BARRY 1997).	63
FIGURE 39 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN NEBULISEUR ULTRASONIQUE, D'APRES (COSTE 2019).	64
FIGURE 40 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN NEBULISEUR A TAMIS VIBRANT ACTIF, D'APRES (COSTE 2019).....	65

FIGURE 41 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA SYNCHRONISATION DES SYSTEMES DE NEBULISATION AVEC L'INSPIRATION DU PATIENT, D'APRES (PLEASANTS ET HESS 2018).	65
FIGURE 42 - EXEMPLES DES INTERFACES UTILISABLES AVEC UN NEBULISEUR, D'APRES (COSTE 2019).....	66
FIGURE 43 - EXEMPLES D'IMAGES ACQUISES LORS D'EXPERIENCE D'EVALUATION DE DEPOTS D'AEROSOLS GENERES PAR DIFFERENTS DM, D'APRES (NEWMAN ET WILDING 1999).....	72
FIGURE 44 - EXEMPLES D'IMAGES DE DEPOTS D'AEROSOL OBTENUES PAR SCINTIGRAPHIES PLANAIRES OU PAR TOMOGRAPHIE, D'APRES (NEWMAN ET WILDING 1999).	74
FIGURE 45 - REPRESENTATION SCHEMATIQUES DES PHENOMENES ONDULATOIRES CONSTATES EN IMAGERIE NUCLEAIRE, D'APRES (FLEMING ET AL. 2003).	74
FIGURE 46 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS DECOUPAGES POSSIBLES POUR LA DETERMINATION DES DOSES CENTRALES ET PERIPHERIQUES, D'APRES (NEWMAN ET AL. 2012). C : CENTRAL. I : INTERMEDIAIRE. P : PERIPHERIQUE.	75
FIGURE 47 - EXEMPLE DE MODELE IDEALISE DES VOIES AERIENNES, D'APRES (KOULLAPIS ET AL. 2018). (A) : GEOMETRIE REALISTE DES VOIES AERIENNES. (B) : GEOMETRIE ADAPTEE POUR EXPERIMENTATION. (C) : MODELE PHYSIQUE POUR EXPERIENCE DE DEPOTS.	79
FIGURE 48 - POINTS-CLES DANS LE DEVELOPPEMENT D'UN MODELE DE DEPOTS PAR CFD, D'APRES (BURROWES ET AL. 2017).....	81
FIGURE 49 - EXEMPLES D'IMPACTEUR EN CASCADE RECONNU PAR LA PHARMACOPEE EUROPEENNE, D'APRES (SON ET AL. 2011). A : ANDERSEN CASCADE IMPACTOR. B : NEXT GENERATION IMPACTOR. C : MARPLE MILLER IMPACTOR. D : MULTISTAGE LIQUID IMPINGER.	82
FIGURE 50 - EXEMPLE D'UN BANC D'ESSAI UTILISANT UNE REPLIQUE IMPRIMEE EN TROIS DIMENSION POUR L'EVALUATION DES DEPOTS D'AEROSOL, D'APRES (LECLERC ET AL. 2014A).	83
FIGURE 51 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN SYSTEME ALI, D'APRES (DE SOUZA CARVALHO ET AL. 2014).	84
FIGURE 52 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN « LUNG-ON-CHIP », D'APRES (DE SOUZA CARVALHO ET AL. 2014).	84
FIGURE 53 - RESISTANCES DES VOIES AERIENNES POUR PLUSIEURS ESPECES DE MAMMIFERES EN FONCTION DU POIDS CORPOREL, D'APRES (BATES 2015).	89
FIGURE 54 - REPRESENTATION DU MODELE PRECLINIQUE EX VIVO DEVELOPPE PAR (PERINEL ET AL. 2017). 1 : REPLIQUE DE TETE HUMAINE. 2 : VALVE A SENS UNIQUE. 3 : TUBE PLASTIQUE. 4 : FILTRE EXPIRATOIRE. 5 : TRACTUS PULMONAIRE PORCIN. 6 : ENCEINTE INSTRUMENTEE. 7 : GENERATEUR DE DEPRESSION.	92
FIGURE 55 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU MODELE PRECLINIQUE EX VIVO ACTUEL. ENT : REPLIQUE DE TETE HUMAINE PAR STEREOGRAPHIE. INTERFACE : EMBOUT BUCCAL OU MASQUE NASO-BUCCAL EN FONCTION DES BESOINS.....	97
FIGURE 56 - IMAGES D'UN TRACTUS RESPIRATOIRE PORCIN AVANT (A) ET APRES (B) L'ETAPE DE DISSECTION.....	98
FIGURE 57 - DEVENIR PHARMACOLOGIQUE D'UN PA DANS L'ORGANISME, D'APRES (WHALEN 2014).	232
FIGURE 58 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES D'ABSORPTION D'UN PA, D'APRES (KATZUNG 2017). A : DIFFUSION PASSIVE PARACELLULAIRE. B : DIFFUSION PASSIVE TRANSCELLULAIRE. C : TRANSPORT TRANSCELLULAIRE MEDIE PAR UN TRANSPORTEUR. D : TRANSPORT TRANSCELLULAIRE MEDIE PAR UN MECANISME D'ENDOCYTOSE.	233
FIGURE 59 - ILLUSTRATION DE LA DIFFUSION PASSIVE POUR LES ACIDES ET BASES FAIBLES, D'APRES (WHALEN 2014).	233
FIGURE 60 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENTS PHENOMENES PRESENTS DANS LE MECANISME DE TRANSCYTOSE, D'APRES (OH ET PARK 2014).	237
FIGURE 61 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE GRANDS PHENOMENES D'ENDOCYTOSE, D'APRES (ZHANG ET AL. 2015).	237

FIGURE 62 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA COUCHE MUQUEUSE SUR L'EPITHELIUM RESPIRATOIRE, D'APRES (LAVANYA ET AL. 2020).	240
FIGURE 63 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE CELLULAIRE DE L'ENDOTHELIUM CAPILLAIRE, D'APRES (GARCIA 2016). 1 : DIFFUSION TRANSCELLULAIRE. 2 : TRANSCYTOSE. 3 : DIFFUSION A TRAVERS LES PORES. 4 : DIFFUSION PAR LES FENESTRATIONS CAPILLAIRES. BM : MEMBRANE BASALE. E : CELLULES ENDOTHELIALES. LA TAILLE DES PORES ET DES FENESTRATIONS SONT DEPENDANTES DE LA MICROSTRUCTURE LOCALE DES CAPILLAIRES.....	241
FIGURE 64 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU FONCTIONNEMENT D'UN RECEPTEUR LORS DE LA MISE EN CONTACT AVEC UN PA, D'APRES (KATZUNG 2017).....	243
FIGURE 65 -REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MECANISMES DE SIGNALISATION CELLULAIRES, D'APRES (KATZUNG 2017). 1 : DIFFUSION TRANSMEMBRANAIRE DU PA ET ACTION SUR RECEPTEUR INTRACELLULAIRE. 2 :LIAISON A LA PARTIE EXTRACELLULAIRE D'UN RECEPTEUR TRANSMEMBRANAIRE D'ACTION DIRECTE. 3 ; LIAISON A LA PARTIE EXTRACELLULAIRE D'UN RECEPTEUR TRANSMEMBRANAIRE DONT L'ACTION EST MEDIEE PAR UNE TYROSINE KINASE. 4 : LIAISON SUR UN CANAL IONIQUE. 5 : LIAISON SUR LA PARTIE RECEPTEUR, COUPLEE A UNE PROTEINE G.....	244
FIGURE 66 - ILLUSTRATION DES DIFFERENTS PHENOMENES DE METABOLISATION DES PA DANS L'ORGANISME, D'APRES (KATZUNG 2017).	246
FIGURE 67 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU CYCLE ENTERO-HEPATIQUE, D'APRES (WALLER ET SAMPSON 2018B).....	249
FIGURE 68 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN TRAITEMENT INHALE EN ÉGYPTE ANTIQUE VERS -1554, D'APRES (STEIN ET THIEL 2017).	250
FIGURE 69 - SCHEMA DU PREMIER INHALATEUR CONNU DESSINE PAR CHRISTOPHER BENNETT EN 1654, D'APRES (SANDERS 2011).	252
FIGURE 70 - DESSIN (A) ET PHOTOGRAPHIE (B) DE L'INHALATEUR DE MUDGE, D'APRES (STEIN ET THIEL 2017).....	253
FIGURE 71 - PHOTOGRAPHIE D'UN PULVERISATEUR PORTATIF DE SALES-GIRONS, D'APRES (SANDERS 2011).	255
FIGURE 72 - SCHEMA DU DISPOSITIF AEROHALOR [®] DES LABORATOIRES ABBOTT, D'APRES (STEIN ET THIEL 2017).	256

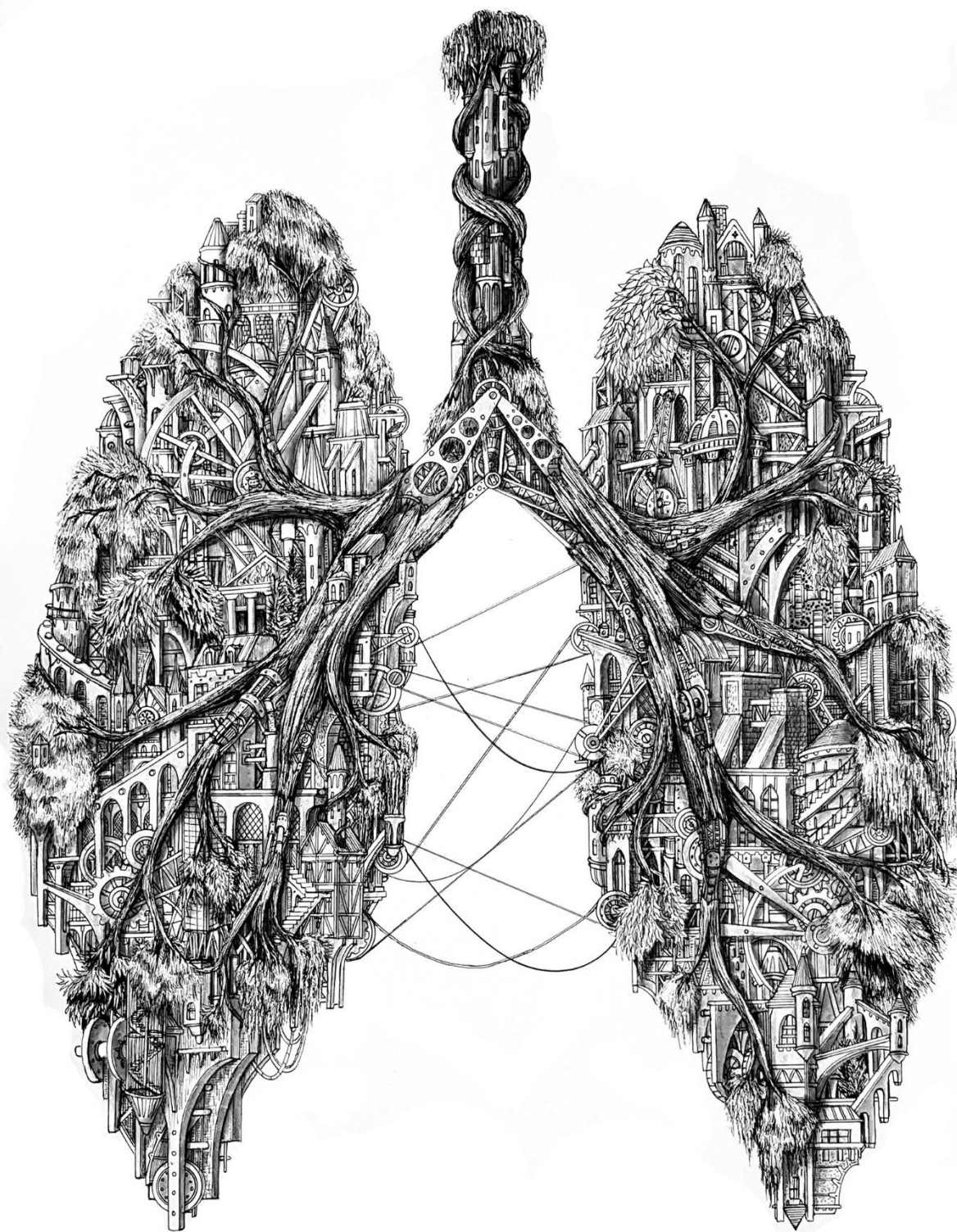
Liste des tableaux

TABLEAU 1 - COMPOSITION DU SURFACTANT HUMAIN, D'APRES (MASON ET DOBBS 2016; ALCORN 2017).	25
TABLEAU 2 - DEFINITION DES VOLUMES ET CAPACITES PULMONAIRES, D'APRES (MARIEB ET HOEHN 2016). LES VALEURS MOYENNES SONT DONNEES SELON LES ABAQUES CORRESPONDANTS A UN ADULTE SAIN DE 75 KG DE POIDS CORPOREL.	34
TABLEAU 3 - AVANTAGES ET LIMITES DES VOIES D'ADMINISTRATION LES PLUS COMMUNES, D'APRES (WHALEN 2014).....	41
TABLEAU 4 - NATURE DE LA RELATION EXISTANTE ENTRE LES MECANISMES DE DEPOT D'UNE PARTICULE INHALEE ET SES FACTEURS D'INFLUENCE, D'APRES (BISGAARD ET AL. 2001).	48
TABLEAU 5 - FORMALISATION DE LA STRUCTURE DU TRACTUS RESPIRATOIRE, MODIFIE D'APRES (HATCH ET AL. 1964).	50
TABLEAU 6 - FACTEURS REDUISANT LES DEPOTS D'AEROSOLS CHEZ LES ENFANTS DE MOINS 10 ANS, D'APRES (RUBIN 2010).	51
TABLEAU 7 - LIMITES ET AVANTAGES DES SYSTEMES D'AEROSOLISATION, D'APRES (RUBIN 2010; GUILLON ET AL. 2013)	67
TABLEAU 8 - PRINCIPALES LIMITES A OUTREPASSER POUR OPTIMISER LA VOIE PULMONAIRE, D'APRES (NEWMAN 2017).	69
TABLEAU 9 - COMPARAISON DES TECHNIQUES D'IMAGERIE UTILISABLES POUR L'EVALUATION DES DEPOTS D'AEROSOLS, D'APRES (CORCORAN 2015).	77
TABLEAU 10 - VUE D'ENSEMBLE DES DIFFERENTS MODELES MATHEMATiques UTILISES POUR L'EVALUATION DES DEPOTS D'AEROSOLS, D'APRES (GANGULY ET AL. 2019).....	78
TABLEAU 11 - COMPARAISON DES MODELES IN VITRO, D'APRES (DE SOUZA CARVALHO ET AL. 2014; UPADHYAY ET PALMBERG 2018; EHRMANN ET AL. 2020).....	85
TABLEAU 12 - ANATOMIE COMPAREE DE LA STRUCTURE DU TRACTUS RESPIRATOIRE, D'APRES (PEAKE ET PINKERTON 2015).	88
TABLEAU 13 - COMPARAISON DES PARAMETRES RESPIRATOIRES DE BASE CHEZ DIFFERENTS MAMMIFERES, D'APRES (GUILLON ET AL. 2013; HAZARI ET FARRAJ 2015).	88
TABLEAU 14 - ORGANISATION INITIALE DU PROJET AMADEUS, TEL QUE PROPOSE DANS LE DOSSIER D'ANR.....	94
TABLEAU 15 - TABLEAU RECAPITULATIF DES AXES DE RECHERCHES DE CE TRAVAIL DE THESE.	95
TABLEAU 16 - EXEMPLE DE TRANSPORTEURS RETROUVES DANS L'APPAREIL RESPIRATOIRE, D'APRES (WALLER ET SAMPSON 2018B). P-GP : P-GLYCOPROTÉINE. MRP : « MULTI-RESISTENT PROTEIN ». BCRP : « BREAST CANCER RESISTANT PROTEIN ». OAT : « ORGANIC ANION TRANSPORTERS ». OCT : « ORGANIC CATION TRANSPORTERS ».....	234
TABLEAU 17 – BIODISPONIBILITE THEORIQUE DES PA EN FONCTION DE LA VOIE D'ADMINISTRATION, D'APRES (KATZUNG 2017). ..	238
TABLEAU 18 - EXEMPLES DE PERFUSION VASCULAIRE DES ORGANES CHEZ L'ADULTE SAIN AU REPOS, D'APRES (WALLER ET SAMPSON 2018B).....	242
TABLEAU 19 - EXEMPLES DES RECEPTEURS ET PA ASSOCIES DE L'APPAREIL RESPIRATOIRE, D'APRES (WALLER ET SAMPSON 2018A).245	
TABLEAU 20 - RECAPITULATIF DES ENZYMES DE METABOLISATION DE PHASE 1 PRESENTE DANS LE TRACTUS PULMONAIRE, D'APRES (OLSSON ET AL. 2011).....	246
TABLEAU 21 - RECAPITULATIF DES ENZYMES DE METABOLISATION DE PHASE 2 PRESENTE DANS LE TRACTUS PULMONAIRE, D'APRES (OLSSON ET AL. 2011). UDP : URIDINE DIPHOSPHATE.	247
TABLEAU 22 - LISTE NON EXHAUSTIVE DES PMDI APPROUVEES AUX ÉTATS-UNIS D'AMERIQUE AVANT MISE EN PLACE DES GENERIQUES, MODIFIE D'APRES (STEIN ET THIEL 2017).....	257

Liste des équations

ÉQUATION 1 - DETERMINATION DE LA PRESSION TRANSMEMBRANAIRE DANS LE MODELE MONO-ALVEOLAIRE, D'APRES (HENDERSON ET AL. 2016). ΔP_{TM} : VARIATION DE LA PRESSION TRANSMEMBRANAIRE. ΔV : VARIATION DE VOLUME LORS D'UN CYCLE RESPIRATOIRE. C : COMPLIANCE THORACO-PULMONAIRE.....	30
ÉQUATION 2 - DETERMINATION DE LA DIFFERENCE DE PRESSION DE PART DES AUTRES DES ZONES DE CONDUCTION DANS LE MODELE MONO-ALVEOLAIRE, D'APRES (HENDERSON ET AL. 2016). Q_V : DEBIT INSPIRATOIRE CORRESPONDANT AU VOLUME D'AIR INSPIRE RAPPORTE AU TEMPS INSPIRATOIRE. ΔP_{TUBE} : VARIATION DE PRESSION ENTRE L'ORIFICE PROXIMAL ET L'ORIFICE DISTAL DU TUBE MODELISANT LES ZONES DE CONDUCTION DES VOIES AERIENNES. R : RESISTANCES DU TUBE MODELISANT LES ZONES DE CONDUCTION DES VOIES AERIENNES.	30
ÉQUATION 3 - DETERMINATION DE LA VENTILATION-MINUTE, D'APRES (WEST ET LUKS 2015). VM : VENTILATION-MINUTE. VC : VOLUME COURANT. FR : FREQUENCE RESPIRATOIRE.	32
ÉQUATION 4 - FORMULE DE LA COMPLIANCE, D'APRES (WEST ET LUKS 2015).	35
ÉQUATION 5 - FORMULE DES RESISTANCES DES VOIES AERIENNE, D'APRES (KAMINSKY 2011; WEST ET LUKS 2015). ΔP : VARIATION DE PRESSION. Q_V : DEBIT VENTILATOIRE ($Ppr48nl$). H : VISCOSITE DU GAZ. L : LONGUEUR DU TUBE (SCHEMATISANT LES VOIES AERIENNES DE CONDUCTION). R : RAYON DU TUBE.	35
ÉQUATION 6 - FORMULE DU DIAMETRE AERODYNAMIQUE D'UNE PARTICULE/GOUTTELETTE AEROPORTEE, D'APRES (XU ET HICKEY 2011; HIROTA ET TERADA 2014). D_{AE} DIAMETRE AERODYNAMIQUE. D_{GEO} : DIAMETRE GEOMETRIQUE. P : DENSITE DE LA PARTICULE/GOUTTELETES. X : FACTEUR DE FORME (1 POUR LES SPHERES ; >1 POUR PARTICULES ALLONGEES). F_D : RESISTANCE DE LA PARTICULE. H : VISCOSITE DU GAZ VECTEUR. V : VELOCITE DE LA PARTICULE. D_e : DIAMETRE HYPOTHETIQUE DE LA PARTICULE SPHERIQUE DE MEME DENSITE QUE LA PARTICULE CONSIDEREE.	43
ÉQUATION 7 - FORMULE DE DETERMINATION DE L'ECART-TYPE GEOMETRIQUE, D'APRES (JAAFAR-MAALEJ ET AL. 2009). $D_{84,1}$ ET $D_{15,9}$: DIAMETRE DE LA PARTICULE AU 84,1% ET 15,9% PERCENTILES DE LA DISTRIBUTION AERODYNAMIQUE DE L'AEROSOL DETERMINEE PAR IMPACTION EN CASCADE.	44
ÉQUATION 8 - PROBABILITE D'IMPACTION INERTIELLE D'UNE PARTICULE, D'APRES (STUART 1984; O'RIORDAN ET SMALDONE 2016). V_T : VITESSE DE SEDIMENTATION. V_A : VITESSE DU GAZ VECTEUR. θ : ANGLE NECESSAIRE POUR EVITEMENT DE L'OBSTACLE. G : ACCELERATION GRAVITATIONNELLE. R : RAYON DE LA VOIE AERIENNE CONCERNEE.	46
ÉQUATION 9 - FORMULE DE LA VITESSE DE SEDIMENTATION D'UNE PARTICULE AEROSOLISEE, D'APRES (O'RIORDAN ET SMALDONE 2016). V_T : VITESSE DE SEDIMENTATION. P : DENSITE DE LA PARTICULE. Σ : DENSITE DU GAZ VECTEUR. G: ACCELERATION GRAVITATIONNELLE. Γ : VISCOSITE DU GAZ VECTEUR. D_{AE} : DIAMETRE AERODYNAMIQUE DE LA PARTICULE.....	47
ÉQUATION 10 - FORMULE DU COEFFICIENT DE DIFFUSION POUR UNE PARTICULE AEROSOLISEE, D'APRES (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1991; O'RIORDAN ET SMALDONE 2016). K : CONSTANTE DE BOLTZMANN. T : TEMPERATURE EN KELVIN. H : VISCOSITE DU GAZ « VECTEUR ». D_{AE} : DIAMETRE AERODYNAMIQUE DE LA PARTICULE.....	47
ÉQUATION 11 - FORMULE DE CALCUL DU TAUX D'EVAPORATION D'UNE GOUTTELETTE D'AEROSOL AQUEUX, D'APRES (XU ET HICKEY 2011). D : COEFFICIENT DE DIFFUSION DE LA VAPEUR D'EAU DANS LE GAZ VECTEUR. M : POIDS MOLECULAIRE DE LA GOUTTELETTE. D_p : DIAMETRE DE LA GOUTTELETTE. P_p : DENSITE DE LA GOUTTELETTE. P_∞ ET P_p : PRESSIONS PARTIELLES DU GAZ VECTEUR ET A L'INTERFACE. T_∞ ET T_p : TEMPERATURE DU GAZ VECTEUR ET A L'INTERFACE. R : CONSTANTE DES GAZ PARFAITS.	53

ÉQUATION 12 - ÉQUATION DE LA RESULTANTE DES FORCES ATTRACTIVES ET REPULSIVES ENTRE DEUX PARTICULES DE TAILLE IDENTIQUE SELON LA THEORIE DLVO, D'APRES (OHSHIMA 2014). H : DISTANCE INTER-PARTICULAIRE. A : RAYON DE LA PARTICULE. K : CONSTANCE DE BOLTZMANN. T : TEMPERATURE. Γ : COEFFICIENT DEPENDANT DE LA CHARGE DE LA PARTICULE ET DE SON POTENTIEL DE SURFACE. $1/\kappa$: LONGUEUR DE DEBYE. A : CONSTANCE D'HAMAKER POUR DEUX PARTICULES EN SUSPENSION DANS UN GAZ.	55
ÉQUATION 13 - FORMULE DE LA DOSE NEBULISEE.....	73
ÉQUATION 14 - FORMULE DE LA DOSE INHALEE.....	73
ÉQUATION 15 - FORMULE DE LA DOSE DEPOSEE.....	73
ÉQUATION 16 - FORMULE DU CALCUL DE L'INDEX DE PENETRATION DU ^{81m}Kr , D'APRES (FAZIO ET AL. 1982).	101
ÉQUATION 17 - LOI DE FICK DE LA DIFFUSION TRANSMEMBRANAIRE, D'APRES (KATZUNG 2017).	231
ÉQUATION 18 - CINETIQUE D'ASSOCIATION ET DE DISSOCIATION D'UN PA ET D'UNE PROTEINE, D'APRES (WALLER ET SAMPSON 2018B). K_A : CONSTANCE D'ASSOCIATION. K_D : CONSTANCE DE DISSOCIATION.	241
ÉQUATION 19 - FORMULE DE CALCUL DU VOLUME DE DISTRIBUTION APPARENT, D'APRES (WHALEN 2014).....	241
ÉQUATION 20 - FORMULE DE LA CLAIRANCE, MODIFIEE D'APRES (WHALEN 2014; KATZUNG 2017; WALLER ET SAMPSON 2018B). κ : CONSTANCE D'ELIMINATION. V_D : VOLUME DE DISTRIBUTION APPARENT. $T_{1/2}$: DEMI-VIE BIOLOGIQUE DU PA.	248



Crédits : Lung city hybrid – Ardif StreetArt

Introduction

Du fonctionnement de l'appareil respiratoire

Inspiration...

Expiration...

La respiration est un processus dynamique, répétitif et primitif, commun à tous les mammifères. Elle est finement contrôlée, de manière principalement involontaire, par le système nerveux autonome, au sein du tronc cérébral (**Vassilakopoulos 2012**). L'amplitude et la fréquence de la respiration sont adaptées en fonction de la valeur de la pression partielle artérielle en dioxyde de carbone (PaCO_2) et en dioxygène (PaO_2) (**Hazari et Farraj 2015**). C'est une fonction essentielle de l'organisme, qui permet en un même processus d'assurer un apport constant et suffisant en dioxygène (O_2) aux cellules et l'élimination du dioxyde de carbone (CO_2) issu du métabolisme cellulaire (**Marieb et Keller 2017**). Pour ce faire, le système respiratoire est couplé au système cardiovasculaire, qui se charge du transport des gaz dans le sang, sous forme libre ou lié.

1. Anatomie

Le système respiratoire se découpe en deux grands sous-ensembles (**Marieb et Keller 2017; Palange et Rohde 2019**) (Figure 1) :

Les voies aériennes supérieures (VAS), composées de nombreuses structures anatomiques telles que les cavités nasale et buccale qui s'abouchent sur le pharynx, le larynx et la partie proximale de la trachée. Les VAS sont extrathoraciques (ET) et assurent l'humidification et le réchauffement de l'air inspiré. Elles sont aussi impliquées dans la phonation, par le biais des cordes vocales, sises dans le larynx.

Les voies aériennes inférieures (VAI) sont intrathoraciques (IT). Elles se composent de la partie distale de la trachée, de la carène, de l'arbre bronchique et du parenchyme pulmonaire. Par nécessité mobiles, ces structures sont encloses au sein des deux feuillets pleuraux, qui assurent la fixation sur la paroi thoracique par le biais d'un

feuillet pariétal, tandis que le feuillet viscéral est adhérent aux structures. L'espace entre les deux feuillets de la plèvre est un espace virtuel, lequel contient un liquide lubrifiant permettant le glissement d'un feuillet par rapport à l'autre. L'être humain, comme les autres mammifères, possède deux poumons, sis dans la cage thoracique et séparés l'un de l'autre par le médiastin, qui accueille, entre autres, les structures cardiovasculaires. Les poumons sont posés sur le diaphragme.

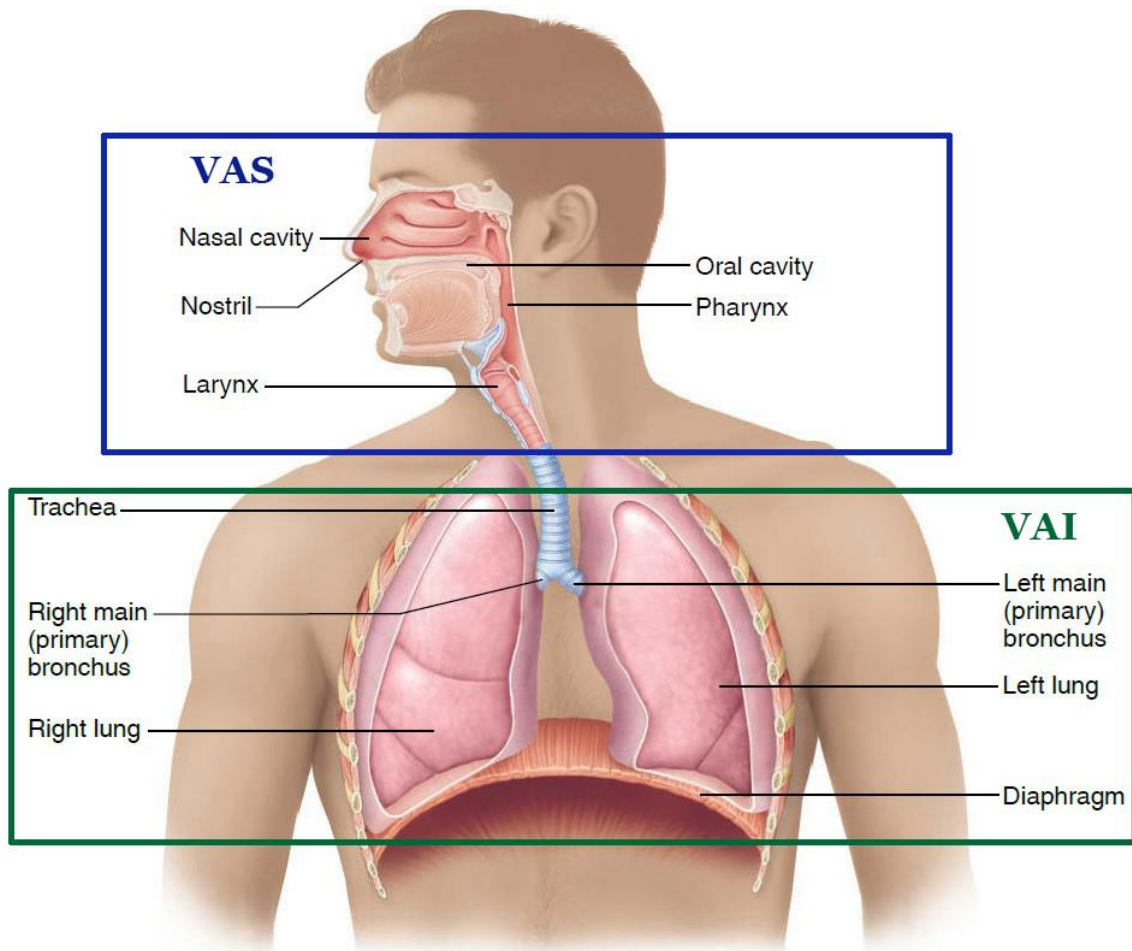


Figure 1 - Représentation schématique de l'appareil respiratoire humain, d'après (Marieb et Keller 2017). Encadré bleu : voies aériennes supérieures (VAS). Encadré vert : voies aériennes inférieures (VAI). ET : extrathoracique. IT : intrathoracique.

Au cours du développement humain, l'implication des VAS dans la respiration pulmonaire est constante dès la naissance et la ligature du cordon ombilical. Chez le nouveau-né et jusqu'à 4 mois environ, la respiration est exclusivement nasale du fait de l'utilisation prioritaire de la cavité buccale pour l'alimentation (Palange et Rohde 2019). Entre 4 mois et un an de vie, la respiration est naso-buccale, avant de devenir nasale majoritaire. En effet, l'être humain après un an présente une respiration buccale facultative, principalement utilisée lors d'un effort physique ou lors d'une majoration des besoins ventilatoires (West et Luks 2015). Ce

point est particulièrement important lors du développement d'études centrées sur l'appareil respiratoire, du fait de la capacité de filtration de la cavité nasale. En effet, cette dernière se compose d'un épithélium recouvert de mucus en charge de l'humidification de l'air mais aussi de la capture de tout corps étranger. La composition du mucus, l'activité enzymatique et la présence de cellules ciliées ont pour but d'inactiver et de transporter des substances exogènes jusqu'au carrefour aéro-digestif et, *in fine*, dans l'estomac où l'environnement physico-chimique se chargera de la destruction de ces substances exogènes (**Marieb et Keller 2017**).

Hormis cette décomposition anatomique et régionale des voies aériennes, une catégorisation fonctionnelle peut être mise en place entre des zones de conduction et des zones de ventilation. Les zones de conduction représentent toutes les structures anatomiques permettant de convoier l'air de l'environnement jusqu'aux zones de ventilation. Ainsi, la totalité des VAS et les VAI, jusqu'aux bronchioles terminales, appartiennent à ces zones conductrices (Figure 2).

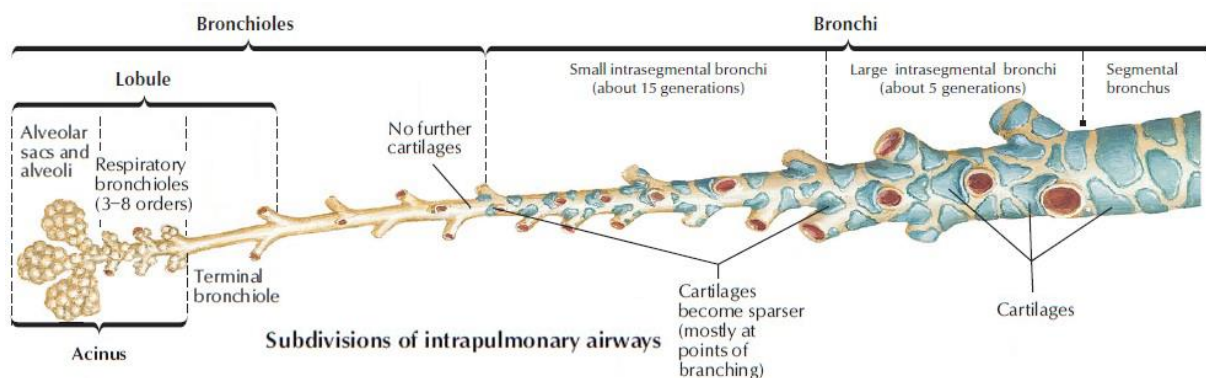


Figure 2 - Représentation schématique des subdivisions de l'arbre trachéo-bronchique, modifié d'après (Netter 2014).

Ces zones de conduction se composent, donc, de structures relativement rigides composées de cartilages et de tissus fibreux plus ou moins élastiques. Parmi ces structures, on retrouve en premier lieu la trachée, composée de sections cartilagineuses en forme d'arc de cercle sur le versant antérieur, tandis que le versant postérieur est composé de tissus élastiques en regard de l'œsophage. Au centre du thorax, dans le médiastin, la trachée donne naissance aux bronches souches droite et gauche en formant la carène (Figure 3). Les bronches se segmentent, ensuite, en différentes générations de section toujours décroissante. Au cours de cette segmentation, on observe une transformation des voies aériennes avec une diminution de la quantité de cartilage et une augmentation de la quantité de structures musculaires lisses. Au niveau des bronches terminales, il n'y a plus de cartilage (**Marieb et Keller 2017**) (Figure 2).

Après les bronches terminales se trouvent les zones de ventilation, qui sont en charge des échanges gazeux entre le sang et l'air inspiré. Elles sont composées des bronchioles

respiratoires et d'une multitude d'acinus, qui est l'unité fonctionnelle de l'appareil respiratoire (**Netter 2014; Marieb et Hoehn 2016; Marieb et Keller 2017**). Un acinus se compose de bronchioles respiratoires et d'une multitude d'alvéoles pulmonaires groupées en sacs alvéolaires (**Netter 2014; Marieb et Keller 2017**) (Figure 4). C'est au niveau des alvéoles que les échanges gazeux entre l'air inspiré et le sang sont mis en place. De forme relativement sphérique et d'un diamètre d'un tiers de millimètres, les alvéoles permettent une augmentation de la surface d'échange jusqu'à des valeurs comprises entre 50 et 100 m², en fonction de la taille de l'individu (**West et Luks 2015; Marieb et Keller 2017**). Pour maximiser les échanges gazeux, le lit vasculaire pulmonaire débute au niveau des artères pulmonaires qui se décomposent en une myriade de capillaires qui viennent englober les alvéoles. Ces plexus capillaires se regroupent, ensuite, pour former les veines pulmonaires qui s'abouchent dans le cœur gauche (**Netter 2014; Marieb et Keller 2017**) (Figure 6).

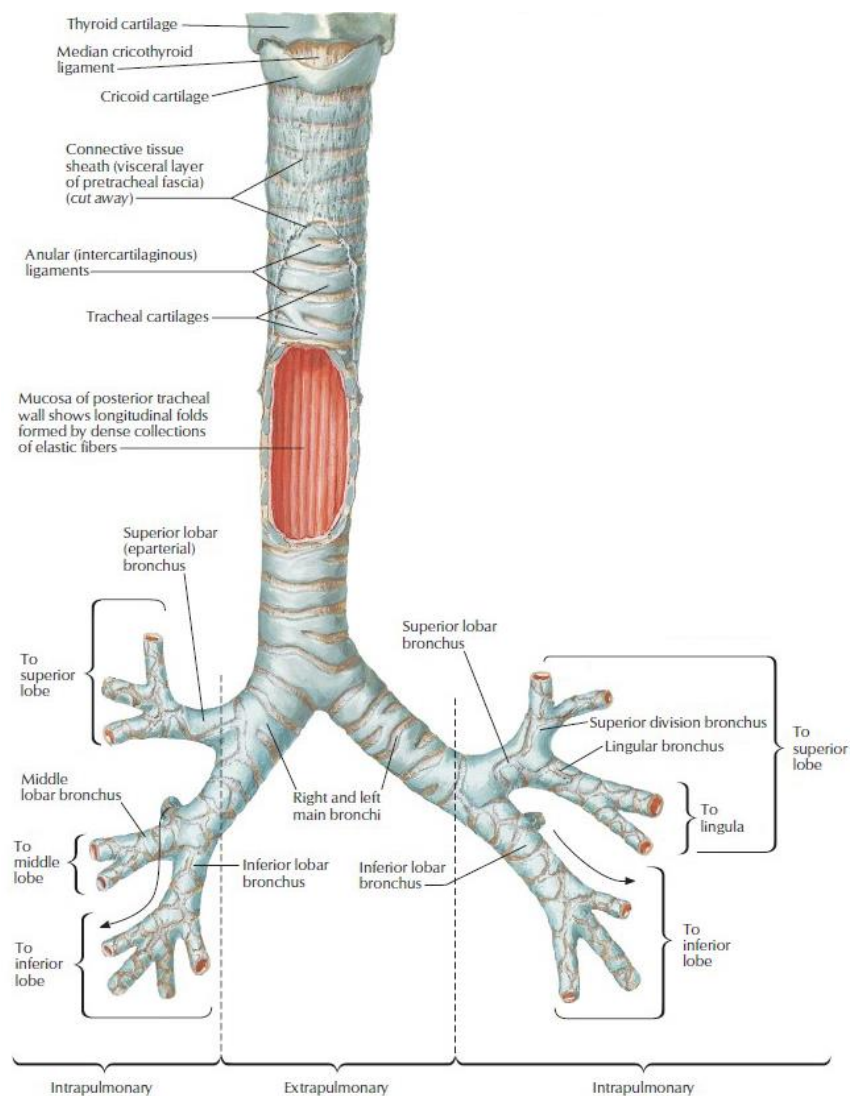


Figure 3 - Représentation schématique de l'arbre trachéo-bronchique humain, modifié d'après (Netter 2014).

Les zones de conduction, comme leur nom l'indique, n'interviennent pas dans les échanges gazeux, du fait de leur structure cartilagineuse et de l'absence d'alvéole pulmonaire. De fait, elles représentent un espace mort anatomique du tractus respiratoire, d'un volume d'environ 150 mL au repos (**West et Luks 2015; Marieb et Keller 2017; Intagliata et al. 2019**). En prenant comme référence un modèle idéalisé de l'arbre trachéo-bronchique de Weibel, les zones conductrices s'étendent de la trachée à la 16^e génération des voies aériennes, avant de donner naissance aux bronchioles terminales. Au cours de ces bifurcations, la surface des voies aériennes conductrices reste relativement constante. Dès lors que l'on passe la 16^e génération, et que l'on atteint les zones d'échange gazeux, la surface disponible augmente de manière exponentielle jusqu'aux alvéoles (Figure 5). Cette augmentation rapide de la surface d'échange disponible a pour effet de diminuer le débit des gaz inspiré, afin qu'au niveau alvéolaire la diffusion soit le mode majoritaire de ventilation (**West et Luks 2015**).

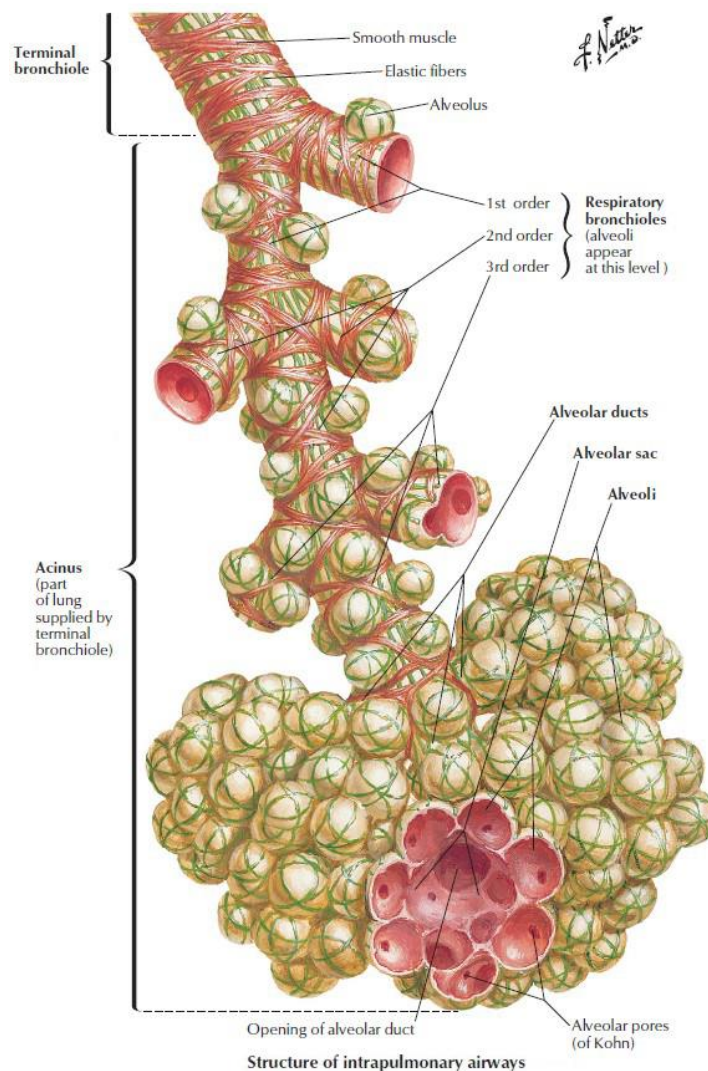


Figure 4 - Représentation schématique de l'anatomie structurelle d'un acinus, d'après (Netter 2014).

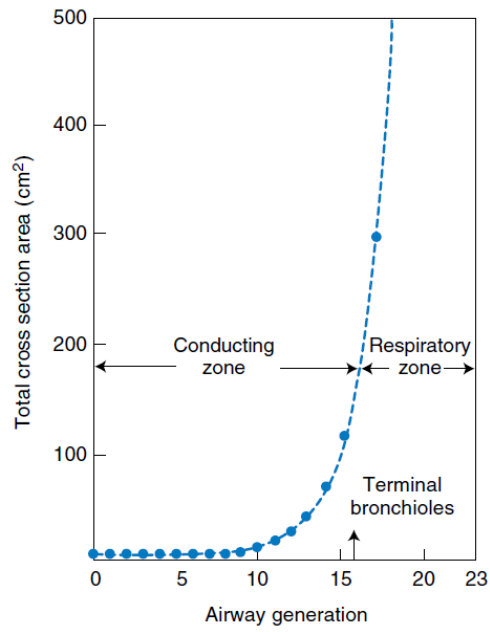


Figure 5 - Diagramme de la surface pulmonaire disponible en fonction de la génération des voies aériennes, d'après (West et Luks 2015).

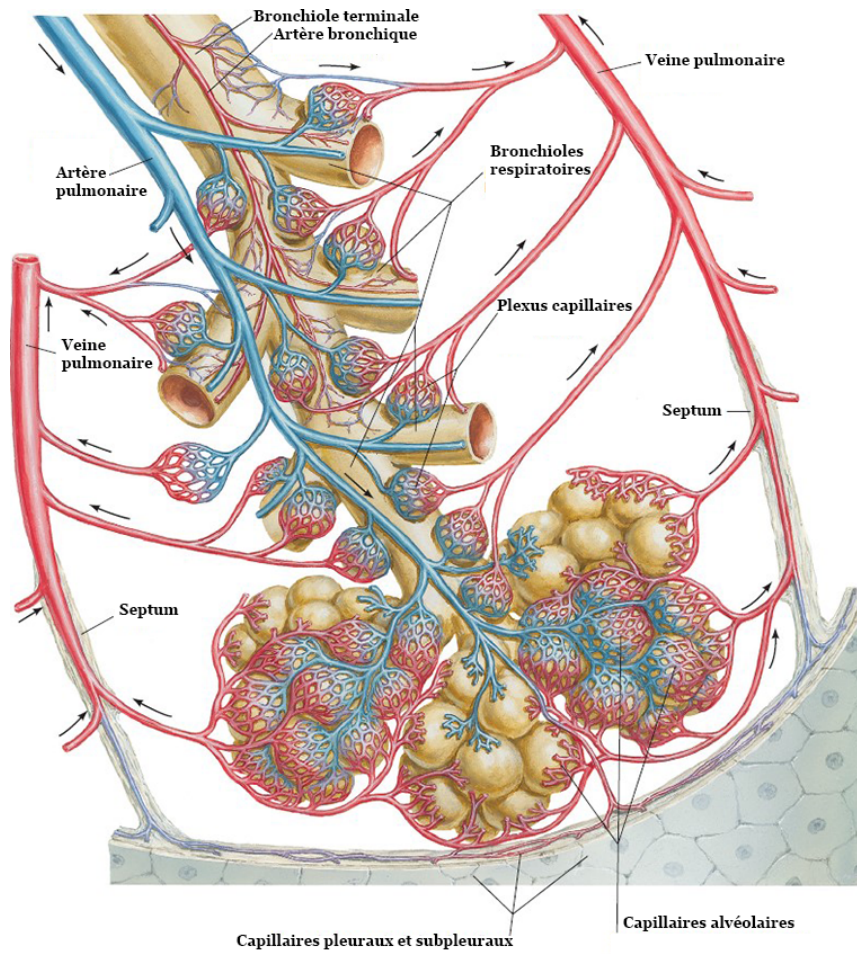


Figure 6 - Représentation schématique de la vascularisation des alvéoles pulmonaires, d'après (Netter 2014).

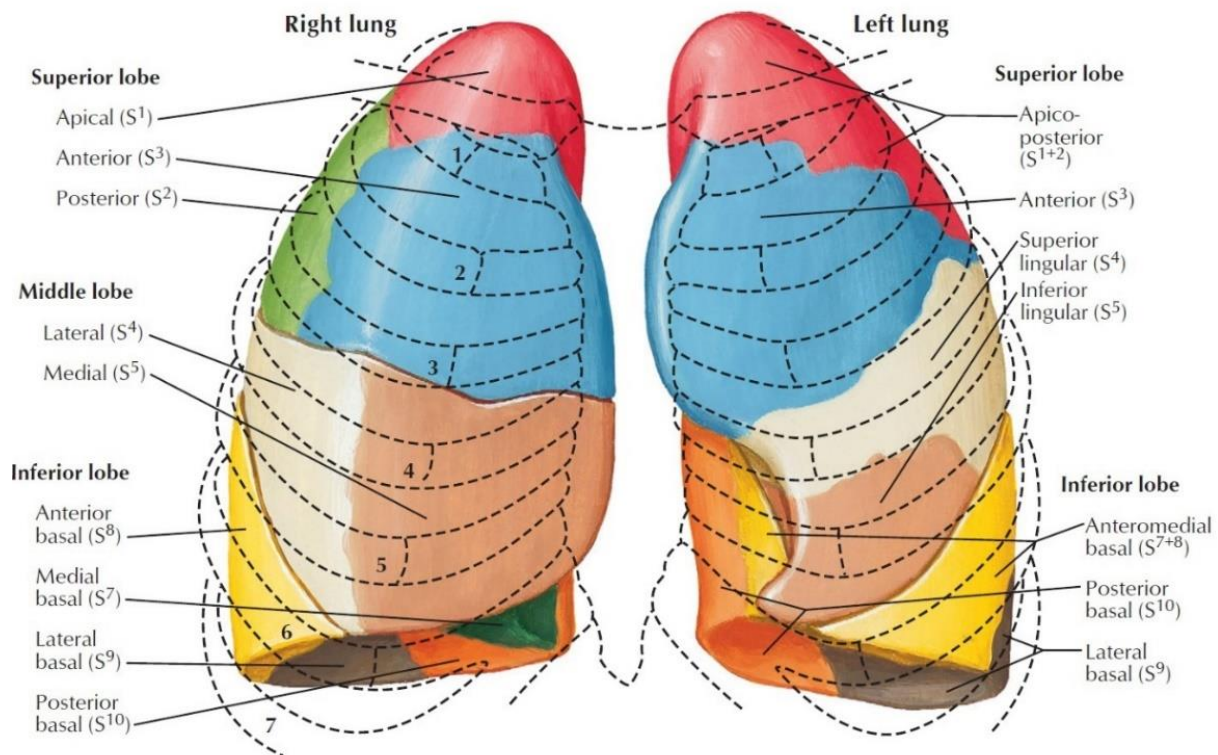


Figure 7 - Représentation schématique de la segmentation pulmonaire en vue antérieure, d'après (Netter 2014).

Chez l'être humain, les poumons se composent de 5 lobes : 3 lobes dans le poumon droit (supérieur, moyen et inférieur) et 2 lobes (inférieur et supérieur) dans le poumon gauche du fait de l'encombrement généré par les structures cardiaques (Figure 7). Chaque lobe présente une segmentation propre définie par l'orientation des bronches segmentaires naissant des bronches souches gauches et droites (Figure 7).

In fine, l'appareil respiratoire est conçu pour optimiser les échanges gazeux entre le sang et l'air inspiré, qui ont lieu au cœur des poumons, dans les alvéoles pulmonaires par le biais de la barrière alvéolo-capillaire.

2. Physiologie

L'air inspiré termine son voyage dans les alvéoles pulmonaires mais il est conditionné, dès son entrée dans le tractus respiratoire, par les VAS. Si on prend l'exemple d'un être humain adulte, lors de l'inspiration au repos, l'air entre dans l'organisme par les fosses nasales. L'anatomie de cette région permet la création d'un flux d'air turbulent qui induit un brassage de l'air. En effet, les fosses nasales se composent de 3 cornets (inférieur, moyen et supérieur) qui augmentent la surface de contact avec la muqueuse nasale (Figure 8). L'augmentation de la surface de contact est nécessaire pour la mise en place de la triple fonction de la cavité nasale : le réchauffement, l'humidification et la filtration de l'air inspiré (**Harkema 2015; Marieb et Keller 2017**).

Cela est permis par la composition de la muqueuse respiratoire, un épithélium pseudo-stratifié, prismatique, et par une très forte vascularisation. Un autre élément clé est la présence d'un mucus épais et aqueux sécrété par des cellules caliciformes, qui humidifie l'air et piège les corps étrangers s'y déposant (ainsi que les gaz et vapeurs hydrophiles) **(Harkema 2015; Nadel 2016; Marieb et Keller 2017)** (Figure 9). En atteignant la trachée, l'air est réchauffé autour de 33 à 35°C et son humidité relative est supérieure à 95%. En outre, il est aussi filtré des plus grosses particules qu'il convoyait. Ces dernières sont transférées jusqu'à l'œsophage par l'ascenseur muco-ciliaire, puis par la déglutition **(Marieb et Keller 2017)**.

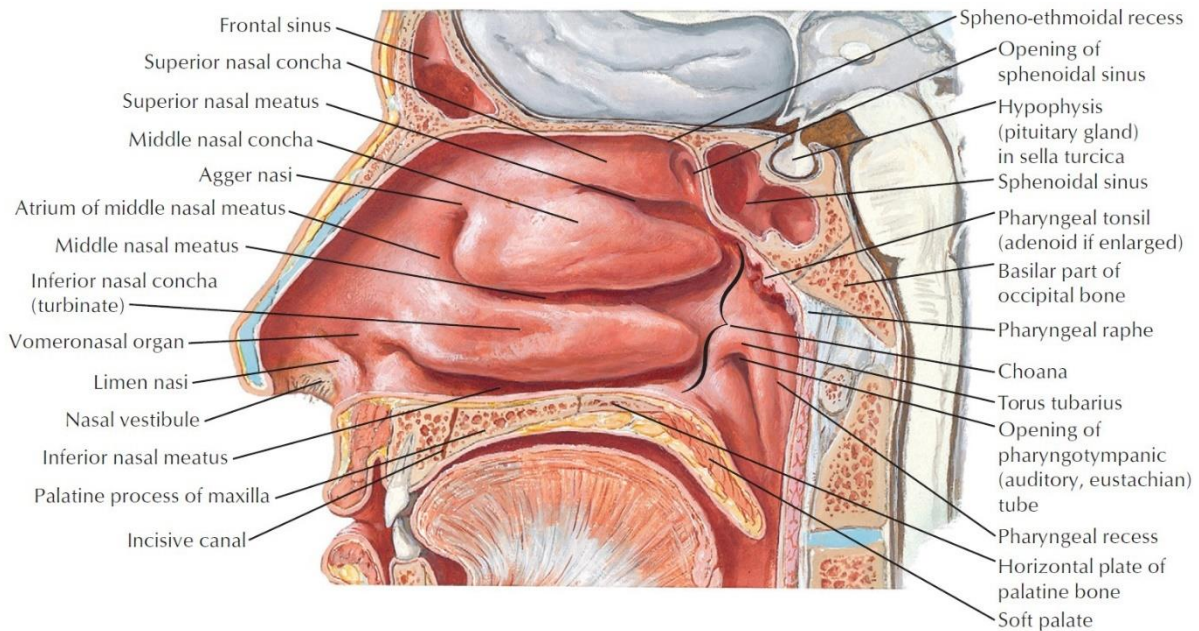


Figure 8 - Représentation schématique des fosses nasales, d'après (Netter 2014).

La muqueuse respiratoire, qui débute dans les cavités nasales et s'étend jusqu'à la fin des zones de conduction, est pratiquement inchangée dans les différentes structures de l'appareil respiratoire (Figure 9) **(Marieb et Hoehn 2016)**.

Des modifications de l'épithélium apparaissent au niveau des bronchioles, où il perd son aspect prismatique et devient cubique, avec une disparition des cellules basales. La présence de cellules ciliées persiste jusqu'aux bronchioles respiratoires. Par la présence de cette structure histologique jusque dans les parties les plus périphériques, l'organisme est à même d'éliminer des particules qui se seraient déposées profondément dans les poumons. Toutefois, il est important de noter que leur quantité relative est plus importante dans les structures centrales que dans les structures périphériques **(Kaminsky 2011; Marieb et Hoehn 2016; O'Riordan et Smaldone 2016)**. A l'inverse des cellules ciliées et caliciformes, la proportion en cellules musculaires lisses s'accroît vers la périphérie **(Marieb et Hoehn 2016)**.

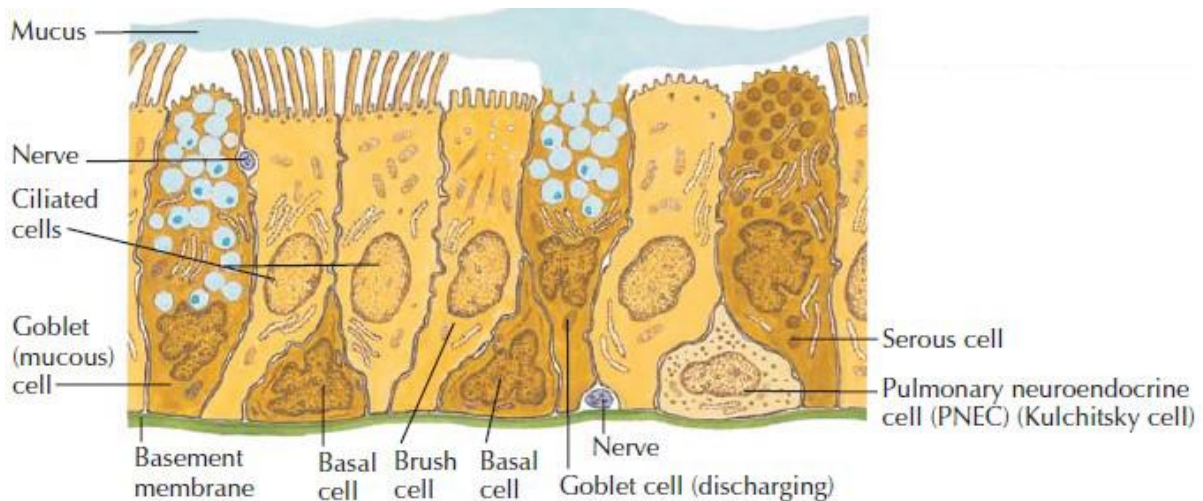


Figure 9 - Représentation schématique de l'épithélium respiratoire au niveau trachéal, d'après (Kaminsky 2011).

Dans les zones de ventilation, représentées par quelques 300 à 500 millions d'alvéoles, les structures histologiques forment la barrière alvéolo-capillaire (Figure 10). Les alvéoles sont composées, structurellement, de cellules de type I, auxquelles s'adjoignent des cellules de type II en charge de la sécrétion de surfactant (Kaminsky 2011; Marieb et Hoehn 2016). Ce dernier est un mélange de phospholipides et de protéines, qui tapisse la paroi des alvéoles (

Tableau 1). Il réduit la tension de surface alvéolaire et permet, ainsi, de réduire le travail respiratoire nécessaire tout en évitant le collapsus des alvéoles (Mason et Dobbs 2016; Alcorn 2017; Koval et Sidhaye 2017).

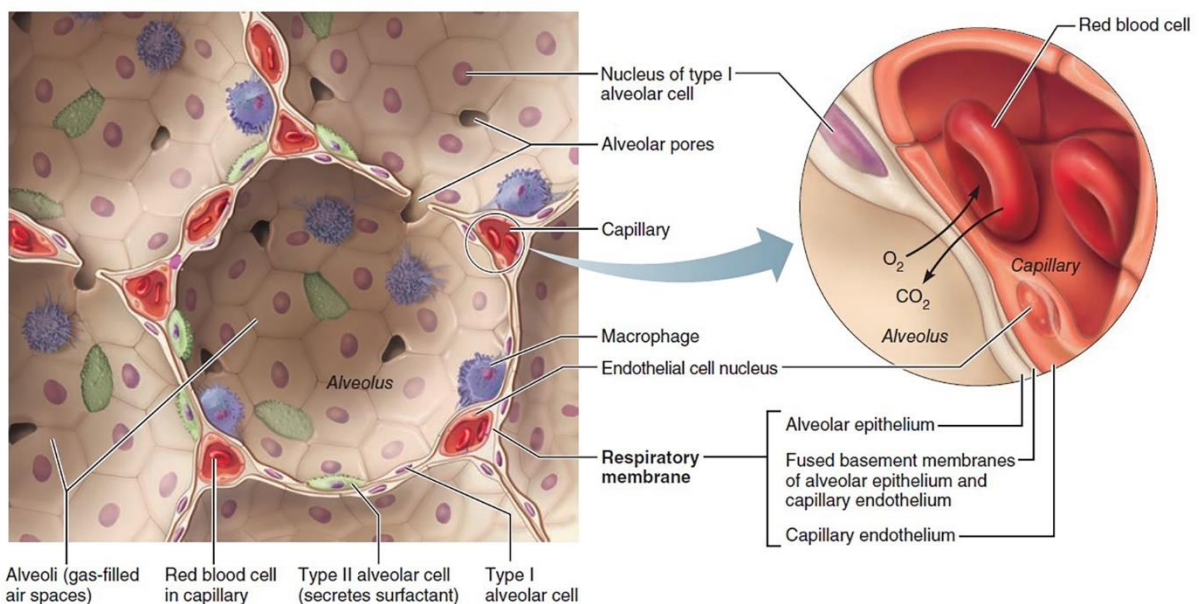


Figure 10 - Illustration d'une alvéole et de la barrière alvéolo-capillaire, d'après (Marieb et Hoehn 2016).

Au sein des alvéoles, on trouve aussi des macrophages alvéolaires, qui sont en charge de l'élimination des déchets (Figure 10). Epaisse de quelques centaines de nanomètres, la barrière alvéolo-capillaire permet la libre diffusion des gaz d'un compartiment à l'autre suivant la loi de Fick. La diffusion est facilitée par le nombre et le diamètre des capillaires, qui ne permet le passage que d'un globule rouge après l'autre en regard de l'alvéole (**Kaminsky 2011; Marieb et Hoehn 2016**). L'équilibre des pressions au sein des alvéoles est permis par l'existence de pores inter-alvéolaires, qui peuvent aussi être des routes alternatives en cas de collapsus bronchiques (**Marieb et Hoehn 2016**).

Tableau 1 - Composition du surfactant humain, d'après (Mason et Dobbs 2016; Alcorn 2017).

Composant		Proportion dans le surfactant	
Phospholipides	Phosphatidylcholine (sous forme saturée et non saturée)	64,85%	85%
	Phosphatidylglycérol	9,85%	
	Phosphatidylinositol	3,32%	
	Phosphatidyléthanolamine	2,81%	
	Sphingomyéline	1,28%	
	Autres	2,89%	
Lipides neutres (cholestérol et acides gras)		5%	
Protéines	SP-A	++++	10% Composition exacte inconnue, composition relative en masse
	SP-B	+	
	SP-C	+	
	SP-D	++	
	Autres		

In fine, la respiration repose sur un couplage entre perfusion et ventilation, qui permet un échange quasi-instantané entre les gaz inspirés et les gaz sanguins (**Kaminsky 2011; West et Luks 2015; Marieb et Hoehn 2016**) (Figure 11). Toutefois, les échanges gazeux sont subordonnés à la mécanique ventilatoire, qui permet la mobilisation de l'air et, donc, la réalisation des cycles respiratoires.

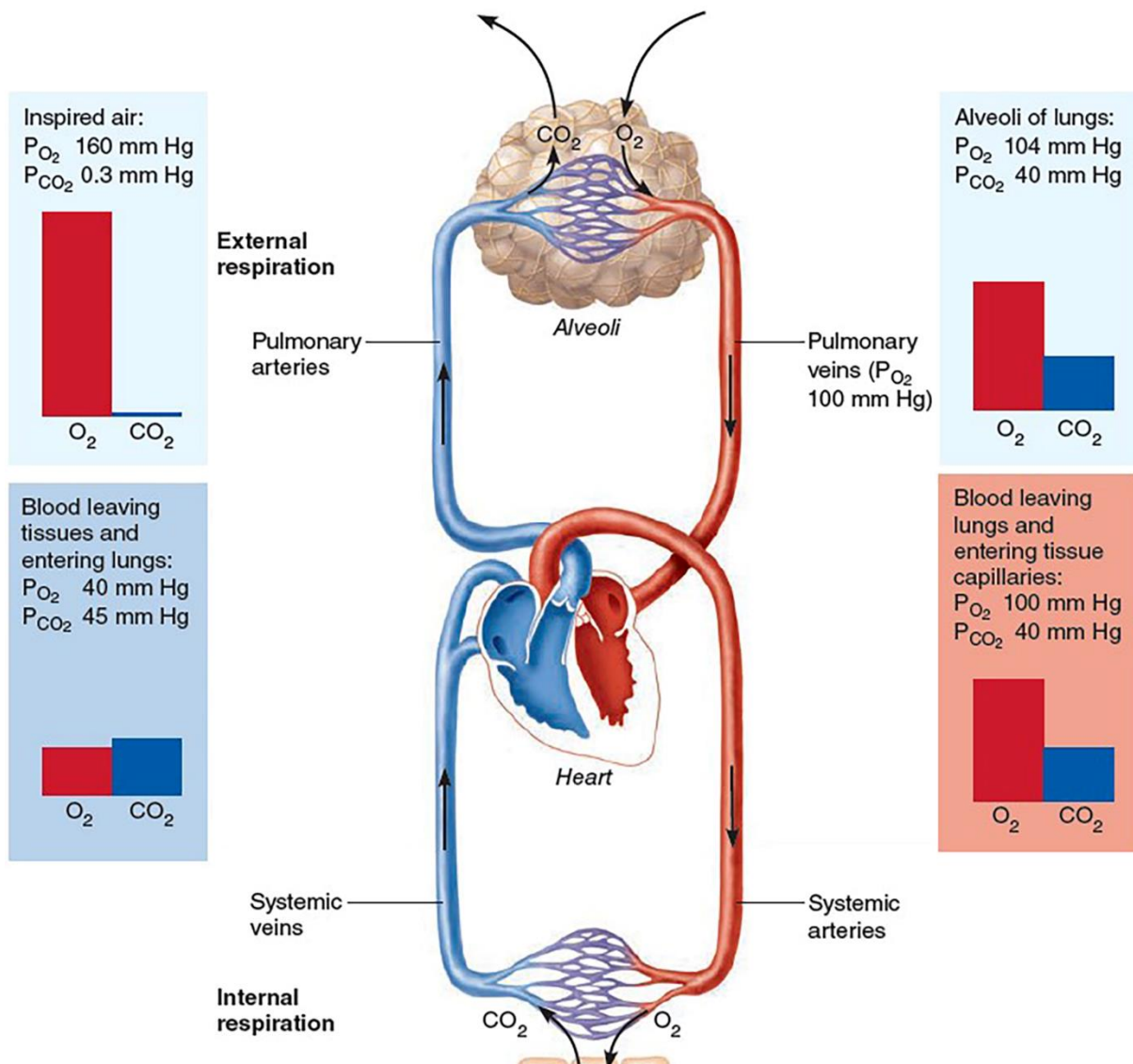


Figure 11 - Représentation des échanges gazeux au niveau de la paroi alvéolo-capillaires, d'après (Marieb et Hoehn 2016). P_{O_2} : pression partielle en dioxygène. P_{CO_2} : pression partielle en dioxyde de carbone.

3. Mécanique respiratoire

La respiration pulmonaire, pour permettre les échanges gazeux entre l'air inspiré et le sang, nécessite la mobilisation de gaz de l'environnement jusqu'aux zones alvéolaires. La mise en

mouvement de ces volumes est permise par la contraction et la relaxation des muscles respiratoires, qui sont subdivisés en muscles inspiratoires et expiratoires. Il est important de noter qu'il existe des muscles principaux qui sont utilisés de manière constante et des muscles accessoires qui ont pour rôle de fournir un effort respiratoire supplémentaire dans des cas particuliers tels que l'exercice physique ou la détresse respiratoire aiguë (**Kaminsky 2011; Marieb et Hoehn 2016**) (Figure 12).

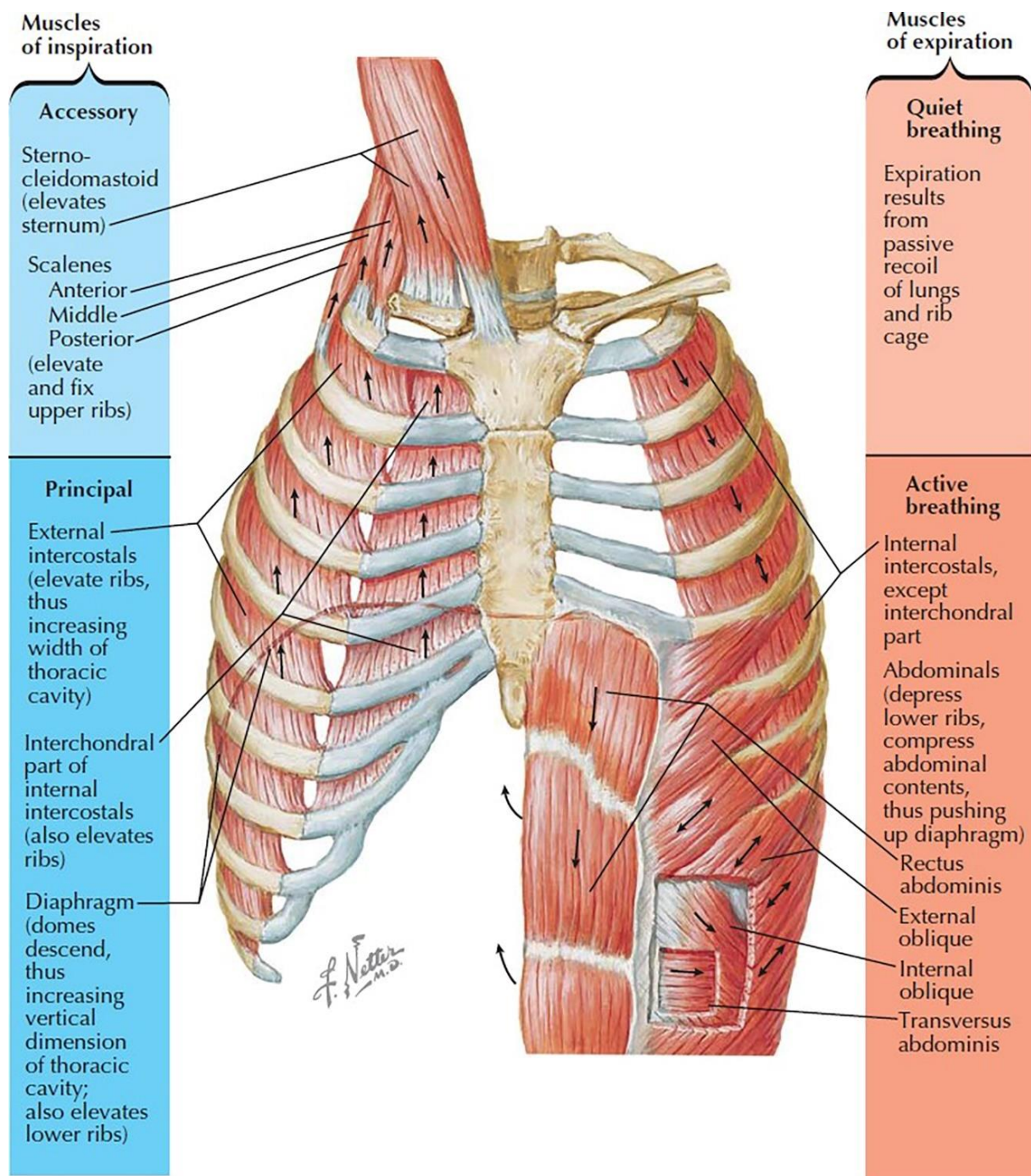


Figure 12 - Représentation schématique des muscles inspiratoires et expiratoires, d'après (Kaminsky 2011).

Ainsi, la respiration est une séquence régulière et adaptable aux besoins physiologiques, particulièrement à la PaCO₂ et la PaO₂. Cette adaptation de la respiration se fait d'un cycle respiratoire à l'autre, afin de permettre une oxygénation optimale des différents tissus de l'organisme (Hazari et Farraj 2015).

Un cycle respiratoire se compose d'une inspiration et d'une expiration. Ces deux actions, proprement antagonistes, sont réalisées par une séquence de contraction et de relaxation selon un schéma souffrant de peu de modifications d'un cycle à l'autre (Kaminsky 2011; Marieb et Hoehn 2016) (Figure 13).

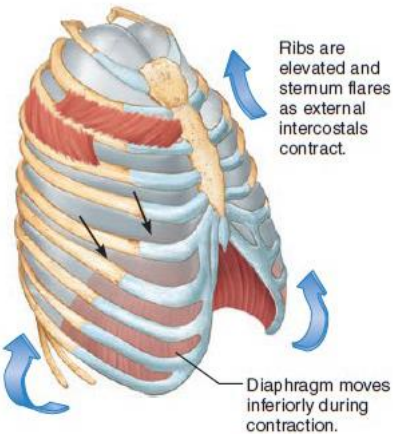
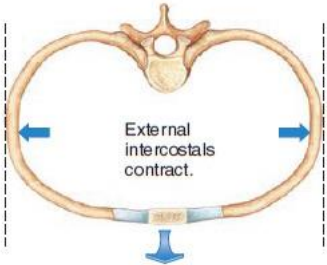
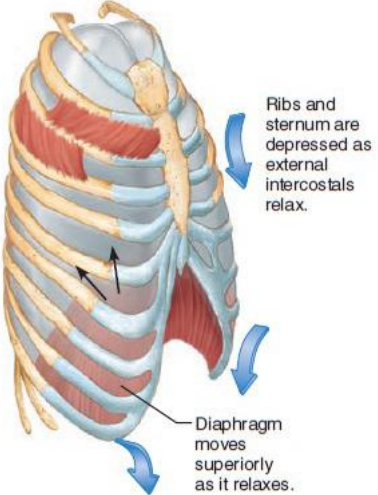
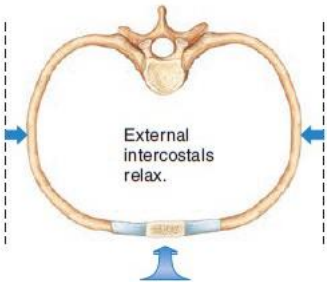
	Sequence of events	Changes in anterior-posterior and superior-inferior dimensions	Changes in lateral dimensions (superior view)
Inspiration	<ol style="list-style-type: none"> ① Inspiratory muscles contract (diaphragm descends; rib cage rises). ↓ ② Thoracic cavity volume increases. ↓ ③ Lungs are stretched; intrapulmonary volume increases. ↓ ④ Intrapulmonary pressure drops (to -1 mm Hg). ↓ ⑤ Air (gases) flows into lungs down its pressure gradient until intrapulmonary pressure is 0 (equal to atmospheric pressure). 	 <p>Ribs are elevated and sternum flares as external intercostals contract.</p> <p>Diaphragm moves inferiorly during contraction.</p>	 <p>External intercostals contract.</p>
Expiration	<ol style="list-style-type: none"> ① Inspiratory muscles relax (diaphragm rises; rib cage descends due to recoil of costal cartilages). ↓ ② Thoracic cavity volume decreases. ↓ ③ Elastic lungs recoil passively; intrapulmonary volume decreases. ↓ ④ Intrapulmonary pressure rises (to +1 mm Hg). ↓ ⑤ Air (gases) flows out of lungs down its pressure gradient until intrapulmonary pressure is 0. 	 <p>Ribs and sternum are depressed as external intercostals relax.</p> <p>Diaphragm moves superiorly as it relaxes.</p>	 <p>External intercostals relax.</p>

Figure 13 - Représentation schématique des modifications anatomiques lors d'un cycle respiratoire, d'après (Marieb et Hoehn 2016).

Le cycle respiratoire débute par une inspiration, c'est-à-dire par la contraction des muscles inspiratoires. La voûte diaphragmatique se mobilise vers l'abdomen, tandis que la cage

thoracique s'élève. De fait, le volume thoracique s'accroît et, donc, celui des poumons augmente aussi, car ces derniers y sont reliés par la plèvre. Cette augmentation de volume induit une diminution de la pression intrapulmonaire, qui n'est plus égale à la pression atmosphérique. L'air est, ainsi, inspiré au niveau naso-buccal jusqu'à l'équilibration des pressions. L'expiration se met alors en place. Les muscles inspiratoires se relâchent, ce qui réduit le volume de la cage thoracique. Les propriétés élastiques du poumon permettent une reprise passive de sa forme initiale. Ce faisant, le volume pulmonaire diminue et la pression y augmente, devenant supérieure à la pression atmosphérique. L'air est, ainsi, expiré jusqu'à équilibration des pressions. Ensuite, un nouveau cycle se déclenche (**Kaminsky 2011; West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016; Powell et al. 2016**) (Figure 13).

La ventilation, au repos, est qualifiée de « passive », car elle repose sur l'équilibration de la pression intrapulmonaire avec la pression atmosphérique. Bien que la phase inspiratoire du cycle nécessite un travail musculaire, l'expiration est complètement passive. Chez l'adulte sain, au repos, on observe en moyenne 15 cycles respiratoires par minute, qui mobilisent à chaque cycle un volume courant (VC) d'approximativement 500 mL. Ce qui génère une ventilation-minute (VM) de 7,5 L/min d'air. En considérant le volume mort anatomique des zones de conduction, on observe un VC alvéolaire de 350 mL, correspondant à une ventilation alvéolaire de 5,25 L/min. Cette ventilation alvéolaire se compose d'un mélange de gaz « frais » inspirés et de gaz résiduels des cycles respiratoires précédents. Ainsi, ces gaz alvéolaires frais représentent un volume approximatif de 3L. (**Kaminsky 2011; West et Luks 2015; Marieb et Hoehn 2016**) (Figure 15). Il est important de noter que ces volumes sont théoriques, calculés à partir d'abaques et de tables de conversion. Ainsi, de grandes variations interindividuelles sont observables.

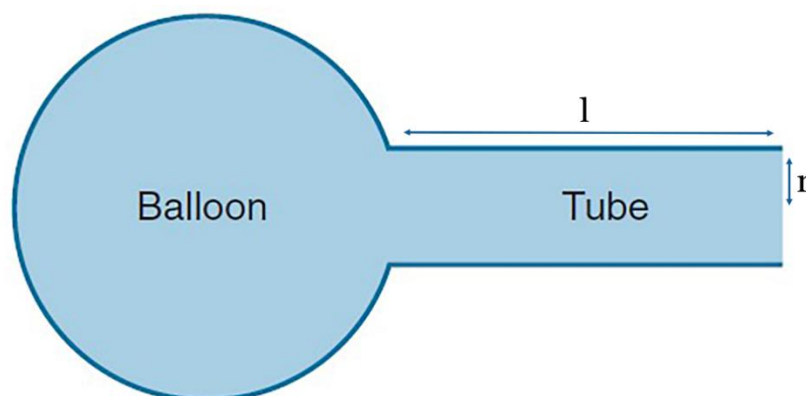


Figure 14 - Représentation du modèle pulmonaire mono-alvéolaire, d'après (Henderson et al. 2016). P_{TM} : pression transmembranaire. l : longueur du tube (représentant les voies aériennes de conduction). r : rayon interne du tube.

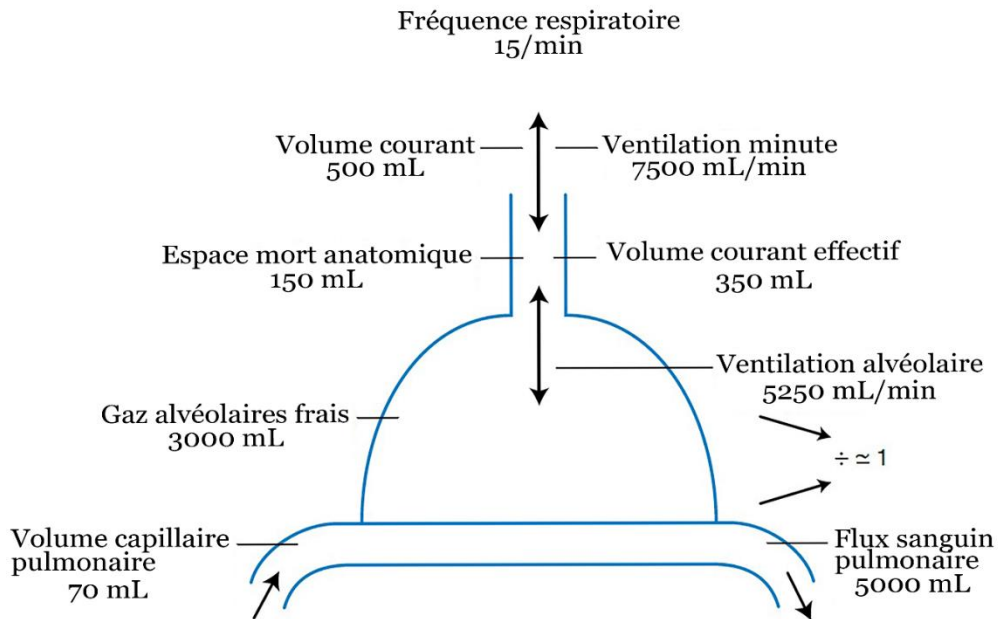


Figure 15 - Schéma des volumes et débit pulmonaires, modifié d'après (West et Luks 2015).

La mécanique respiratoire s'intéresse à tous les phénomènes physiques et biologiques permettant le transport de l'air inspiré des cavités buccale et nasale jusqu'aux alvéoles pulmonaires et le transport de l'air expiré selon le trajet inverse. Le modèle communément admis pour décrire et étudier ces phénomènes est un modèle linéaire mono-alvéolaire. Les gaz s'y écoulent dans un tube dont la résistance est assimilée à la résistance (R) générées par les voies aériennes de conduction, tandis que les poumons sont assimilés à une alvéole élastique dont l'élastance (E), c'est-à-dire la capacité à reprendre sa forme initiale après une déformation, est l'inverse de la compliance thoraco-pulmonaire (C) (West et Luks 2015; Henderson et al. 2016).

$$\Delta P_{TM} = \frac{\Delta V}{C}$$

Équation 1 - Détermination de la pression transmembranaire dans le modèle mono-alvéolaire, d'après (Henderson et al. 2016). ΔP_{TM} : variation de la pression transmembranaire. ΔV : variation de volume lors d'un cycle respiratoire. C : compliance thoraco-pulmonaire.

$$\Delta P_{tube} = Q_V \times R$$

Équation 2 - Détermination de la différence de pression de part des autres zones de conduction dans le modèle mono-alvéolaire, d'après (Henderson et al. 2016). Q_V : débit inspiratoire correspondant au volume d'air inspiré rapporté au temps inspiratoire. ΔP_{tube} : variation de pression entre l'orifice proximal et l'orifice distal du tube modélisant les zones de conduction des voies aériennes. R : résistances du tube modélisant les zones de conduction des voies aériennes.

Le modèle pulmonaire mono-alvéolaire a permis d'expliciter que la pression transmembranaire (PTM) s'explique par le rapport d'une variation de volume sur la compliance pulmonaire, qui correspond à la résistance du poumon à la déformation (Équation 1 et

Figure 14). En modifiant l'Équation 1, on comprend aisément que la variation du volume pulmonaire est subordonnée à la différence de pression appliquée par les muscles inspiratoires et à la compliance du poumon, cette dernière étant relativement constante chez l'individu sain. Ainsi, le seul travail musculaire est en charge de la ventilation. Toutefois, lors de l'inspiration, la variation de pression induite ne génère pas un volume mais un débit inspiratoire. Ce débit est sous la contrainte des résistances des voies aériennes et de la différence de pression de part et d'autre des zones de conduction (Henderson et al. 2016) (Équation 2).

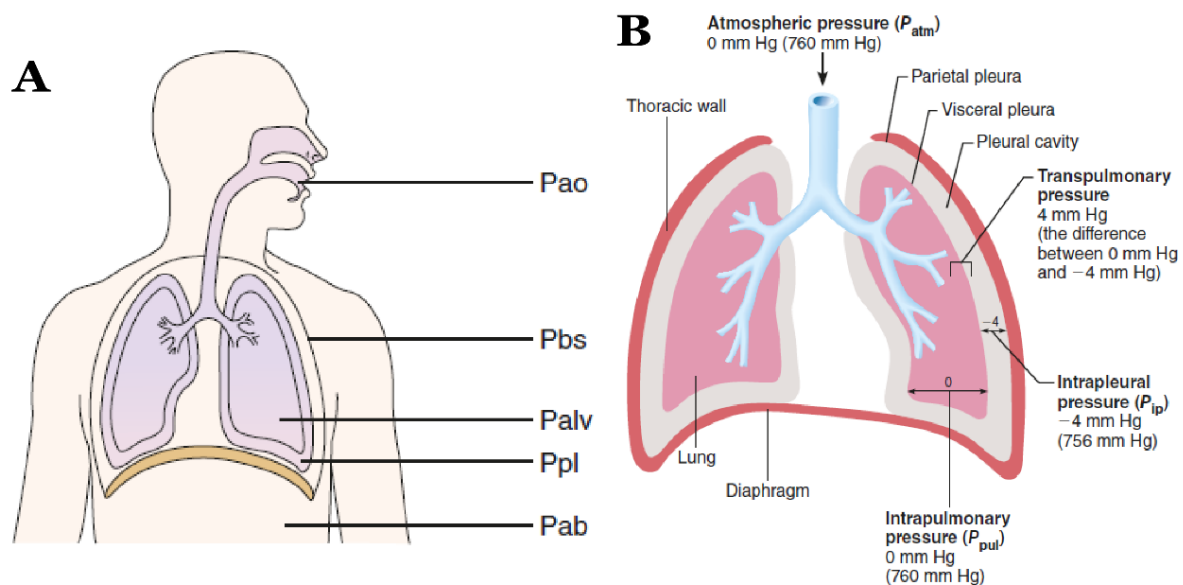


Figure 16 - Représentation schématique de la localisation des différentes pressions impliquées dans le fonctionnement de l'appareil respiratoire, modifié d'après (Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016). A : localisation des différentes pressions appliquées sur l'appareil respiratoire. P_{ao} : pression au niveau des cavités buccale et/ou nasales. P_{bs} : pression à la surface du corps. P_{alv} : pression alvéolaire. P_{pl} : pression pleurale. P_{ab} : pression abdominale. B : représentation des différentes pressions appliquées directement sur les poumons.

Chez l'individu sain au repos, la pression au niveau des cavités buccale et nasales (P_{ao}) est égale à la pression atmosphérique (P_{atm}), de même que la pression à la surface du corps (P_{bs}). Il en va de même pour la pression alvéolaire (P_{alv}) en fin d'inspiration et d'expiration. La pression pleurale est strictement inférieure à la P_{atm} , ce qui permet d'éviter les collapsus respiratoires par le maintien d'une pression transpulmonaire (P_{tp}) positive (Figure 17). La pression abdominale (P_{ab}) évolue de manière inversement proportionnelle à la P_{tp} (West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016).

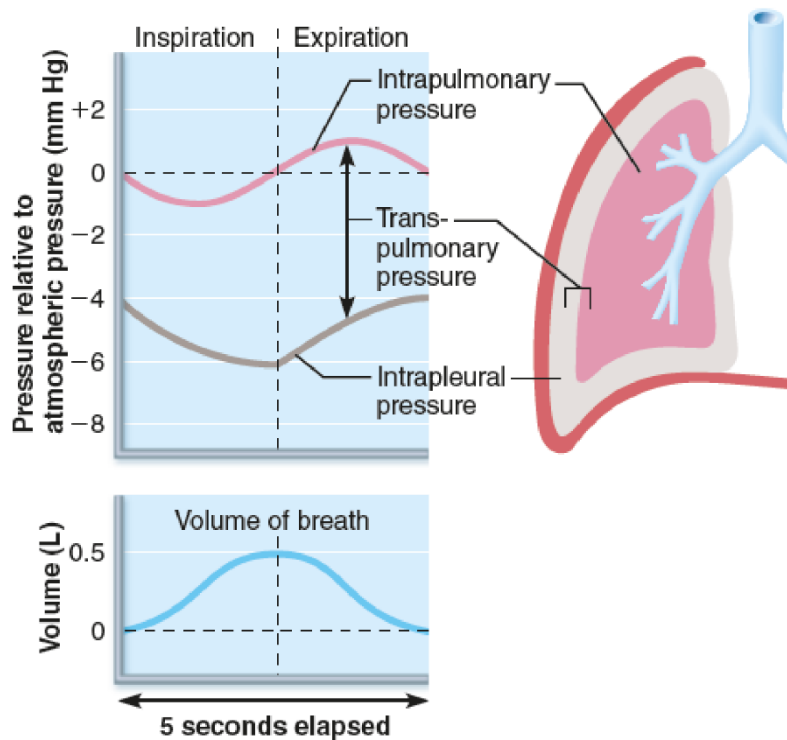


Figure 17 - Évolution des pressions intrapulmonaire/alvéolaire et de la pression pleurale au cours de la respiration, d'après (Henderson et al. 2016).

Ainsi, pour permettre l'entrée d'un volume donné dans le système, les muscles inspiratoires doivent être à même de générer une différence de pression suffisante pour outrepasser la compliance du poumon mais aussi les résistances générées par les zones de conduction. De fait, la respiration pulmonaire est subordonnée à la génération et au contrôle d'un débit ventilatoire, représenté par la ventilation-minute (VM). **(West et Luks 2015)**. Elle est calculée par l'équation suivante :

$$VM = VT \times FR$$

Équation 3 - Détermination de la ventilation-minute, d'après (West et Luks 2015). VM : ventilation-minute. VC : volume courant. FR : fréquence respiratoire.

La VM conditionne fortement certains volumes respiratoires mais reste sans effet sur d'autres. En effet, les poumons sont des organes dynamiques et élastiques qui disposent d'une réserve fonctionnelle relativement importante, qui permet de maintenir une oxygénation suffisante lorsque certaines régions pulmonaires sont lésées **(West et Luks 2017)**.

Les volumes et capacités pulmonaires peuvent être étudiés par spirométrie pour certains, tandis que d'autres nécessitent le recours à une pléthysmographie. La spirométrie consiste en l'étude « simple » de certains volumes et capacités respiratoires, qui sont mesurés en demandant au patient de réaliser certains exercices respiratoires. La pléthysmographie est une

spirométrie au cours de laquelle le patient est assis dans une cabine étanche, où les variations de pressions générées par la respiration du patient sont enregistrées, permettant la détermination de tous les volumes et capacités pulmonaires. Les différents volumes et capacités respiratoires sont illustrés dans la Figure 18 et définis dans le Tableau 2 (**West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016**).

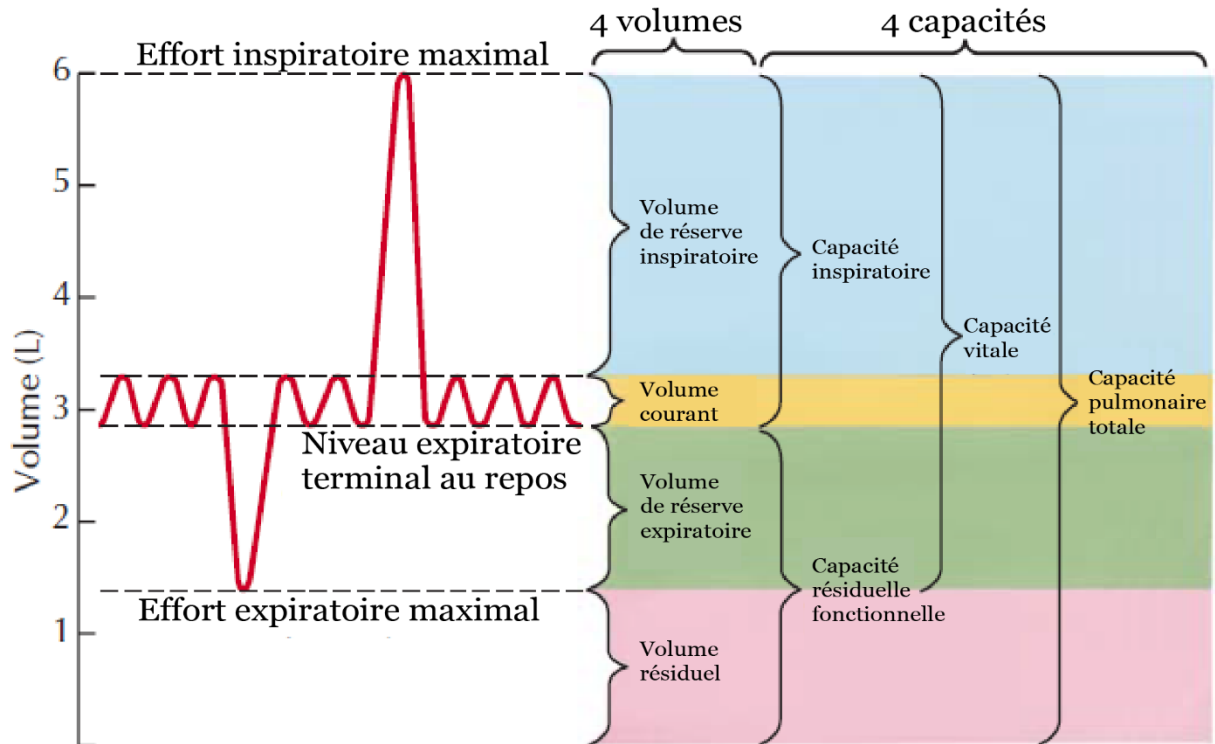


Figure 18 - Volumes et capacités pulmonaires, modifié d'après (Kaminsky 2011).

Tableau 2 - Définition des volumes et capacités pulmonaires, d'après (Marieb et Hoehn 2016). Les valeurs moyennes sont données selon les abaques correspondants à un adulte sain de 75 kg de poids corporel.

		Valeurs moyennes (mL)	Définition	Équation
Volumes	Volume courant (VC)	500	Quantité d'air inhalé ou exhalé à chaque cycle respiratoire au repos	N/A
	Volume de réserve inspiratoire (VRI)	3100	Quantité d'air inspiré de manière forcée après une inspiration normale	
	Volume de réserve expiratoire (VRE)	1200	Quantité d'air expiré de manière forcée après une expiration normale	
	Volume résiduel (VR)	1200	Quantité d'air restante après une expiration forcée	
Capacités	Capacité pulmonaire totale (CPT)	6000	Quantité maximale d'air contenu dans les poumons après un effort inspiratoire maximal	$CPT = VC + VRI + VRE + VR$
	Capacité vitale (CV)	4800	Quantité maximale d'air pouvant être expirée avec un effort inspiratoire maximal	$CV = VC + VRI + VRE$
	Capacité inspiratoire (CI)	3600	Quantité maximale d'air inspirable après une inspiration normale	$CI = VC + VRI$
	Capacité fonctionnelle résiduelle (CFR)	2400	Volume d'air restant dans les poumons après une expiration normale	$CFR = VRE + VR$

Les volumes et capacités pulmonaires définis ci-dessus sont, comme précédemment explicité, dépendant de l'effort inspiratoire réalisé mais aussi de la compliance thoraco-pulmonaire et des résistances des zones de conduction des voies aériennes. La compliance thoraco-pulmonaire est définie comme étant le volume d'air, entrant dans le modèle pulmonaire mono-alvéolaire, nécessaire pour augmenter la pression transmembranaire d'une unité de pression. Chez l'adulte sain, la compliance est comprise entre 150 et 200 mL/cmH₂O (**Spahija et Grassino 1996; West et Luks 2015**). En modifiant l'Équation 1, on obtient donc l'équation suivante :

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

Équation 4 - Formule de la compliance, d'après (West et Luks 2015).

Les résistances des voies aériennes sont définies comme étant la variation de pression entre la pression proximale et la pression distales des zones de conduction rapportée au débit d'air appliqué. En modifiant l'Équation 2, on obtient :

$$R = \frac{\Delta P}{Q_V} = \frac{P_{atm} - P_{alv}}{Q_V} = \frac{8\eta l}{\pi r^4}$$

Équation 5 - Formule des résistances des voies aérienne, d'après (Kaminsky 2011; West et Luks 2015). ΔP : variation de pression. Q_V : débit ventilatoire ($P\pi r^4/8nl$). η : viscosité du gaz. l : longueur du tube (schématisant les voies aériennes de conduction). r : rayon du tube.

Il est important de noter que les résistances varient de manière inversement proportionnelle au rayon des voies aériennes. Ainsi, une restriction d'un facteur 2 de la section des voies aériennes, selon le modèle mono-alvéolaire, augmente les résistances d'un facteur 16 (**West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016**). Les résistances, normalement comprises entre 2 et 4 cmH₂O/L/s, sont majoritairement dues aux voies aériennes de calibre moyen entre les génération 5 et 10 (**West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016**) (Figure 19).

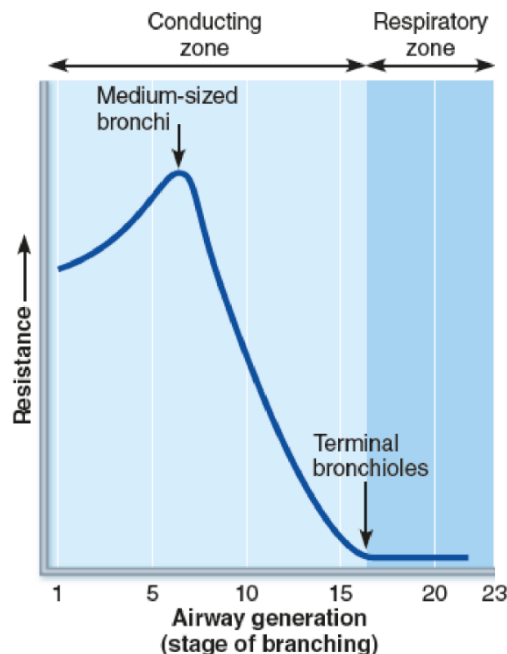


Figure 19 - Évolution de la résistance des voies aériennes en fonction de la génération de bronche étudiée, d'après (Marieb et Hoehn 2016).

Le modèle pulmonaire mono-alvéolaire permet d'appréhender de manière relativement simple le fonctionnement de la mécanique respiratoire. Cependant, ce modèle ne prend pas en compte l'hétérogénéité de la perfusion et de la ventilation pulmonaire.

En effet, du fait de la station debout, il existe un gradient de pression pleurale du fait de la gravité et de la masse des poumons, qui génère un poids tractant les structures respiratoires vers les pieds (Figure 20). Ce point est à la genèse des variations intra- et inter-régionales de la ventilation pulmonaire, car ce gradient de pression pleurale et la gravité, sont à l'origine d'un gradient volumétrique des alvéoles, celles proches de l'apex pulmonaire sont plus volumineuses que celles des bases. Ce gradient volumétrique est, lui-même, à l'origine d'un gradient de compliance supéro-inférieur, auquel s'ajoute des variations de compliance locale des différentes régions pulmonaires (**West et Luks 2015**). À noter, pour de très faibles volumes pulmonaires, proches du volume résiduel (*i.e.* en fin d'expiration), la pression dans les bases pulmonaires devient positive. De fait, les bases pulmonaires sont comprimées et ne sont plus à même de ventiler. Il faut une inspiration relativement importante pour diminuer suffisamment la pression intrapleurale locale pour rouvrir les voies aériennes et permettre, à nouveau, la ventilation (**Kaminsky 2011; West et Luks 2015**) (Figure 21).

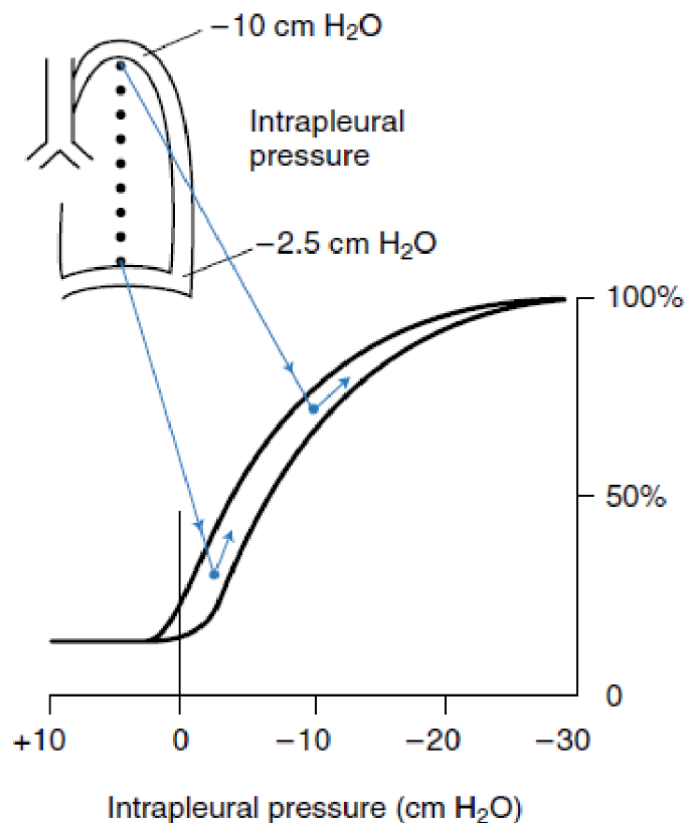


Figure 20 - Illustration du gradient de pression pleurale chez l'adulte sain au repos, d'après (West et Luks 2015).

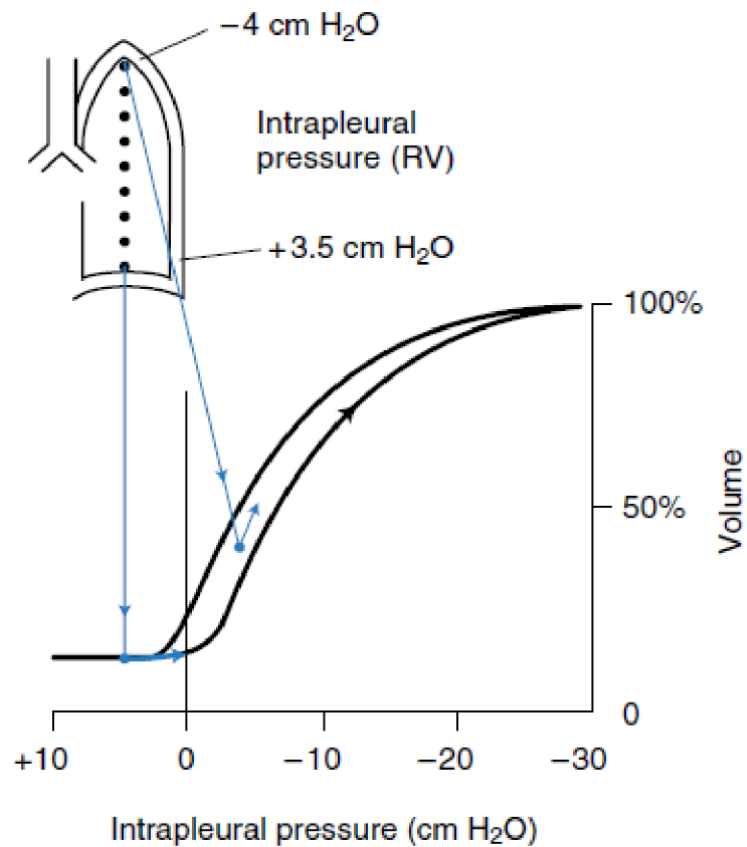


Figure 21 - Illustration du gradient de pression pleurale chez l'adulte sain pour de faibles volumes pulmonaires proches du RV, d'après (West et Luks 2015).

Comme explicité plus haut, il existe aussi une hétérogénéité de perfusion au sein des poumons, du fait de la gravité. Ainsi, la pression dans les vaisseaux pulmonaires est plus élevée dans les bases pulmonaires que dans les apex. Chez l'individu sain, cela induit un gradient supéro-inférieur d'oxygénation du sang (**Kaminsky 2011; West et Luks 2015**) (Figure 22).

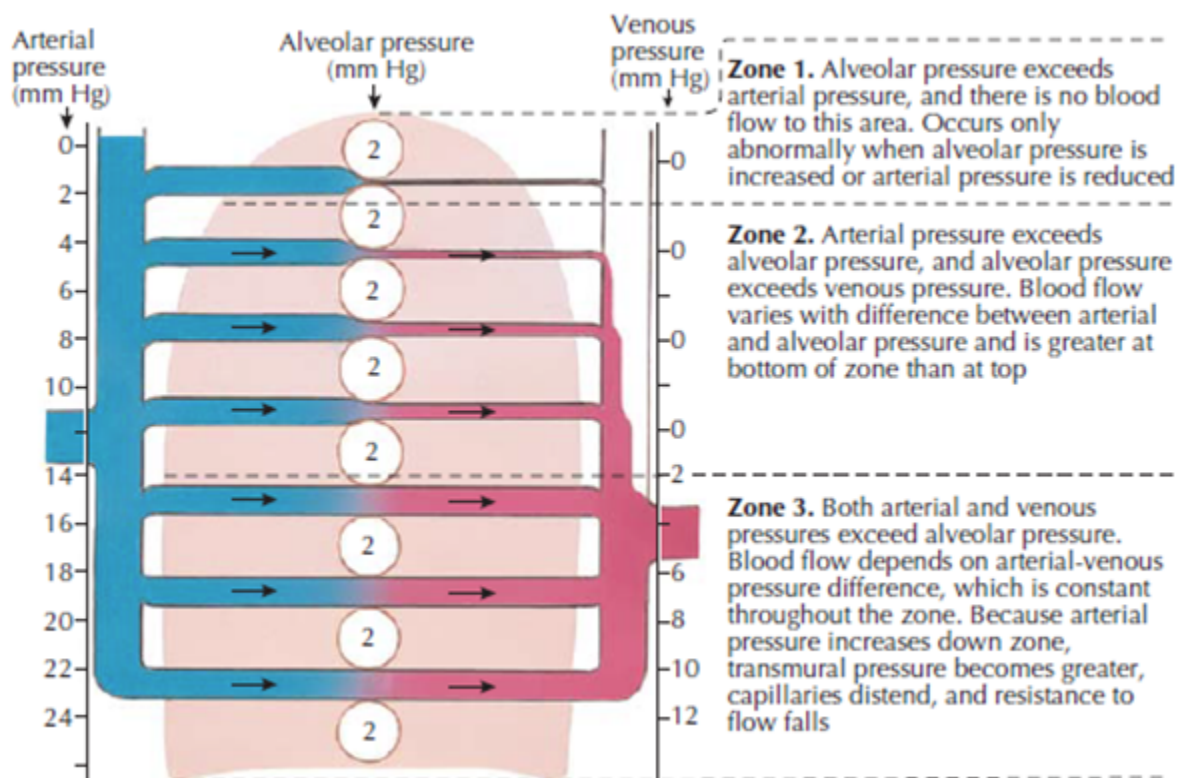


Figure 22 - Représentation schématique de l'hétérogénéité de la vascularisation pulmonaire chez l'individu sain, d'après (Kaminsky 2011).

Toutefois, l'homéostasie pulmonaire tend à permettre un recouplement des perfusions et ventilations locales par des adaptations des résistances vasculaires, afin de maintenir des pressions partielles en O_2 et en CO_2 autour des valeurs de consignes (West et Luks 2015; Marieb et Hoehn 2016) (Figure 23).

Dans les sections ci-dessus, l'anatomie, la physiologie et la mécanique de l'appareil respiratoire sain ont été décrites. De nombreuses variations intra- et interindividuelles existent chez l'adulte sain en fonction des caractéristiques morphométriques et du sexe de l'individu (West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016).

En outre, de nombreuses pathologies, locales ou systémiques, peuvent avoir des répercussions, d'importance variable, sur le fonctionnement de l'appareil respiratoire (West et Luks 2015; Henderson et al. 2016; Marieb et Hoehn 2016; Palange et Rohde 2019).

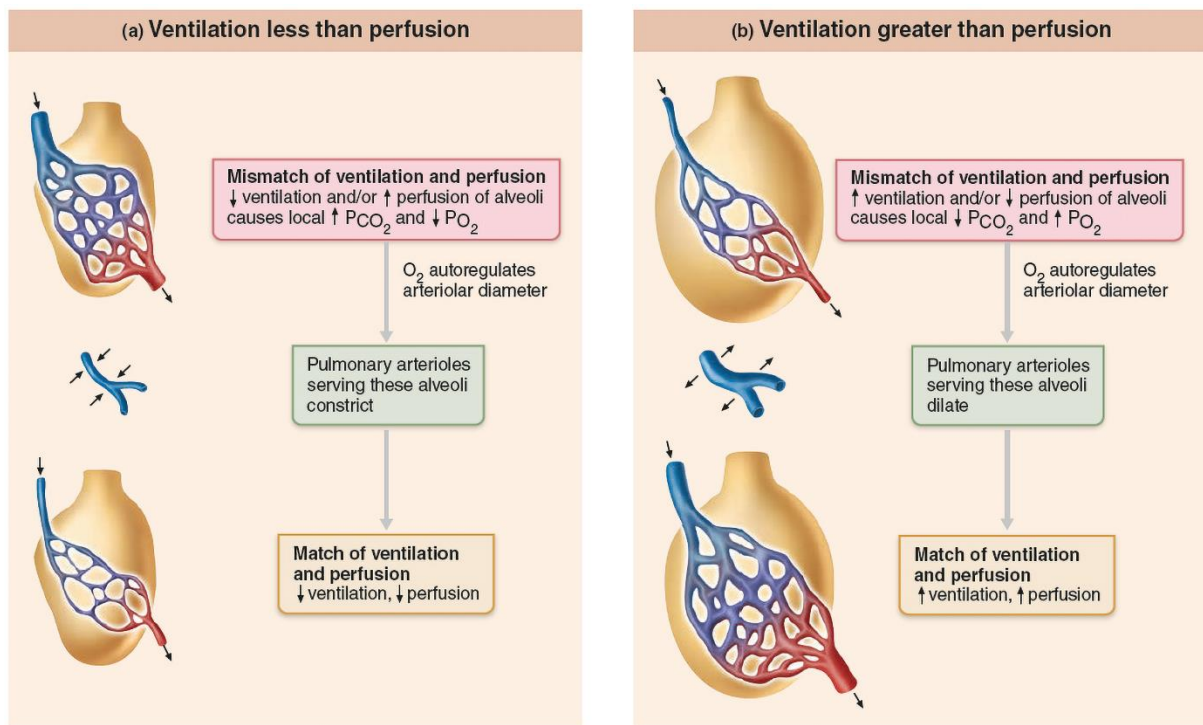


Figure 23 - Illustration de l'auto-adaptation des résistances vasculaires pulmonaires pour permettre un bon recouvrement ventilation-perfusion, d'après (Marieb et Hoehn 2016).

Aérosolthérapie

Dans l'organisme, des perturbations, endogènes ou exogènes, peuvent être à l'origine d'une dérégulation du fonctionnement cellulaire ou tissulaire normal. Ces processus, aigus ou chroniques, sont la cause de pathologies dont les retentissements peuvent être subcliniques ou cliniques. La médecine, dans son sens le plus large, a pour rôle de diagnostiquer et de traiter ces perturbations et leurs retentissements, afin de prévenir une aggravation de la pathologie.

Pour répondre à ces besoins, des traitements ont été mis en place afin de traiter les symptômes de la pathologie ou les perturbations en elles-mêmes, ces traitements pouvant être des actions physiques telles que la chirurgie, la kinésithérapie, etc. ou des actions pharmacologiques par le biais de molécules actives, appelées principes actifs (PA).

1. Rappels pharmacologiques

Pour réaliser leur action pharmacologique, les PA doivent être mis en contact avec l'organisme par le biais d'une voie d'administration. Au cours du développement scientifique et technologique humain, différentes voies d'administration furent utilisées pour obtenir le vaste panel d'effets thérapeutiques aujourd'hui disponible (Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018a) (Figure 24). Chaque voie d'administration présente des

avantages et des limites, qui doivent être prises en compte en fonction de l'urgence de l'état clinique, de l'effet thérapeutique recherché, des capacités et de la coopération du patient pour la prise d'un traitement (Tableau 3).

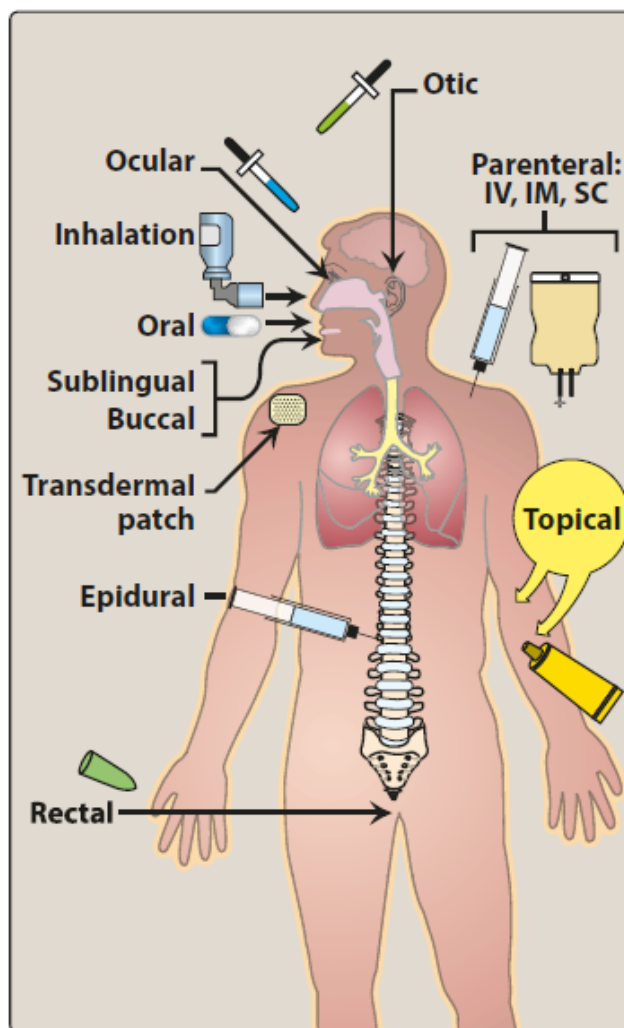


Figure 24 - Illustration des voies d'administration, d'après (Whalen 2014). IV : intraveineuse. IM : intramusculaire. SC : sous-cutanée.

Il est important de noter que les PA ne sont jamais administrés de manière isolée aux patients mais sous forme d'un médicament, qui est la combinaison de la molécule possédant l'effet thérapeutique et d'excipients, qui sont toutes les substances nécessaires pour permettre la fabrication du médicament, ainsi que pour assurer stabilité du PA.

Tableau 3 - Avantages et limites des voies d'administration les plus communes, d'après (Whalen 2014).

Voies d'administration	Avantages	Limites
Orale	Sûre, commune, pratique, économique	Absorption limitée pour certains PA, possibles interactions du bol alimentaire, observance du patient nécessaire, possible métabolisation avant absorption
IV	Effet immédiat, larges volumes administrables, utilisable en urgence, titrage possible	Incompatible avec des substances huileuses, effets secondaires possibles suite à un bolus, injection lente pour la plupart des PA, asepsie stricte requise
SC	Appropriée pour des PA à relargage long, idéale pour des suspension peu soluble	Réaction possible au point d'injection, incompatible pour de larges volumes
IM	Appropriée pour des volumes modérés, approprié pour des substances huileuses ou irritantes, possibilité d'injection par le patient	Biais possible pour certains tests en laboratoire, potentiellement douloureux ou générateur d'hémorragie localisée
Transdermique	Pratique et indolore, idéale pour des PA lipophiles, à faible biodisponibilité orale ou rapidement éliminé	Réaction allergique ou irritation locale, délai d'absorption, faibles doses administrables
Rectale	Idéale en cas de vomissements ou de coma	Irritation locale, faible acceptation par les patients
Inhalée	Absorption presque immédiate, idéale pour les gaz, titrage possible, effets locaux ou systémiques, réduction des effets secondaires	Addictogène par distribution cérébrale rapide, dose délivrée variable, difficulté d'utilisation de certains dispositifs
Sublinguale	Rapide, sûre	Limitée à certains PA et à de faibles doses, pertes par ingestion

L'étude du devenir du PA au cours du temps est appelée la pharmacocinétique. Elle permet aux cliniciens de définir le régime thérapeutique du médicament : voie d'administration, dose administrée, fréquence d'administration et durée du traitement. La pharmacocinétique permet, ainsi, le maintien d'une concentration en PA permettant l'effet thérapeutique tout en minimisant les effets indésirables de ce dernier (**Whalen 2014**). Les effets d'un PA sont étudiés par la pharmacodynamie, qui s'intéresse à ses interactions avec les composants cellulaires (récepteurs ou cibles). Elles permettent de déterminer les relations concentration-effets, les interactions entre différents PA, de prédire les potentiels effets indésirables et

d'étudier les différences inter- et intra-individuelles (**Waller et Sampson 2018b**). Alors que la pharmacocinétique fait intervenir des processus non-spécifiques, la PD s'intéresse aux effets des PA qui sont catégorisés dans des classes en fonction de leur pharmacophore, qui représente les fonctions chimiques de la molécule portant l'activité thérapeutique. Le couple PK/PD permet de déterminer les relations dose-réponse (**Waller et Sampson 2018b**) (Figure 25).

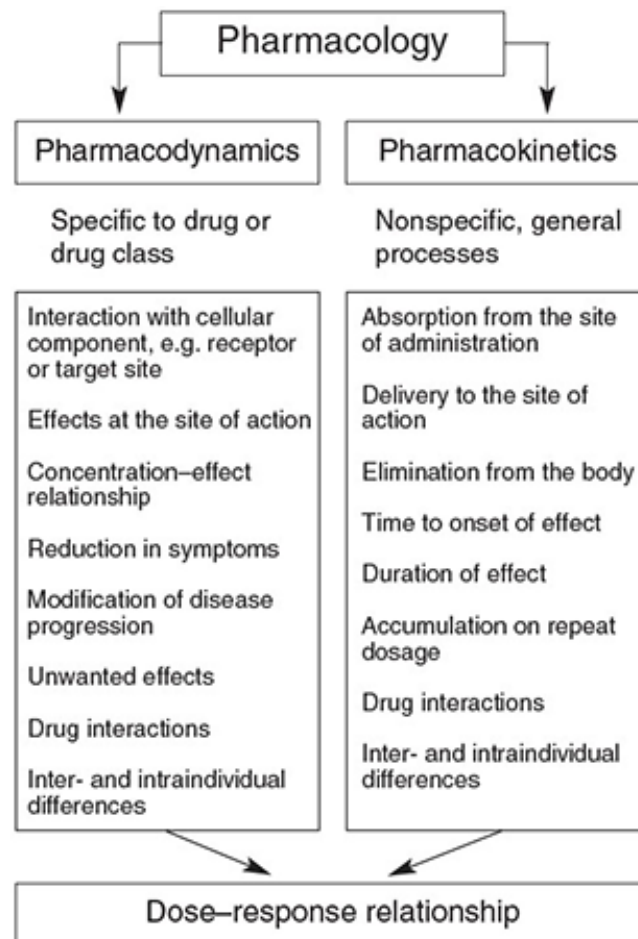


Figure 25 - Apports respectifs de la pharmacocinétique et de la pharmacodynamie à la pharmacologie, d'après (Waller et Sampson 2018b).

Quelle que soit la voie d'administration choisie, le devenir du PA dans l'organisme suit 4 grands processus (**Olsson et al. 2011; Whalen 2014; Katzung 2017**) (Figure 57) :

- Absorption : passage du PA du site d'administration au compartiment plasmatique.
- Distribution : passage du PA, potentiellement réversible, du compartiment plasmatique vers les compartiments interstitiel ou intracellulaire.
- Métabolisation : reconnaissance et biotransformation du PA par l'organisme, les formes secondaires du PA prennent le nom de métabolites.
- Élimination : excrétion du PA et de ses métabolites par l'organisme par voie urinaire, fécale, biliaire ou cutanée.

Des rappels plus précis sur les processus ADME sont fournis dans la partie Rappels pharmacologiques (suite) des Annexes.

2. Définition d'un aérosol

Un aérosol est défini comme étant une suspension de particules dans un gaz vecteur. Cette suspension peut être composée de particules solides ou de gouttelettes liquides. On peut classer les aérosols en deux grandes catégories : les aérosols d'exposition environnementale, tels que les pollens ou les émanations industrielles, et les aérosols thérapeutiques (ou aérosolthérapie), qui correspondent aux PA administrés par voies inhalée (**O'Riordan et Smaldone 2016**).

De manière générale, un aérosol est défini par le diamètre aérodynamique des particules ou des gouttelettes le composant, déterminé selon l'Équation 6 (**Bisgaard et al. 2001; Hirota et Terada 2014**) :

Équation 6 - Formule du diamètre aérodynamique d'une particule/gouttelette aéroportée, d'après (Xu et Hickey 2011; Hirota et Terada 2014). d_{ae} : diamètre aérodynamique. $d_{géo}$: diamètre géométrique. ρ : densité de la particule/gouttelettes. χ : facteur de forme (1 pour les sphères ; >1 pour particules allongées). F_D : résistance de la particule. η : viscosité du gaz vecteur. v : vitesse de la particule. d_e : diamètre hypothétique de la particule sphérique de même densité que la particule considérée.

$$d_{ae} = d_{géo} \times \sqrt{\frac{\rho}{\chi}}$$

$$\text{avec } \chi = \frac{\text{résistance réelle de la particule}}{\text{résistance d'une particule sphérique de même volume et vitesse}} = \frac{F_D}{3 \times \pi \times \eta \times v \times d_e}$$

Cette formule permet la détermination du diamètre aérodynamique d'une particule hypothétique, en fonction de sa densité et de sa forme. Elle présente un intérêt pour le calcul du diamètre moyen des particules dont la granulométrie, c'est-à-dire la distribution de fréquence des particules en fonction de la taille, est monodisperse. C'est le cas, par exemple, des formes pulvérulentes. Cependant, pour les aérosols dont la granulométrie est plus large (aérosols polydisperses), cette méthode de détermination du diamètre des particules n'est pas pertinente. Ainsi, on préférera définir un aérosol thérapeutique par son diamètre aérodynamique médian en masse (MMAD). Il s'agit de la valeur médiane de la distribution granulométrique massique de l'aérosol, approximée au diamètre d'une particule sphérique théorique de densité 1 et présentant la même vitesse de sédimentation que l'aérosol concerné. La détermination du MMAD est indépendante de la forme et de la densité des particules concernées, elle est réalisée par impaction en cascade (**O'Riordan et Smaldone 2016**). Le facteur de dispersion de ce diamètre est apprécié par la détermination de l'écart-type

géométrique (GSD) de l'aérosol (Équation 7). Cette détermination du diamètre aérodynamique d'un aérosol thérapeutique est d'ailleurs décrite dans la Pharmacopée Européenne (livre 2, chapitre 9, section 18) (**Morrow 1974; Sweeney et Brain 1991; Bisgaard et al. 2001; Jaafar-Maalej et al. 2009; Hirota et Terada 2014; O'Riordan et Smaldone 2016**).

En termes physico-chimiques, un aérosol est une suspension colloïdale dans un fluide gazeux. À l'inverse des suspensions colloïdales liquides, dans lesquelles les densités propres du solvant et du soluté sont relativement proches, les suspensions colloïdales gazeuses présentent des densités très différentes. De fait, le devenir d'une particule aérosolisée est majoritairement défini par sa masse (**Xu et Hickey 2011; O'Riordan et Smaldone 2016**).

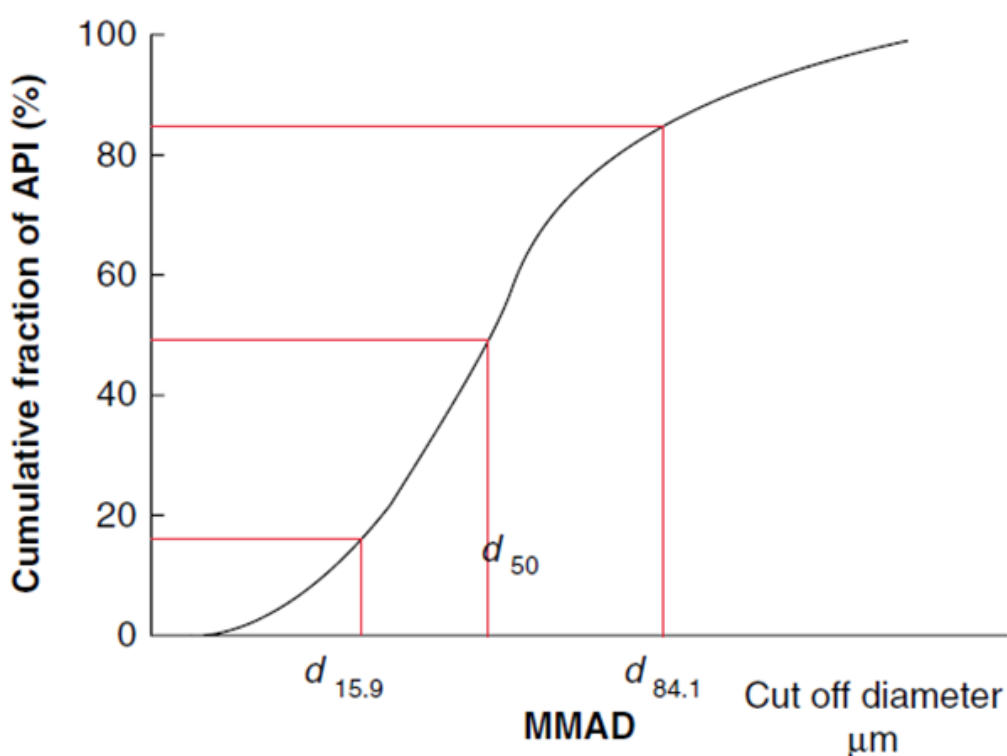


Figure 26 - Distribution cumulée des fractions collectées d'un PA aérosolisé, d'après (Jaafar-Maalej et al. 2009). $d_{84.1}$, d_{50} et $d_{15.9}$: diamètre aérodynamique de la particule au 84,1e, 50e et 15,9e percentiles de la distribution aérodynamique de l'aérosol déterminée par impaction en cascade.

Équation 7 - Formule de détermination de l'écart-type géométrique, d'après (Jaafar-Maalej et al. 2009). $d_{84.1}$ et $d_{15.9}$: diamètre de la particule au 84,1% et 15,9% percentiles de la distribution aérodynamique de l'aérosol déterminée par impaction en cascade.

$$GSD = \sqrt{\frac{d_{84.1}}{d_{15.9}}}$$

3. Mécanismes de dépôts des aérosols

Comme il a été dit dans la section ci-dessus, un aérosol est une suspension colloïdale dont le vecteur est un gaz. De ce fait, une particule d'aérosol subit, en fonction de sa taille, différents mécanismes qui conduiront, ou non, à son dépôt dans le tractus respiratoire. Dans cette section, les grands mécanismes de dépôt des aérosols seront présentés, ainsi que les interactions interparticulaires existantes entre les particules/gouttelettes d'un aérosol et les facteurs d'influence pouvant être utilisés comme potentiels leviers pour l'amélioration de l'aérosolthérapie.

Le dépôt d'un aérosol, au sein du tractus respiratoire, est sous l'influence de 3 facteurs : les caractéristiques physico-chimiques de la particule/gouttelette (masse, forme, charge de surface, densité et vitesse), le débit du gaz vecteur (profil respiratoire du patient ou du respirateur) et l'anatomie des voies aériennes (variations physiopathologiques intra- et inter-individuelles). En outre, le mode d'administration et le type de nébuliseur sont des facteurs d'influence supplémentaires (**Hatch et al. 1964; Bisgaard et al. 2001; Jaafar-Maalej et al. 2009; O'Riordan et Smaldone 2016**).

Mécanismes de dépôt

De manière générale, une particule aérosolisée se voit déposée par l'un des 3 grands mécanismes de dépôt : l'impaction inertielle, la sédimentation gravitationnelle ou la diffusion brownienne. Bien qu'aucun de ces mécanismes ne soit mutuellement exclusif, chacun est prépondérant en fonction d'une taille particulière donnée.

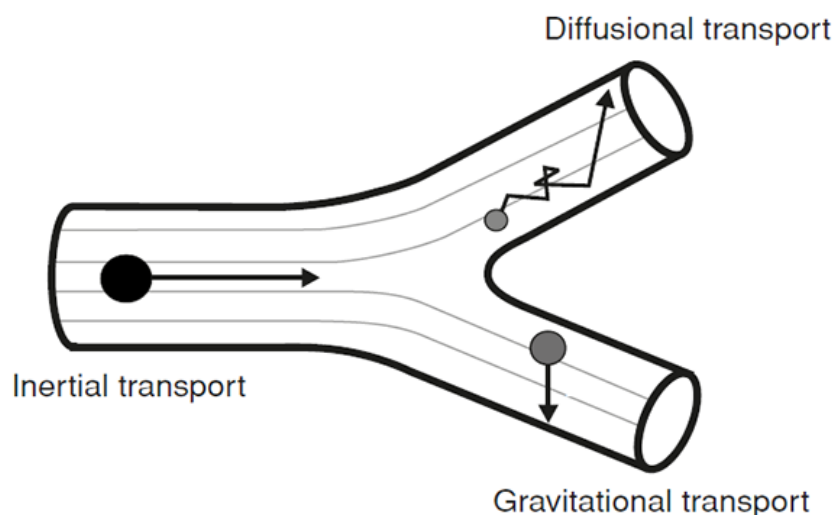


Figure 27 - Représentation schématique des 3 grands mécanismes de dépôt d'une particule aérosolisée, d'après (Bisgaard et al. 2001).

L'impaction inertielle est le mécanisme dominant pour les particules dont la taille est supérieure à 5 µm. En effet, les particules de cette taille ont tendance s'impacter dans les VAS et/ou au niveau des VAI les plus proximales (carène et bronches souches majoritairement), selon un gradient de taille supéro-inférieur. Les particules les plus grosses s'impactant plus haut dans les voies aériennes, car plus la taille est massive, moins la particule est à même de suivre le flux de gaz vecteur. Elle aura donc tendance à entrer en collision avec les obstacles présents sur son trajet. La probabilité d'impaction inertielle est proportionnelle (Équation 8) (**Hatch et al. 1964; Stuart 1984; Bisgaard et al. 2001; Jaafar-Maalej et al. 2009; O'Riordan et Smaldone 2016**) :

Équation 8 - Probabilité d'impaction inertielle d'une particule, d'après (Stuart 1984; O'Riordan et Smaldone 2016). v_t : vitesse de sédimentation. v_a : vitesse du gaz vecteur. θ : angle nécessaire pour évitement de l'obstacle. g : accélération gravitationnelle. r : rayon de la voie aérienne concernée.

$$I \propto (v_t \times v_a \times \sin \frac{\theta}{gr})$$

Dans le cas des phénomènes d'impaction, plus une particule est large, plus sa vitesse de sédimentation est importante. L'augmentation de la vitesse de sédimentation nécessite des angles de déflexion θ de plus en plus importants pour éviter un obstacle. Ainsi, pour une particule, la probabilité de dépôt par impaction inertielle augmente d'autant plus que la particule pénètre dans les voies aériennes. Cette équation s'applique dans le cas d'un flux laminaire. Dans le cas d'un flux turbulent, un risque important de sous-estimation des dépôts peut advenir (**O'Riordan et Smaldone 2016**).

Les particules dont la taille est comprise entre 5 et 0,5 µm sont plus susceptibles de se déposer par sédimentation gravitationnelle. Outre la taille de la particule, sa masse joue aussi un rôle majeur dans ce mécanisme de dépôt. En effet, plus la masse est importante, plus le temps de sédimentation sera court. Le profil respiratoire des patients est particulièrement critique dans le mécanisme de sédimentation. Ainsi, un patient réalisant des pauses inspiratoires présentera un dépôt d'aérosol plus grand que s'il expirait immédiatement à la fin de l'inhalation. Cela est dû au fait que la pause inspiratoire stoppe les débits ventilatoires et donne, ainsi, plus de temps aux particules pour sédimenter. De même, le volume alvéolaire, très fortement lié au diamètre de l'alvéole, joue un rôle important dans la sédimentation, car plus il est grand plus la particule devra parcourir une distance importante pour se déposer. La vitesse de sédimentation peut être appréciée par l'Équation 9 (**Hatch et al. 1964; Bisgaard et al. 2001; Jaafar-Maalej et al. 2009; O'Riordan et Smaldone 2016**) :

Équation 9 - Formule de la vitesse de sédimentation d'une particule aérosolisée, d'après (O'Riordan et Smaldone 2016). v_t : vitesse de sédimentation. ρ : densité de la particule. σ : densité du gaz vecteur. g : accélération gravitationnelle. γ : viscosité du gaz vecteur. d_{ae} : diamètre aérodynamique de la particule.

$$v_t = \frac{(\rho - \sigma) \times g \times d_{ae}^2}{18 \times \gamma}$$

Les très petites particules, d'une taille inférieure à 0,2 μm se déposent dans le tractus respiratoire par diffusion brownienne. D'un point de vue thérapeutique et à la lumière des technologies actuelles, des particules de cette taille sont pratiquement négligeables, du fait de la très faible masse de PA qu'elles véhiculent. Cependant, d'un point de vue exposition environnementale, elles représentent un risque potentiel du fait de leur origine et de leur fort risque d'agglomération au cours de leur trajet. La coefficient de diffusion d'une particule peut être quantifié par l'Équation 10 (Hatch et al. 1964; Bisgaard et al. 2001; Jaafar-Maalej et al. 2009; O'Riordan et Smaldone 2016) :

Équation 10 - Formule du coefficient de diffusion pour une particule aérosolisée, d'après (National Research Council 1991; O'Riordan et Smaldone 2016). k : constante de Boltzmann. T : température en Kelvin. η : viscosité du gaz « vecteur ». d_{ae} : diamètre aérodynamique de la particule.

$$D = \frac{k \times T}{3 \times \pi \times \eta \times d_{ae}}$$

De manière générale, les particules dont la taille est comprise entre 0,2 et 0,5 μm sont à la fois d'un diamètre aérodynamique trop important pour diffuser convenablement mais pas assez massives pour sédimenter suffisamment vite. Elles sont donc peu déposées et sont, majoritairement, expirées (Hatch et al. 1964; Bisgaard et al. 2001; Jaafar-Maalej et al. 2009; O'Riordan et Smaldone 2016).

Le Tableau 4 présente la nature de la relation entre un mécanisme de dépôt d'une particule et les facteurs d'influence, propres à la particule ou au patient. Il est important de noter que seule la diffusion présente une relation inversement proportionnelle avec un facteur, le diamètre aérodynamique de la particule. En effet, la taille de la particule est un paramètre critique du devenir d'un aérosol. En outre, le diamètre aérodynamique permet aussi de cibler, de manière indirecte, des régions spécifiques du tractus respiratoire. La Figure 28 présente l'estimation mathématique de la régionalisation des dépôts d'un aérosol en fonction de son diamètre aérodynamique. On voit aisément que pour les aérosols dont le diamètre aérodynamique est supérieur à 1 ou 2 μm et pour ceux dont il est inférieur à 0,01 μm , les dépôts sont majoritairement extrathoraciques, au niveau des VAS. Pour les particules entre 0,01 et 0,1 μm , les dépôts semblent majoritairement alvéolaires. Enfin, les dépôts trachéobronchiques, bien que minoritaires, sont constatés pour des diamètres aérodynamiques compris entre 1 et 10 μm

ainsi que pour des diamètres aérodynamiques inférieurs à 0,01 μm (Hatch et al. 1964; Bisgaard et al. 2001; Tronde 2002; Heyder 2004; Jaafar-Maalej et al. 2009; Henning et al. 2010; O'Donnell et Smyth 2011; O'Riordan et Smaldone 2016).

Tableau 4 - Nature de la relation existante entre les mécanismes de dépôt d'une particule inhalée et ses facteurs d'influence, d'après (Bisgaard et al. 2001).

	Diamètre particulaire	Densité particulaire	Profil respiratoire	Débit ventilatoire
<i>Impaction</i>	Proportionnelle	Proportionnelle	Indépendante	Proportionnelle
<i>Sédimentation</i>	Proportionnelle	Proportionnelle	Proportionnelle	Indépendante
<i>Diffusion</i>	Inversement proportionnelle	Négligeable	Proportionnelle	Indépendante

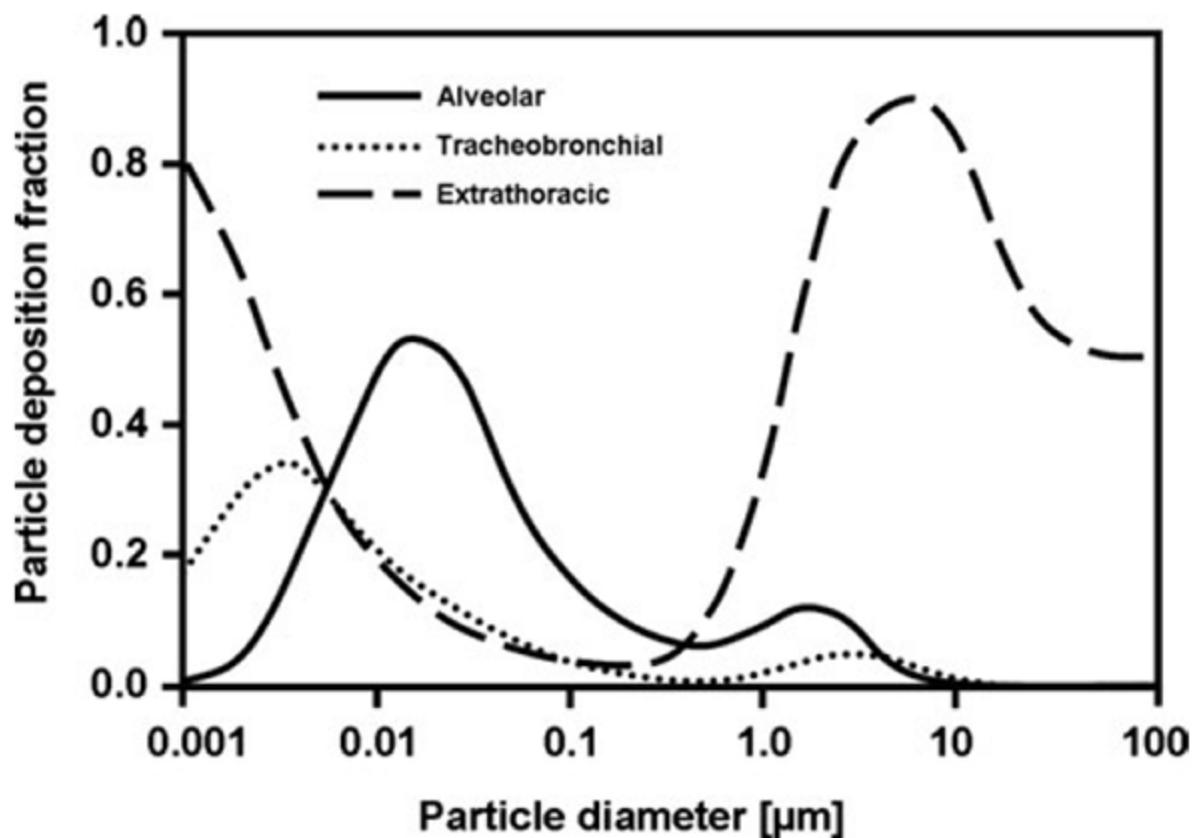


Figure 28 - Représentation graphique de la régionalisation des dépôts d'un aérosol en fonction du diamètre aérodynamique des particules le composant, d'après (Henning et al. 2010).

De nombreux paramètres, issus de la physico-chimie de l'aérosol et du patient lui-même, sont à même de modifier les dépôts d'aérosol (**Jaafar-Maalej et al. 2009**). Les deux sections suivantes, bien que non exhaustives, ont pour but de présenter une vision générale de ces paramètres.

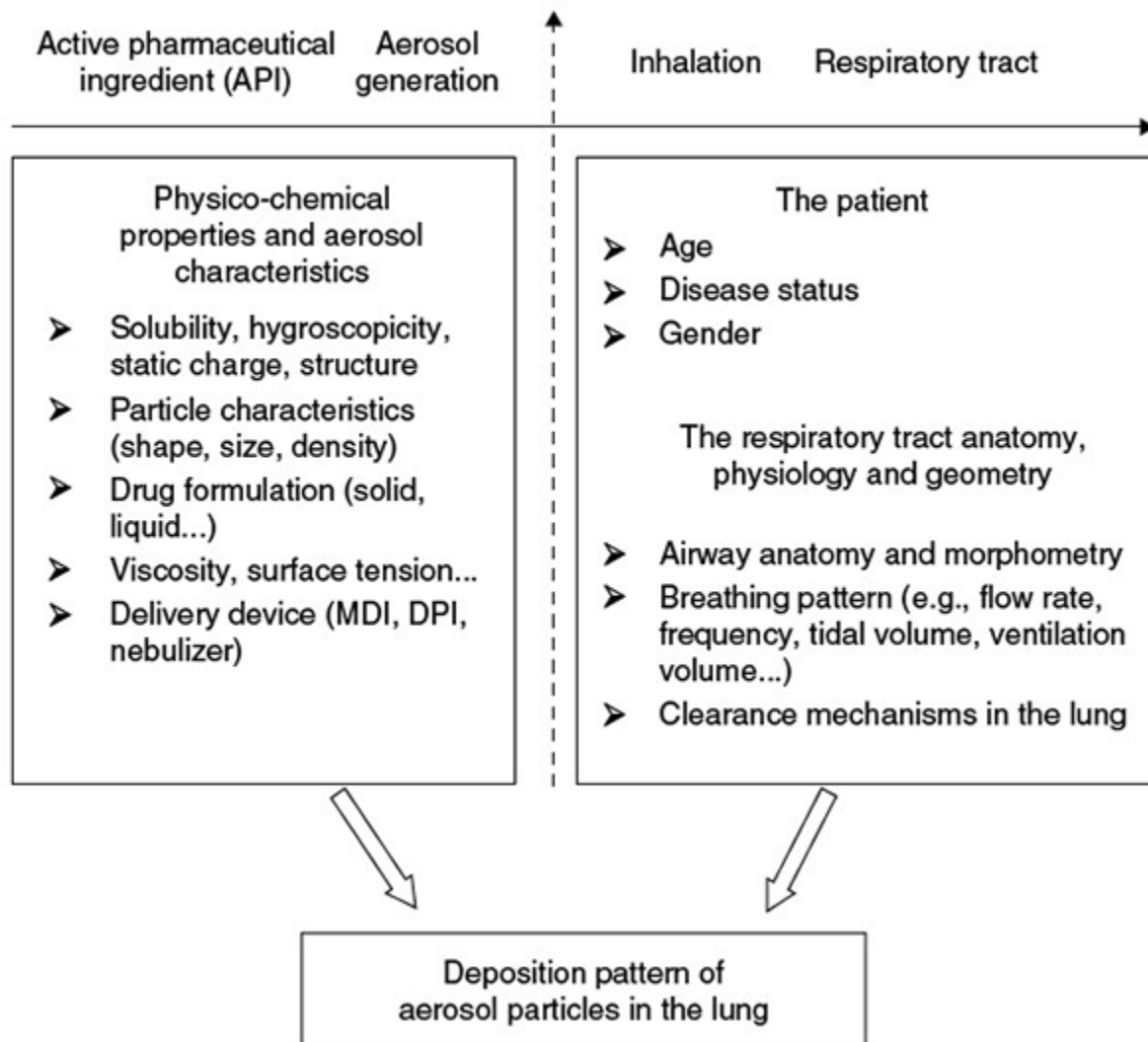


Figure 29 - Paramètres influant sur les dépôts d'aérosols dans les poumons, d'après (Jaafar-Maalej et al. 2009).

Impact du profil respiratoire sur les dépôts des aérosols

Comme il a été explicité dans la partie Introduction, il existe une variabilité inter-individuelle de morphologie des voies aériennes chez les patients mais aussi en termes de profil respiratoire qui sont à même d'influer sur les dépôts d'aérosols au sein du tractus respiratoire. En outre, l'état physiopathologique joue, lui aussi, un rôle. En effet, les patients sains ne présentant pas les mêmes caractéristiques que les patients atteints de pathologies respiratoires.

Cependant, dans le cadre du développement d'un nouveau dispositif d'aérosolisation ou d'un nouveau PA inhalé, il serait utopique de prendre en compte toutes les variabilités inter- et intra-individuelles. Ainsi, le tractus respiratoire a été formalisé, afin de standardiser les données utilisables (Tableau 5). Les données ont été générées à partir de patients sains, pour un VC de 450 mL, une FR de 15 cycles/min, des pauses inspiratoires et expiratoires de 0,5 s et un débit ventilatoire constant de 300 mL/seconde (**Hatch et al. 1964**).

Tableau 5 - Formalisation de la structure du tractus respiratoire, modifié d'après (Hatch et al. 1964).

Régions	Nombre	Volume (mL)	Surface (cm²)	Temps de passage (s)	Fraction d'air inspiré
Bouche	1	20	3	0,07	1,00
Pharynx	1	20	7	0,07	0,96
Trachée	1	24	2	0,07	0,92
Bronches souches	2	10	1,6	0,03	0,86
Bronches secondaires	12	4	1,5	0,015	0,84
Bronches tertiaires	100	5	3,1	0,015	0,83
Bronches quaternaires	770	7	14	0,02	0,82
Bronchioles terminales	$5,4 \cdot 10^4$	45	170	0,15	0,81
Bronchioles respiratoires	$1,1 \cdot 10^5$	33	300	0,10	0,72
 Tubes alvéolaires	$2,6 \cdot 10^7$	160	8000	N/A	0,65
Sacs alvéolaires	$5,2 \cdot 10^7$	730	N/A	N/A	N/A

Cette formalisation des voies aériennes a été le premier pas d'une systématisation des études de dépôts sur les aérosols. Toutefois, il convient de prendre en compte les variations anatomiques inter-individuelles. Même si celles-ci représentent une importante source de

variation, les différences anatomiques au cours du développement, de la toute petite enfance jusqu'à l'âge adulte, sont aussi majeures et peuvent induire une diminution, jusqu'à un facteur 2, des dépôts d'aérosols, particulièrement dans les voies aériennes de conduction (Tableau 6) **(Bisgaard et al. 2001; Rubin 2010; O'Donnell et Smyth 2011; O'Riordan et Smaldone 2016)**.

Le profil respiratoire des patients est, lui aussi, un facteur important pouvant modifier l'ensemble des dépôts d'aérosol ou leur régionalisation. Ainsi, il a été montré que les débits inspiratoires peuvent faire varier les dépôts. En effet, des inspirations lentes et profondes, en comparaison avec une respiration normale chez un sujet sain, peuvent améliorer les dépôts de manière drastique pour un même aérosol. Ces modifications du profil respiratoire sont d'ailleurs à même de permettre un ciblage indirect de certains territoires pulmonaires. La Figure 30 présente une estimation des dépôts d'un aérosol de diamètre aérodynamique de 6 µm dans le tractus respiratoire d'un adulte sain. Les deux premiers profils respiratoires présentés montrent des inspirations de faibles volumes inspirés avec une forte vélocité. Les dépôts estimés de l'aérosol sont majoritairement extrathoracique ou dans les premières générations bronchiques les dépôts périphériques étant négligeables. À l'inverse, le troisième profil correspond à une inspiration d'un volume important avec une vélocité très faible. Les dépôts pulmonaires estimés sont, dans ce cas, majoritairement, périphériques, tandis que les dépôts extrathoraciques et centraux sont presque négligeables. Toutefois, ce profil respiratoire fait apparaître une autre fraction de l'aérosol, négligeable ou inexistante sur les deux premiers profils, une fraction exhalée. **(Bisgaard et al. 2001; Heyder 2004; O'Donnell et Smyth 2011; O'Riordan et Smaldone 2016; Kourmatzis et al. 2018)**.

Tableau 6 - Facteurs réduisant les dépôts d'aérosols chez les enfants de moins 10 ans, d'après (Rubin 2010).

Anatomique	<ul style="list-style-type: none"> Importante proportion de la langue dans la cavité buccale Voies aériennes plus étroites Moins de générations de voies aériennes Alvéoles moins nombreuses et plus larges
Profil respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> Respiration nasale préférentielle FR plus rapide, induisant un volume mort anatomique plus grand VC plus faible Pas de coordination main-bouche et pas de pause respiratoire Débits inspiratoire rapides durant les pleurs ou la détresse respiratoire

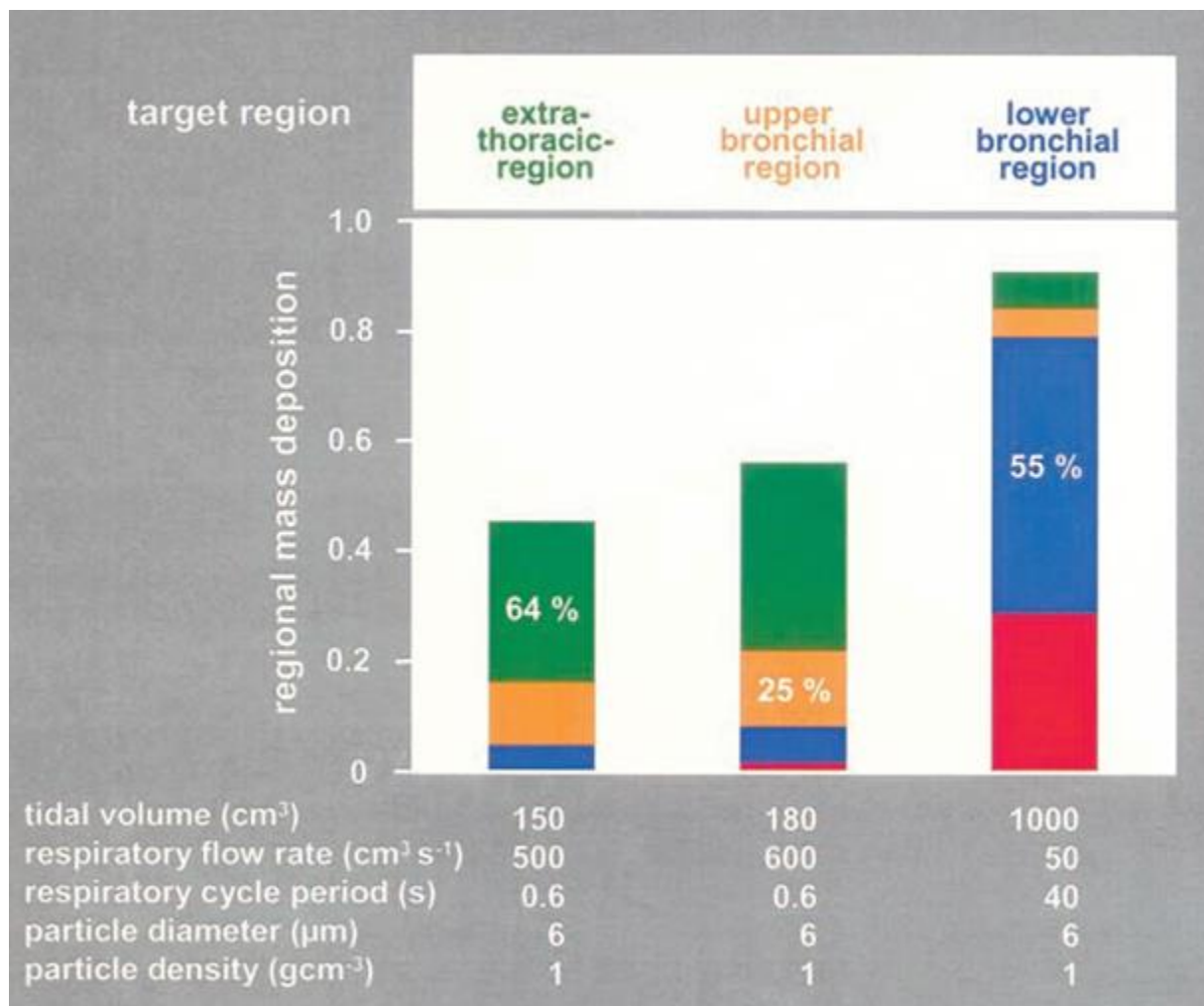


Figure 30 - Illustration du ciblage régional des dépôts d'aérosol en fonction du profil respiratoire, d'après (Heyder 2004).

Enfin, l'état physiologique des patients est un dernier facteur d'importance pouvant modifier les dépôts d'aérosols. Ainsi, des pathologies obstructives (asthme ou la bronchopneumathie chronique obstructive ; BPCO ou COPD en anglais), entraînent un rétrécissement des voies aériennes augmentant de manière locale les résistances des voies aériennes et perturbant les flux d'air, ce qui augmente les dépôts d'aérosol au niveau des régions proximales de l'arbre trachéo-bronchique. Cette augmentation des dépôts est renforcée par une modification des profils respiratoires, avec des VC plus faibles et des modifications des débits ventilatoires. Les pathologies pulmonaires restrictives, telle que la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI ou IPF en anglais), modifient les propriétés mécaniques du parenchyme pulmonaire qui diminuent la compliance pulmonaire de manière hétérogène. Cela induit des modifications des dépôts d'aérosol dans les zones atteintes, par modification de la ventilation locale. Enfin, certaines pathologies pulmonaires, telle que le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA ; ARDS en anglais), nécessitent de placer le patient sous ventilation mécanique. Ce mode respiratoire, dit « en pression positive », où l'air est « poussé » à l'intérieur du patient, modifie de manière

importante le profil respiratoire, générant des variations de dépôt d'aérosols. Les cas les plus sévères, nécessitent l'intubation endotrachéale des patients. Dans ce cas précis, on observe une réduction des pertes en aérosol par l'intermédiaire de la sonde d'intubation qui court-circuite les VAS. Toutefois, il convient de prendre en compte les pertes liées au circuit de ventilation (**Rubin 2010; O'Donnell et Smyth 2011; O'Riordan et Smaldone 2016**).

Impact des paramètres physico-chimiques de l'aérosol sur les dépôts

Les aérosols étant des suspensions colloïdales dans un gaz, ce dernier présente une influence sur leur devenir. Particulièrement, en fonction de l'humidité relative et de la température du gaz, les aérosols peuvent présenter des phénomènes d'évaporation ou de croissance hygroscopique. Ces phénomènes sont passifs et s'arrêtent lorsqu'un équilibre est atteint avec le gaz vecteur. Le taux d'évaporation d'une gouttelette aqueuse, par diffusion, peut être quantifié à l'aide de l'Équation 11 (**Morrow 1986; Bisgaard et al. 2001; Xu et Hickey 2011**) :

Équation 11 - Formule de calcul du taux d'évaporation d'une gouttelette d'aérosol aqueux, d'après (Xu et Hickey 2011). D : coefficient de diffusion de la vapeur d'eau dans le gaz vecteur. M : poids moléculaire de la gouttelette. d_p : diamètre de la gouttelette. ρ_p : densité de la gouttelette. P_∞ et P_p : pressions partielles du gaz vecteur et à l'interface. T_∞ et T_p : température du gaz vecteur et à l'interface. R : constante des gaz parfaits.

$$\frac{d(d_p)}{dt} = \frac{4 \times D \times M}{R \times \rho_p \times d_p} \left[\frac{P_\infty}{T_\infty} - \frac{P_d}{T_d} \right]$$

Les phénomènes d'évaporation prennent place lorsque la pression partielle à l'interface est supérieure à celle du gaz vecteur. L'évaporation induit une diminution de la température de la gouttelette et augmente sa concentration en PA. La croissance hygroscopique d'une particule est l'exact opposé de l'évaporation. Si la gouttelette/particule présente une interface hydrophile, il lui est possible de capter une partie de l'humidité relative du gaz vecteur. Toutefois, la pression partielle en vapeur d'eau dans ce gaz doit être supérieure à la pression partielle à l'interface de la gouttelette/particule.

Ces phénomènes de croissances hygroscopiques s'observent pour la majorité des substances inhalées mais sont particulièrement importants dans le cas des DPI, car les particules y sont sèches et, de fait très, hygroscopiques. Cependant, il est possible de limiter cette croissance par l'utilisation de substances lipophiles placées à l'interface. Les phénomènes de croissance hygroscopique sont observés dès l'entrée de la gouttelette/particule dans les cavités nasales ou buccale et s'intensifient jusqu'à atteindre leur maximum dans la trachée, lorsque l'air inspiré est à son maximum d'humidité relative. Des études de quantification de ces phénomènes ont été réalisées, sur volontaires sains, à l'aide de particules de chlorure de sodium de 0,7 μm de

diamètre. Les données montrent une augmentation de taille de ces particules, extrêmement hygroscopiques, jusqu'à des diamètres d'environ de 4 μm , soit une croissance d'un facteur 6 environ (Figure 31).

Il est intéressant de noter qu'une même gouttelette/particule, peut subir les deux phénomènes entre sa génération et son dépôt dans les voies aériennes. (**Morrow 1986; Bisgaard et al. 2001; Xu et Hickey 2011**).

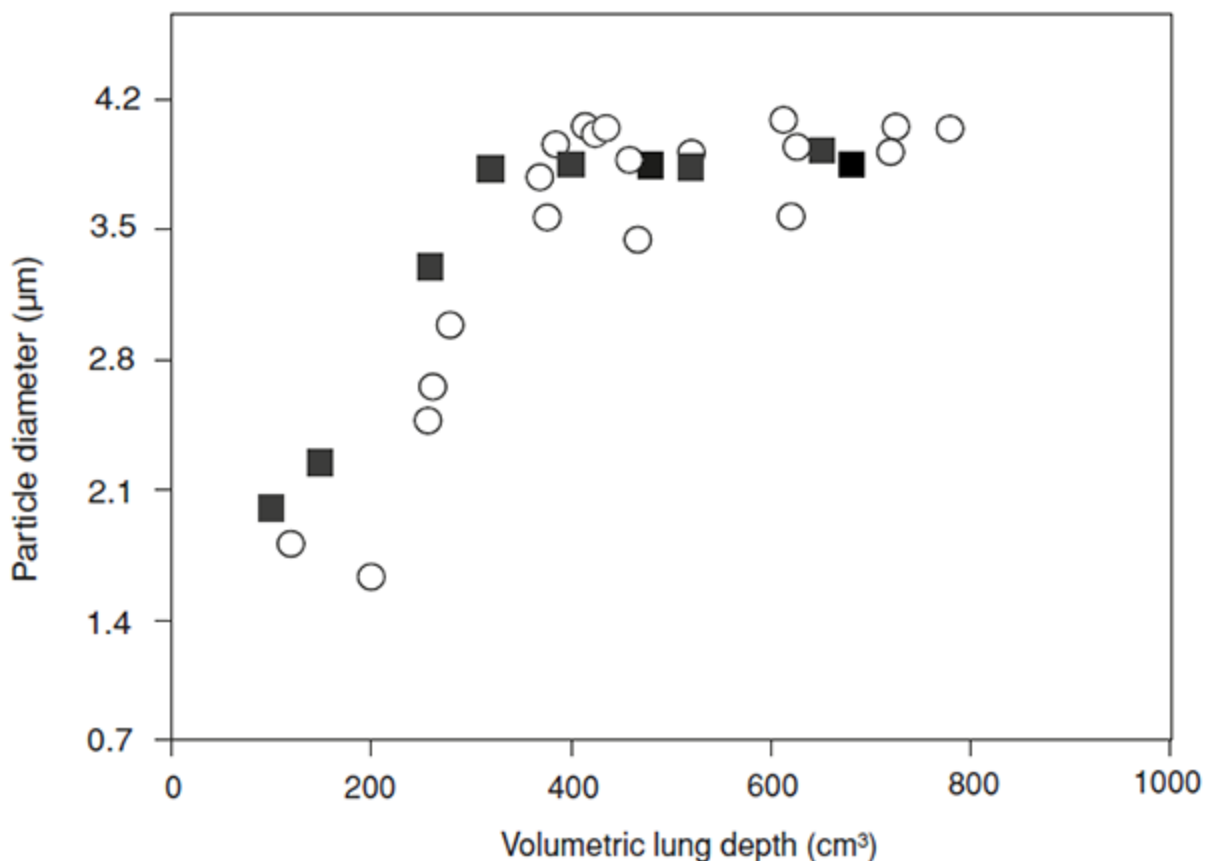


Figure 31 - Graphe montrant l'évolution de la taille de particules de chlorure de sodium de 0,7 μm en fonction de la profondeur de son trajet dans le tractus respiratoire de deux volontaires sains, d'après (Bisgaard et al. 2001).

Outre la température et l'humidité relative du gaz vecteur, sa composition peut modifier le devenir des aérosols en modifiant les phénomènes de sédimentation et de diffusion, ainsi que les phénomènes d'évaporation ou de croissance hygroscopique. Ainsi, en modifiant le gaz vecteur, on peut concentrer ou diluer le PA inhalé et, donc, modifier la régionalisation des dépôts (**Heyder 2004**).

Pris séparément et à l'échelle d'une gouttelette/particule isolée, ces phénomènes sont aisément compréhensibles et relativement simples. Cependant, ces phénomènes deviennent beaucoup plus complexes dans le cas d'un aérosol. En effet, celui-ci se compose d'une multitude de gouttelettes/particules, qui en plus de subir les différents phénomènes ci-dessus interagissent

entre elles, exerçant des forces répulsives ou attractives, qui peuvent mener à leur agglomération. Ces forces s'exercent, aussi, entre les gouttelettes/particules et les surfaces, que ce soient les surfaces des dispositifs médicaux (DM) d'aérosolisation ou différentes surfaces de l'organisme rencontrées lors de leurs trajets. Ces forces sont majoritairement électrostatiques et issues des interactions de Van der Waals (VdW) (**Morrow 1974; Bisgaard et al. 2001; Xu et Hickey 2011; Ohshima 2014; Tadros 2014**).

Les interactions interparticulaires sont expliquées dans la théorie DLVO, de ses auteurs Dejarguin, Landau, Verwey et Overbeek. Elles s'intéressent à la résultante des forces attractives et répulsives pour définir la stabilité de deux particules, ou entre une particule et une surface, à proximité l'une de l'autre, c'est-à-dire leur agrégation ou leur répulsion. L'Équation 12 permet de quantifier la résultante des forces (Figure 32) (**Morrow 1974; Bisgaard et al. 2001; Xu et Hickey 2011; Ohshima 2014; Tadros 2014**) :

Équation 12 - Équation de la résultante des forces attractives et répulsives entre deux particules de taille identique selon la théorie DLVO, d'après (Ohshima 2014). H : distance inter-particulaire. a : rayon de la particule. k : constante de Boltzmann. T : température. γ : coefficient dépendant de la charge de la particule et de son potentiel de surface. $1/\kappa$: longueur de Debye. A : constante d'Hamaker pour deux particules en suspension dans un gaz.

$$V(H) = V_{\text{répulsives}}(H) - V_{\text{attractives}}(H) = \frac{64 \times \pi \times a \times k \times T \times \gamma^2}{\kappa^2} e^{-\kappa H} - \frac{A \times a}{12 \times H}$$

De manière générale, les forces de VdW sont attractives, tandis que les forces électrostatiques sont globalement répulsives dans le cas de deux particules identiques dans le même gaz vecteur. Enfin, la force capillaire est attractive et s'applique entre deux particules hygroscopiques en fonction de l'humidité relative du gaz vecteur. Lorsque l'humidité relative est importante, généralement supérieure à 65%, la force capillaire l'emporte sur les deux autres forces mais seulement à de très courtes distances. De même, lorsque la distance entre les deux particules est faible, de l'ordre de quelques nanomètres, les forces de VdW sont une à deux fois plus importante que les forces électrostatiques. À l'inverse, ces dernières sont des forces de longue distance. Cependant, elles sont rapidement écartées par l'humidité relative du gaz vecteur. La théorie DLVO permet de comprendre les interactions inter-particulaires mais elle n'est pas directement transposable pour définir la performance d'un aérosol. Cela est dû à la complexité des particules réelles : granulométrie disperse, aspérités des surfaces particulières ou effets de la plasticité et de l'élasticité, entre autres (**Hatch et al. 1964; Morrow 1974; Bisgaard et al. 2001; Xu et Hickey 2011; Ohshima 2014; Tadros 2014**).

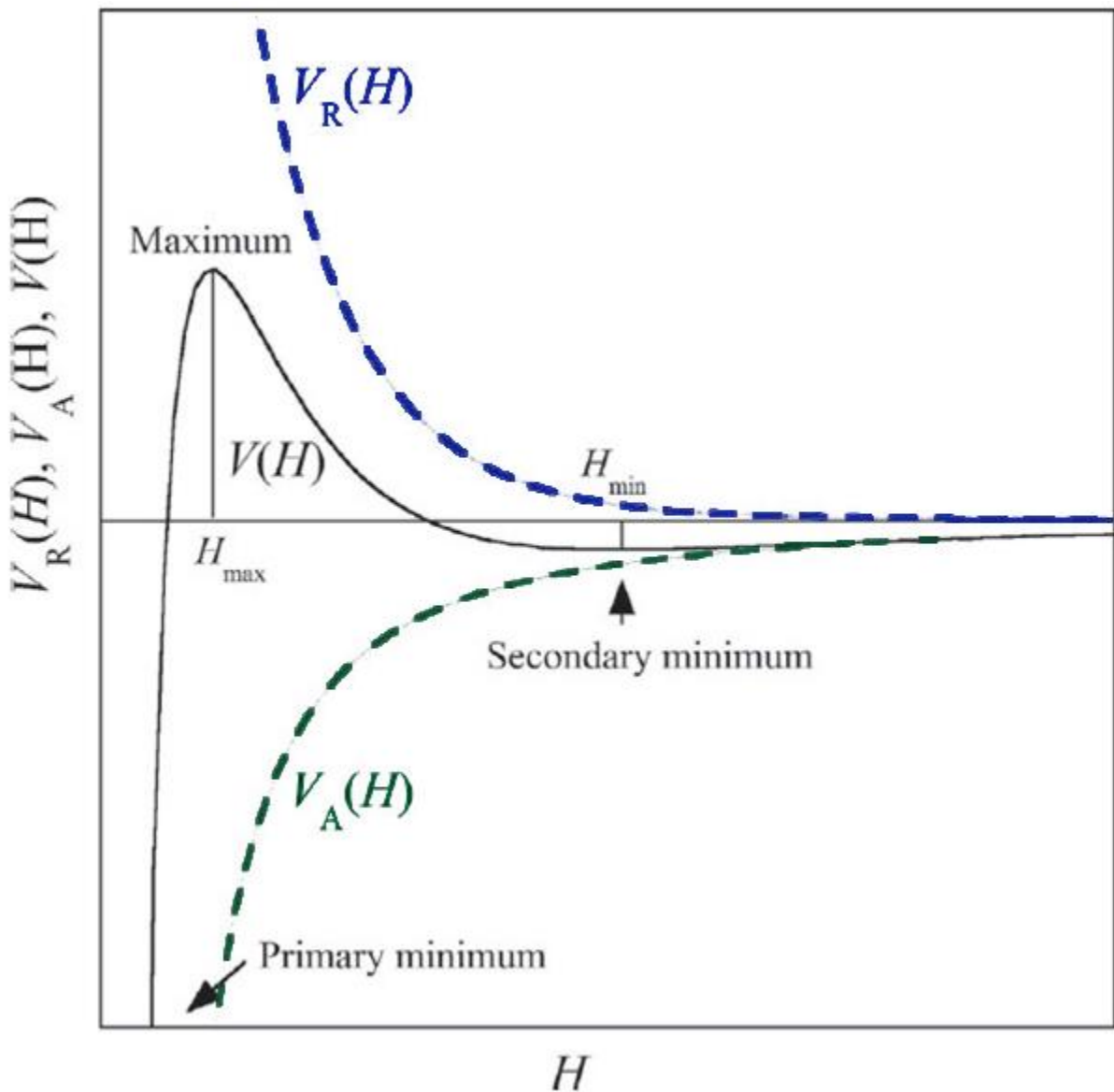


Figure 32 - Représentation schématique des courbes de potentiel des forces répulsives et des forces attractives, ainsi que de la résultante des forces selon la théorie DLVO, modifié d'après (Ohshima 2014). En bleu : courbe de potentiel des forces répulsives électrostatiques. En vert : courbe de potentiel des forces attractives (Van der Waals et capillaire). En abscisse : distance interparticulaire (H). En ordonnée : potentiel des forces.

La Figure 32 présente la résultant des forces attractives et répulsives lors de l'interaction entre deux particules, en fonction de la distance. De manière générale, lorsqu'on considère des distances importantes, la résultante est nulle. Lorsque les deux particules sont proches l'une de l'autre, la résultante montre que les forces attractives sont prépondérantes, jusqu'à une distance H_{\min} . Au-delà de cette distance, les forces répulsives deviennent prépondérantes du fait de la proximité des charges électriques de chaque particule. Il existe une barrière de forces électrostatiques, qui est un équilibre instable à la distance critique H_{\max} . Si les particules arrivent à contrer les forces de répulsion électrostatiques, alors elles s'agglomèreront de manière irréversible (Xu et Hickey 2011; Ohshima 2014; Tadros 2014).

Les forces, qu'elles soient électrostatiques, de VdW ou capillaires, sont conditionnées par les caractéristiques physico-chimiques de la particule concernée, telles que le diamètre, la densité et la forme de la particule (discutés dans la section Mécanismes de dépôt), la lipophilie et/ou l'hydrophilie de la particule, la charge de la particule qui conditionne sa charge de surface et enfin le poids moléculaire. Ces différentes caractéristiques sont directement liées au DM produisant l'aérosol, à la formulation galénique et au gaz vecteur utilisé et peuvent être utilisées pour influencer sur le devenir des aérosols (**Xu et Hickey 2011; Ohshima 2014; Tadros 2014; Yang et al. 2014; Rangaraj et al. 2019**).

4. Différents dispositifs pour une même voie d'administration

Comme il est montré dans la section **Erreur ! Source du renvoi introuvable**. en Annexe, l'aérosolthérapie est une pratique relativement ancienne, qui a subi de nombreuses itérations. Depuis quelques décennies, on observe une certaine stagnation des technologies d'aérosolisation qui peinent à relever les défis rencontrés dans l'amélioration ou le contrôle fin des dépôts d'aérosols.

En termes technologiques, les caractéristiques désirables pour un DM d'aérosolisation sont (**Berlinski 2015**) :

- Sécurité
- Fiabilité
- Portabilité
- Praticité
- Peu de manipulation
- Bon marché
- Délivrance reproductible
- Réactivité

À travers cette partie, les grands types de DM permettant l'aérosolisation seront étudiés, afin de présenter les avantages et les limites de chacun.

(p)MDI – « (pressurized) metered dose inhaler »

La génération d'un aérosol par un pMDI se base sur l'évaporation et les forces de cisaillement d'un gaz vecteur pour vaporiser des gouttelettes d'un liquide. Ces dernières, en s'évaporant, deviennent des particules pulvérulentes dont la taille est compatible avec l'inhalation (**Xu et Hickey 2011**).

En termes matériels, le pMDI se compose d'une petite bonbonne, appelée « canister », scellée par une valve doseuse. Le « canister » contient à la fois le gaz vecteur et la formulation galénique du PA. La valve doseuse est conçue, lors de son activation, pour relarguer un volume fixe de formulation et de gaz. La valve est contrôlée par un déclencheur percé d'un orifice pour

permettre le passage et diriger l'aérosol (Figure 33) **(Bisgaard et al. 2001; Rubin 2010; da Rocha et al. 2011; Chan et al. 2014)**.

La Figure 34 présente le fonctionnement d'une valve doseuse. À l'état initial (A), la chambre doseuse est ouverte vers le « canister » et se trouve, donc, remplie d'un mélange de formulation et de gaz vecteur. À l'état intermédiaire (B), au début de l'activation, le patient pousse sur le déclencheur, qui translate vers le haut et obture la connexion entre la chambre doseuse et le « canister ». À cet instant, la dose est donc isolée dans la chambre doseuse. À l'état final (C), lorsque l'activation du déclencheur est complète, la fin de translation du déclencheur permet la mise en contact de la chambre doseuse avec l'intérieur du déclencheur. L'aérosol est libéré et distribué vers l'extérieur, dans la cavité buccale du patient **(Bisgaard et al. 2001)**.

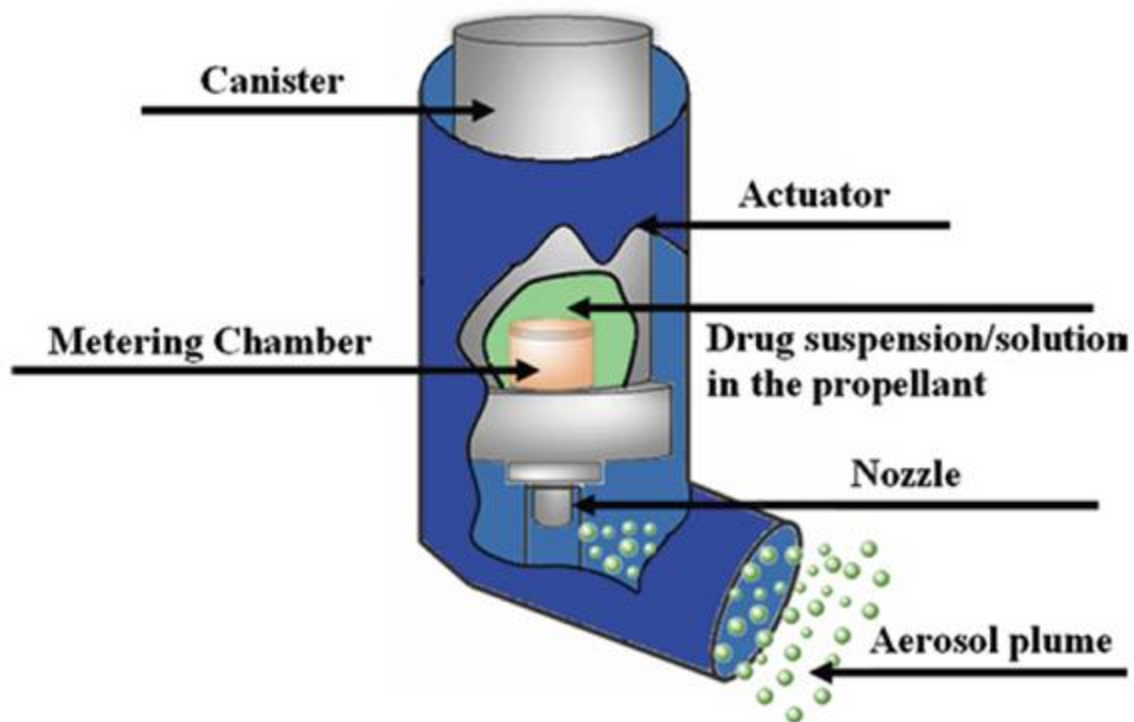


Figure 33 - Représentation des différents composants d'un pMDI, d'après (da Rocha et al. 2011)

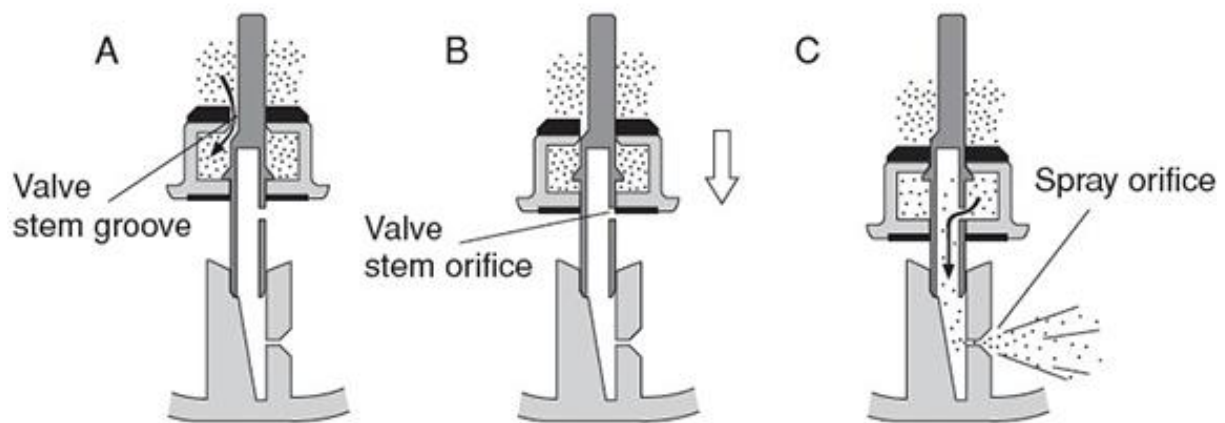


Figure 34 - Schéma de fonctionnement d'une valve doseuse, d'après (Bisgaard et al. 2001). A : état initial – rechargement de la chambre doseuse. B : état intermédiaire – scellage de la chambre doseuse. C : état final – libération de l'aérosol.

L'utilisation d'un pMDI présente deux étapes cruciales : l'agitation du « canister » et la coordination déclenchement-inspiration. Les notices de pMDI décrivent explicitement que le DM doit être agité avant utilisation. Cela est dû à l'existence d'un démélange, *i.e.* une séparation de phase, lors du stockage, du fait de la différence de densité entre le gaz vecteur et la formulation galénique. L'absence d'agitation, ou une agitation insuffisante, peut induire une inhomogénéité des doses délivrées par le DM et donc à de potentielles réductions des effets thérapeutiques. La coordination déclenchement-inspiration est aussi un paramètre crucial pour la bonne utilisation des pMDI. En effet, l'aérosol est propulsé avec une vitesse importante, les phénomènes d'impaction sont donc majorés. Cela peut conduire, en cas de mésusage, à une modification importante des dépôts pulmonaires de l'aérosol, qui serait plus déposée dans les VAS. Ce problème de coordination est particulièrement problématique pour les jeunes enfants et les personnes âgées. (Bisgaard et al. 2001; Rubin 2010; da Rocha et al. 2011).

DPI – « dry powder inhalers »

Les DPI sont des dispositifs qui ont été améliorés, afin de devenir des alternatives aux pMDI. Deux classifications existent pour les DPI, les dispositifs actifs ou passifs et les dispositifs monodoses ou multidoses. Dans les DPI passifs, c'est l'inspiration du patient qui donne l'énergie nécessaire à l'aérosolisation de la poudre, ce qui a pour avantage de ne pas nécessiter une coordination de la part du patient. Cependant, afin de générer un aérosol ayant les bons paramètres, le débit inspiratoire doit être important, ce qui pose des problèmes dans nombres de pathologie. Les DPI actifs, qui découplent l'aérosolisation de l'inspiration, utilisent des sources d'énergie auxiliaires. Les DPI unidoses correspondent aux premières itérations de ce type de DM, bien que certains soient toujours présents sur le marché. Les multidoses, qui

représentent la très grande majorité des DPI, se décomposent en deux sous-catégories : ceux incorporant un réservoir de poudre et ceux présentant un conditionnement unitaire des doses dans des capsules (**Rubin 2010; Crowder et Donovan 2011; Islam et Cleary 2012; Yang et al. 2014**).

La formulation des poudres qui sont incorporées dans les DPI est un paramètre crucial pour la délivrance des PA. En effet, dans les formes poudres, il est nécessaire de vaincre les forces de VdW pour permettre une aérosolisation qualitativement et quantitativement pertinente pour les dépôts pulmonaires. Ainsi, divers excipients sont utilisés dans la forme galénique, afin de répondre à ce besoin, le lactose étant l'un des excipients les plus utilisés. Outre le choix des excipients, les procédés de fabrication de la poudre sont importants, car ils permettent d'obtenir des poudres de granulométrie différentes, dont les caractéristiques physico-chimiques peuvent être drastiquement éloignées (**Crowder et Donovan 2011; da Rocha et al. 2011; Sheth et Myrdal 2011a; Xu et Hickey 2011; Hirota et Terada 2014**). Les récentes évolutions des procédés de fabrication permettent, grâce aux apports de l'ingénierie particulaire et de la modélisation, un contrôle fin des paramètres des poudres pour répondre aux besoins de la délivrance pulmonaire (**Bisgaard et al. 2001; Chan 2006; Rubin 2010, 2010; Crowder et Donovan 2011; Xu et Hickey 2011; Islam et Cleary 2012; Chan et al. 2014; Yang et al. 2014**).

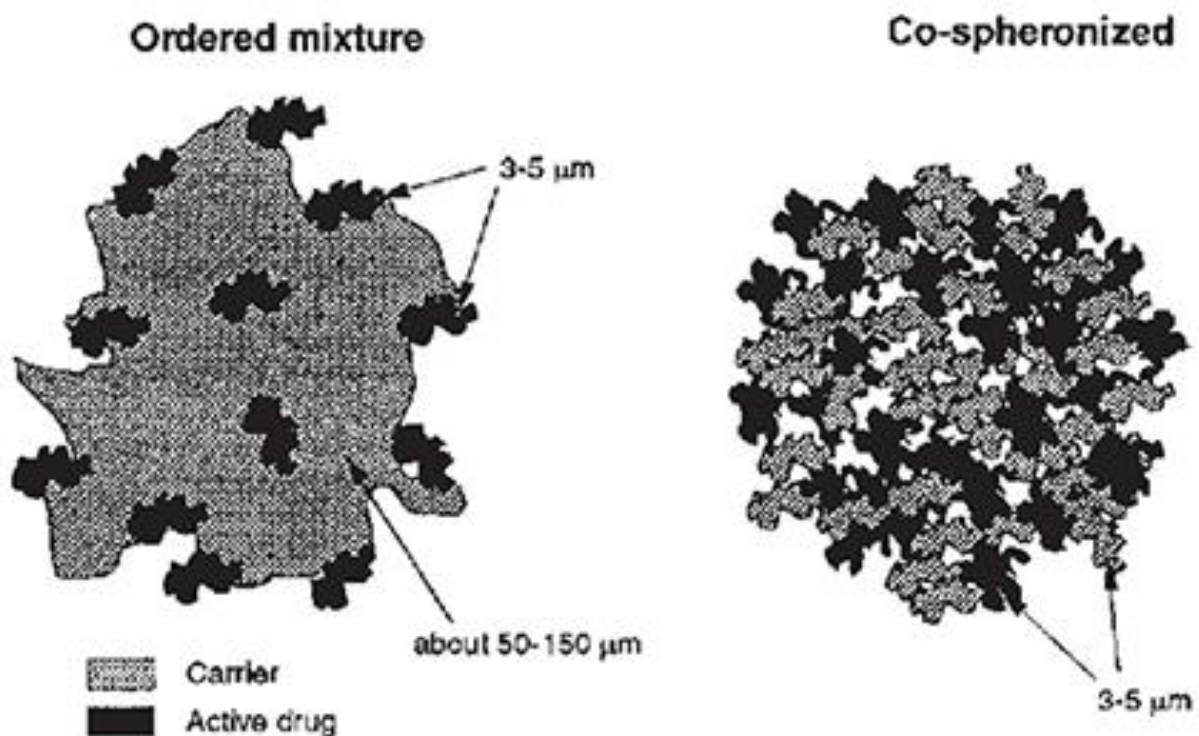


Figure 35 - Exemple de différences dans les microstructures des poudres de granulométrie identique en fonction du procédé de fabrication, d'après (Bisgaard et al. 2001)

Chambres d'inhalation

Les chambres d'inhalation (CI) ont été développées pour fournir une réponse aux problèmes causés par le mésusage des pMDI ou des DPI. Principalement conçus pour les enfants, il s'agit, *in fine*, d'un tube de longueur variable, qui permet de stocker l'aérosol, afin de le rendre disponible pour le patient sans recourir à la coordination déclenchement-inspiration. Outre cette relative praticité d'utilisation, l'autre fonction principale des CI est de permettre l'impaction des particules de taille plus importante, qui s'impacteraient normalement dans les VAS, afin de ne rendre disponible que les particules d'une taille inférieure à 10 µm, celles qui se déposeraient dans les VAI. Les design des CI sont variables, de même que leur composition et la présence ou non de valves pour contrôler les flux d'air (**Bisgaard et al. 2001; Pleasants et Hess 2018**).

L'action des CI est permise par l'augmentation artificielle du volume mort anatomique qu'elles permettent. Ce faisant, elles accroissent les dépôts par sédimentation, impaction et interaction électrostatique. Les paramètres optimaux d'une chambre d'inhalation, pour de jeunes enfants, sont (**Bisgaard et al. 2001**) :

- Un volume optimisé pour permettre un vidage en quelques respirations tout en minimisant l'impaction
- Un matériau réduisant au maximum les interactions électrostatiques
- Un système de valves respiratoires conçu pour être utilisable pour les VC des très jeunes enfants, tout en permettant un volume mort minimal
- Une longue demi-vie de l'aérosol
- Un masque ajusté dont le volume mort est minimal.

Le besoin en CI évolue avec l'âge de l'enfant, par son acceptation d'un masque et sa capacité à réaliser des inspirations forcées et contrôlées (Figure 36).

SMI – « Soft mist inhalers »

Les SMI représentent les inhalateurs les plus récents. Ce type de DM fonctionne sans gaz vecteur mais utilise l'énergie d'un ressort. Ce dernier fournit l'énergie nécessaire pour pousser la solution de PA au travers d'une membrane, permettant l'émission d'un aérosol liquide, avec une faible vélocité (Figure 37). Les SMI ont été développés pour permettre d'outrepasser les limites des pMDI et des DPI. Cependant, il semblerait que l'efficacité dans les dépôts d'aérosols de ce DM entraînerait une exposition systémique plus importantes et, donc, des effets indésirables potentiellement plus importants (**Hess 2008; Chan et al. 2014; Berlinski 2015; Pleasants et Hess 2018**).

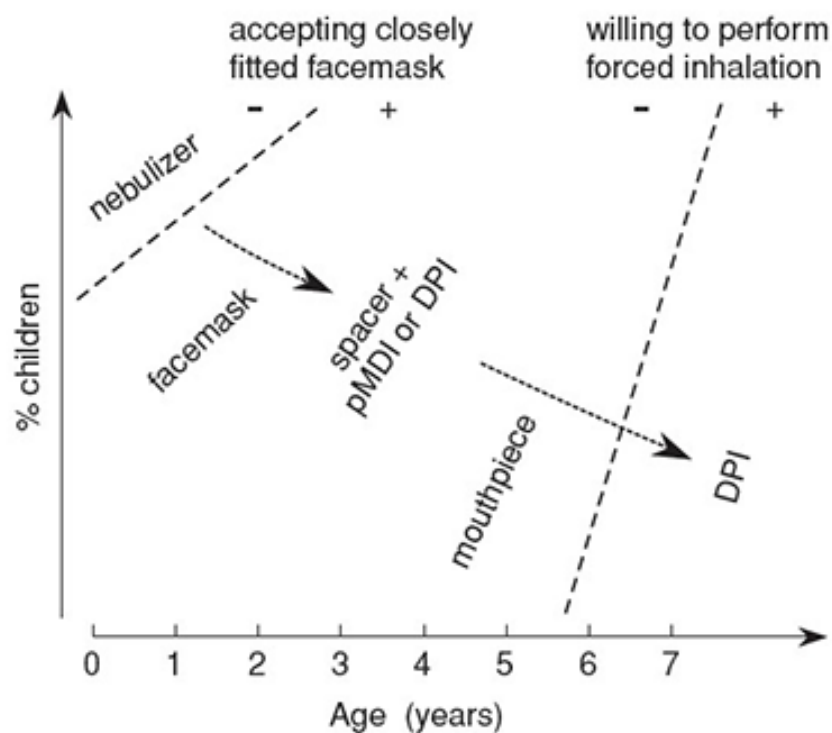


Figure 36 - Illustration du choix des dispositifs d'aérosolisation en fonction de l'âge et des capacités de l'enfant, d'après (Bisgaard et al. 2001).

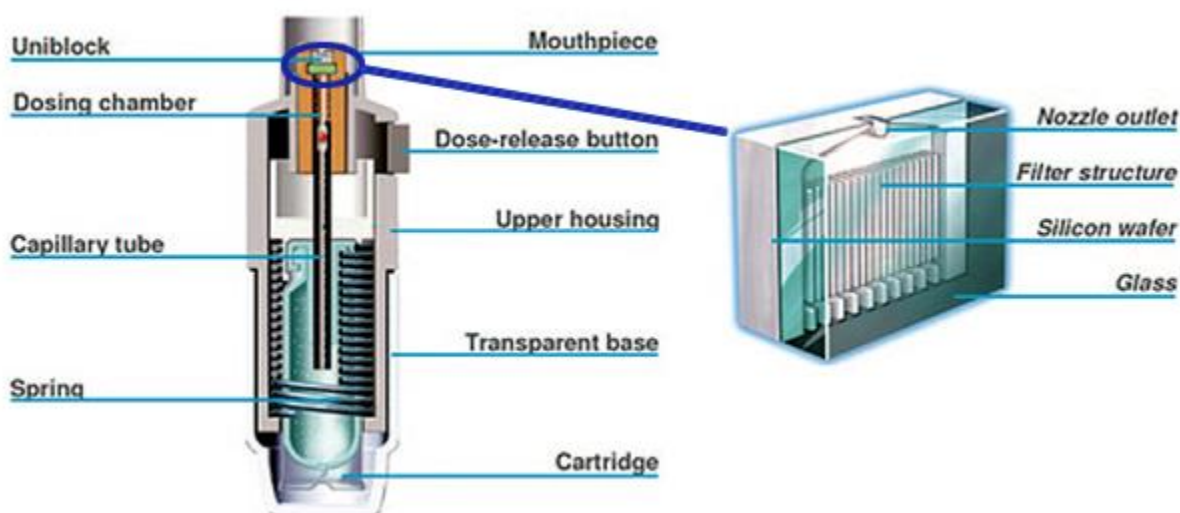


Figure 37 - Représentation schématique des composants d'un SMI, modifié d'après (Hess 2008).

Nébuliseurs

Les nébuliseurs permettent la délivrance de fortes doses de PA tout en ayant l'avantage de ne pas nécessiter de coordination déclenchement-inhalation. Toutefois, ils nécessitent une formation des patients pour que leur utilisation soit optimale. Bien que le profil respiratoire des patients soit toujours un facteur important dans les dépôts d'aérosols, l'utilisation des

nébuliseurs ne nécessite pas d'inspiration forcée mais seulement une respiration au repos. De plus, les nébuliseurs sont des DM de choix pour l'administration pulmonaire chez les patients présentant une détresse respiratoire aiguë (inspiration naso-buccale, ventilation mécanique, etc.). Très peu utilisés en France hors du contexte hospitalier, ils restent une solution de choix dans de nombreux pays, dont l'Allemagne. Il existe 3 grands types de nébuliseurs, en fonction du mécanisme utilisé pour générer l'aérosol : pneumatique, ultrasonique et à tamis vibrant (**Bisgaard et al. 2001; Gibbons et Smyth 2011; Chan et al. 2014; Berlinski 2015; Martin et Finlay 2015; Carvalho et McConville 2016; Pleasants et Hess 2018; Coste 2019**).

Les nébuliseurs pneumatiques fonctionnent grâce à l'effet Venturi. De l'air comprimé, fournit en continu par une pompe, est forcé dans un système de tube ayant pour effet d'accroître sa vitesse. Ce flux d'air accéléré aboutit au niveau d'une buse en créant une zone où les pressions sont diminuées, ce qui induit l'aspiration de la formulation vers la buse. Lorsque la formulation atteint le flux d'air, elle est vaporisée. Il se forme de grosses gouttelettes, qui s'impactent très rapidement sur un déflecteur ou sur les parois du réservoir. Les petites gouttelettes résultantes forment l'aérosols, qui est délivré au patient (Figure 38). Des systèmes de valves et de prises d'air permettent d'optimiser la formation d'aérosol en termes de taille de gouttelettes et de débit d'aérosol (**Bisgaard et al. 2001; Gibbons et Smyth 2011; Chan et al. 2014; Berlinski 2015; Martin et Finlay 2015; Carvalho et McConville 2016; Pleasants et Hess 2018; Coste 2019**).

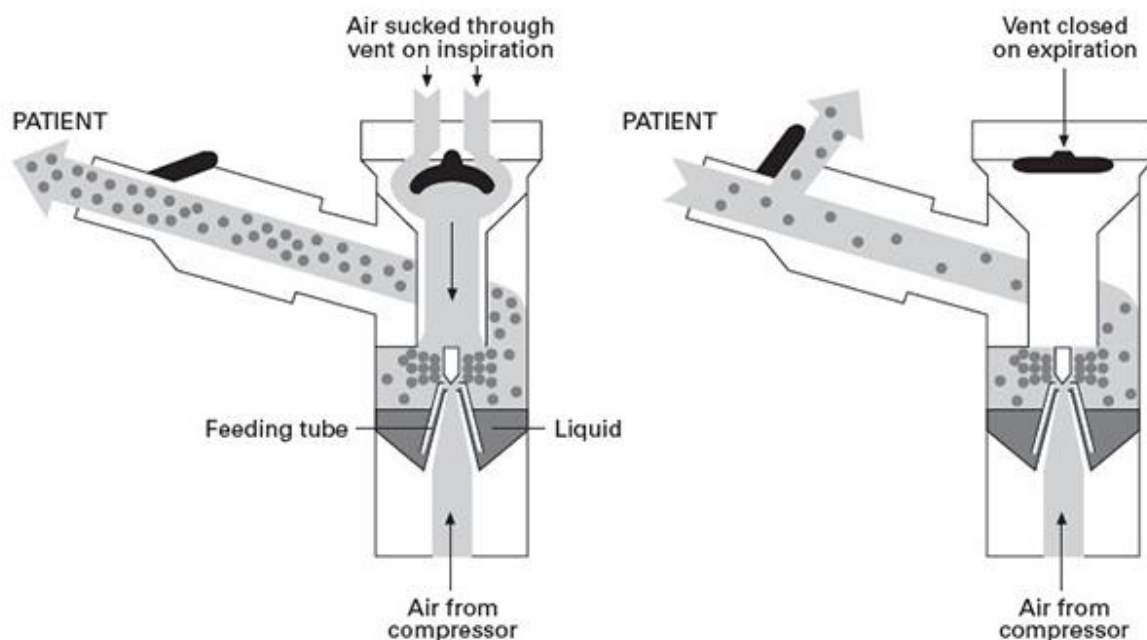


Figure 38 - Représentation schématique du fonctionnement d'un nébuliseur pneumatique valvé, d'après (O'Callaghan et Barry 1997).

Les nébuliseurs ultrasoniques utilisent les capacités d'une membrane piézoélectrique à vibrer à de très hautes fréquences, supérieures à 16 kHz. Les vibrations de membranes induisent des phénomènes de cavitation ou de capillarisation au sein du liquide dans lequel est immergée la membrane, créant l'aérosol. Les phénomènes précis de génération des gouttelettes ne sont pas encore complètement élucidés. Cependant, l'un des effets constatés de ce type de nébulisation est une augmentation de la température du liquide à nébuliser, ce qui peut induire une dénaturation du PA (Figure 39) (Bisgaard et al. 2001; Gibbons et Smyth 2011; Chan et al. 2014; Berlinski 2015; Martin et Finlay 2015; Carvalho et McConville 2016; Pleasants et Hess 2018; Coste 2019).

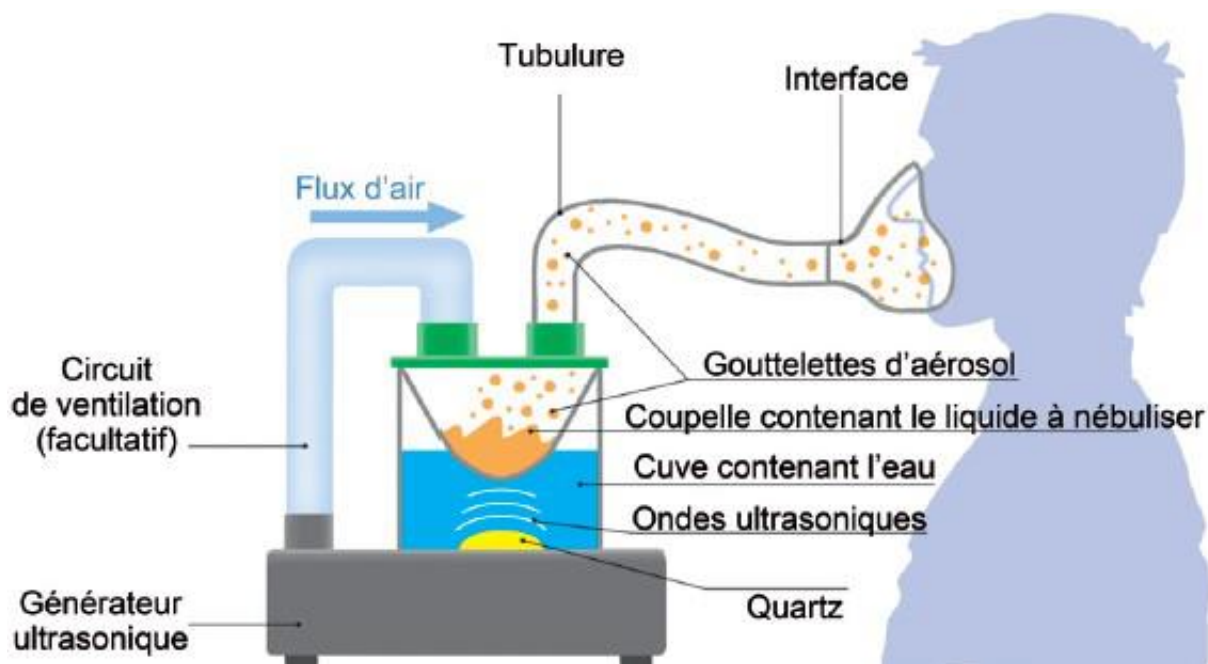


Figure 39 - Représentation schématique d'un nébuliseur ultrasonique, d'après (Coste 2019).

Le troisième et dernier type de nébuliseurs fonctionne comme une micro-pompe, de l'énergie est utilisée pour forcer le passage du liquide à travers une membrane percée de trous micrométriques. Les nébuliseurs à tamis vibrant peuvent être passifs ou actifs. Les systèmes passifs utilisent un cristal piézoélectrique qui génère des vibrations lorsqu'il est soumis à un courant électrique. Un transducteur transmet cette énergie au liquide, créant des vagues. Cette transmission de l'énergie force le passage du liquide à travers la membrane perforée, induisant la production de l'aérosol. Les systèmes actifs ont, eux, une membrane en forme de dôme qui est directement en contact avec le cristal piézoélectrique. Lorsqu'un courant est appliqué, c'est la membrane qui est mise en mouvement, sur un axe perpendiculaire à son orientation. Elle vient alors frapper le liquide qui est extrudé à travers les pores (Figure 40). Ces systèmes de nébulisation permettent la génération d'un aérosol dont le diamètre aérodynamique est relativement petit mais leur efficacité peut être réduite en cas de colmatage des pores des

membranes (Rubin 2010; Gibbons et Smyth 2011; Chan et al. 2014; Berlinski 2015; Carvalho et McConville 2016; Pleasants et Hess 2018; Coste 2019).

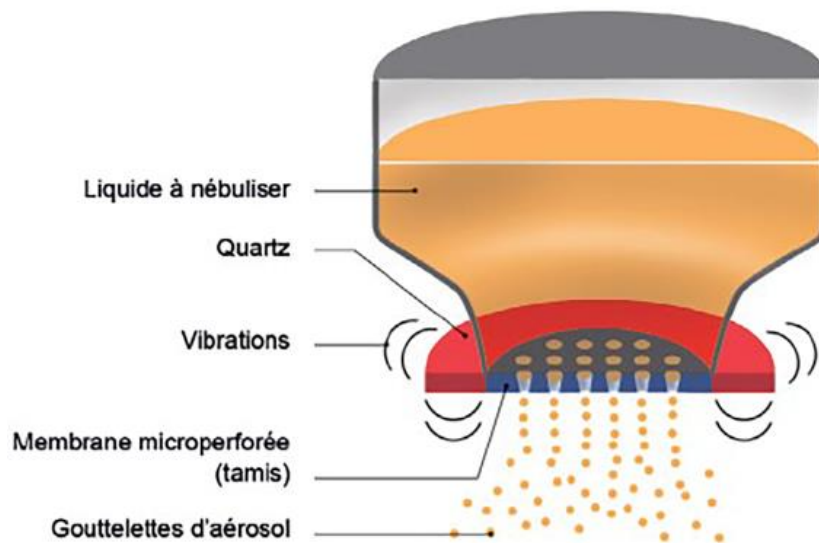


Figure 40 - Représentation schématique d'un nébuliseur à tamis vibrant actif, d'après (Coste 2019).

Un des désavantages des nébuliseurs est la production en continu de l'aérosol. En effet, cela signifie que l'aérosol produit lors de l'expiration est « perdu ». Les systèmes de nébulisation les plus récents peuvent outrepasser ce problème en synchronisant la production de l'aérosol avec l'inspiration ou en utilisant un système de stockage de l'aérosol lors de l'expiration (Figure 41) (O'Callaghan et Barry 1997; Gibbons et Smyth 2011; Pleasants et Hess 2018; Coste 2019).

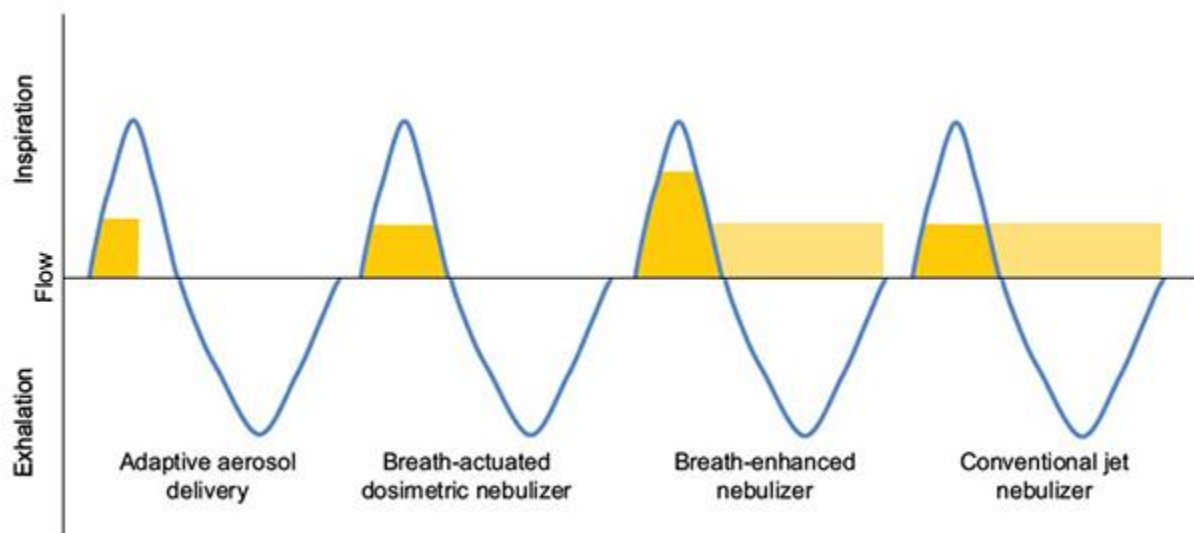


Figure 41 - Représentation schématique de la synchronisation des systèmes de nébulisation avec l'inspiration du patient, d'après (Pleasants et Hess 2018).

Il est important de noter que les nébuliseurs sont les seuls systèmes de nébulisation qui permettent de choisir l'intégralité des modes d'administration pour la voie inhalée : naso-buccale, buccale exclusive et nasale exclusive (Figure 42) **(Coste 2019)**.



Figure 42 - Exemples des interfaces utilisables avec un nébuliseur, d'après (Coste 2019).

Le Tableau 7 ci-dessous présente les avantages et limitations des dispositifs présentés dans cette section. La connaissance de ces paramètres, partagés ou propres aux DM, peuvent influencer sur le choix de prescription des cliniciens en fonction des caractéristiques du patient et de la pathologie à traiter. De manière générale, les DM portables (pMDI, DPI et SMI) sont utilisés pour les traitements au long cours des pathologies pulmonaires, telles que l'asthme ou la BPCO. Les systèmes de nébulisation sont plutôt utilisés à l'hôpital ou chez les très jeune enfants **(Bisgaard et al. 2001; DiBlasi 2015)**. Ces limites sont propres aux DM en eux-mêmes mais d'autres défis existent en aérosolthérapie.

Tableau 7 - Limites et avantages des systèmes d'aérosolisation, d'après (Rubin 2010; Guillon et al. 2013)

Dispositifs		Avantages	Limitations
pMDI		Portable Délivrance rapide Couple DM-médicament	Étanchéité nécessaire Coordination déclenchement- inspiration
DPI		Portable Délivrance rapide Couple DM-médicament	Étanchéité nécessaire Débit inspiratoire > 30 L/min
SMI		Portable Faible débit inspiratoire requis Amélioration des dépôts pulmonaires Délivrance rapide Couple DM-médicament	Augmentation du risque d'effets indésirables Adaptation de la formulation Augmentation des coûts
CI		Portable Réduction des dépôts ORL Utilisable en ventilation mécanique Choix administration naso-buccale ou buccale	Dépôts pulmonaires plus faibles Augmentation des coûts Augmentation de l'encombrement
Nébuliseurs	Pneumatique	Tous types de formulations liquides Choix administration naso-buccale ou buccale Utilisable en ventilation mécanique Jetable Faibles coûts	Encombrement Préparation de la formulation préalable Durée de nébulisation longue
	Ultrasonique	Tous types de solutions Choix administration naso-buccale ou buccale Utilisable en ventilation mécanique	Encombrement Augmentation de la température de la solution Impossible si solution visqueuse Préparation de la formulation préalable Durée de nébulisation longue
	Tamis vibrant	Tous types de solutions et de suspension Portable Choix administration naso-buccale ou buccale Utilisable en ventilation mécanique Dépôts pulmonaires importants	Impossible si formulation visqueuse Préparation de la formulation préalable Durée de nébulisation longue

5. Limites et défis de l'aérosolthérapie

Actuellement, l'aérosolthérapie est principalement utilisée pour le traitement des pathologies pulmonaires, telles que les infections, les pathologies obstructives et certaines pathologies restrictives. L'efficacité de ces traitements, bien qu'impactée par les variations anatomiques inter-individuelles ainsi que par l'âge des patients ou le profil respiratoire, est prouvée et l'aérosolthérapie est utilisée couramment en clinique (**Hodson 1995; Coleman et al. 1996; Rubin et Fink 2001; Smaldone 2004; Rau 2006; Dhand 2011; Rogers et Reibman 2011; Berlinski 2017**). Les PA utilisés, cependant, restent peu nombreux même si de nouvelles entités, telles que des mucolytiques, des antibiotiques initialement utilisés par voie orale, du surfactant ou encore certaines biothérapies, sont actuellement envisagées pour de la délivrance pulmonaire (**Rubin 2006; Apiou-Sbirlea et al. 2013; Ruge et al. 2013**).

En outre, les difficultés de plus en plus grandes rencontrées lors de l'administration par voie orale entraînent un nouvel essor pour les applications systémiques de la voie pulmonaire. Ainsi des administrations pulmonaires sont envisagées pour des pathologies telles que l'hypertension artérielle pulmonaire, certaines maladies infectieuses pour la vaccination, la migraine, l'analgésie, la sclérose en plaque, certaines thérapies géniques ou encore le diabète (**Sanjar et Matthews 2001; Laube 2005, 2014; Heuking et Borchard 2011; Newman 2017; Lavanya et al. 2020**).

Quel que soit l'effet voulu, local ou systémique, une des premières limitations de l'aérosolthérapie réside dans le contrôle fin des dépôts pulmonaires et dans l'obtention d'un ciblage de certaines régions pulmonaires. Ce dernier a été explicité, pour sa composante passive, dans la section Mécanismes de dépôts des aérosols. Toutefois, pour obtenir des effets thérapeutiques plus importants ou pour réduire les effets indésirables, il serait nécessaire de réussir un contrôle des dépôts suffisamment fin pour cibler, majoritairement ou uniquement, les zones atteintes du tractus respiratoire. Des améliorations, dans le contrôle de la granulométrie de l'aérosol ou dans le développement des DM d'aérosolisation sont envisageables. Les avancées importantes dans le développement de nanoparticules thérapeutiques ouvrent aussi la voie à un potentiel ciblage de certaines régions pulmonaires, notamment par la génération d'aérosols contenant des particules sensibles aux champs magnétiques et dont les dépôts seraient contrôlés en plaçant des aimants sur la cage thoracique du patients (**Croce et al. 2006; Durand et al. 2012; Rajapaksa 2013; Darquenne et al. 2016; El Merhie et al. 2016; Newman 2017; Price et al. 2017; Manshadi et al. 2019**). Il est important de noter, qu'actuellement, aucunes de ces options n'a su atteindre l'étape du développement clinique et restent, donc, des potentialités.

Pour l'obtention d'effets systémiques suffisamment importants pour remplacer d'autres voies d'administration, des améliorations dans le contrôle des phénomènes d'absorption pulmonaires des PA sont nécessaires. En effet, les différentes barrières physiques, chimiques et biologiques présentes au niveau de la barrière alvéolo-capillaire sont un des défis principaux à relever pour faire de la voie pulmonaire une alternative intéressante (**Groneberg et al. 2006; El-Sherbiny et al. 2011, 2015; Sakagami et Gumbleton 2011; Ruge et al. 2013; Hidalgo et al. 2015; Newman 2017; Ho et al. 2019**).

Tableau 8 - Principales limites à outrepasser pour optimiser la voie pulmonaire, d'après (Newman 2017).

Mécaniques	Impaction dans les VAS et le VAI de conduction Modifications anatomiques dues à la pathologie Clairance muco-ciliaire
Chimiques	Dégradations enzymatiques Effets du surfactant
Immunologiques	Endocytose par les macrophages alvéolaires
Comportementales	Observance Mésusages

Pour outrepasser ces limites, les innovations galéniques ont un fort rôle à jouer. En effet, même dans le cas idéal d'un DM qui permettrait d'obtenir des dépôts optimisés dans les régions pulmonaires d'intérêt, une absence de formulation galénique appropriée ne permettrait pas d'obtenir le profil pharmacologique recherché. Parmi les formulations des poudres pour DPI et des solutions pour les nébuliseurs, de nombreux efforts ont été réalisés en termes d'ingénierie particulières et d'utilisation d'excipients pour l'amélioration de l'absorption des PA déposés (**Sheth et Myrdal 2011a, 2011b; Islam et Cleary 2012; El-Gendy et al. 2013; Claus et al. 2014; Yang et al. 2014; Liang et al. 2015; Sibum et al. 2018; Ho et al. 2019**).

En outre, des formulations galéniques moins conventionnelles sont aussi à l'étude, particulièrement pour l'obtention d'effets systémiques par voie pulmonaire. En effet, les formes nanoparticulaires présentent des avantages notables. Une nanoparticule est un objet galénique ou technologique dont les trois dimensions sont comprises entre 1 et 100 nm, selon la réglementation européenne (**European Commission 2011**). Toutefois, cet intervalle n'est pas strictement défini, car des particules de dimensions supérieures présentent, elles aussi, des propriétés spécifiques aux nanomatériaux (**European Commission 2011**). Découvertes pour leur utilité thérapeutique dans les années 1970, elles ont connu un essor important entre

1990 et 2000. En conséquence, de nombreuses formes galéniques nanoparticulaires ont été mises sur le marché. Cependant, un manque d'efficacité clinique, des effets secondaires trop importants ou la complexité des processus de fabrication ont conduit à leur retrait du marché. Depuis lors, malgré de nombreuses nanoparticules-candidates, bien peu ont réussi à dépasser les développements préclinique et clinique et encore moins ont été mises sur le marché **(Montigaud 2019)**. Cependant, malgré ces freins, les nanoparticules continuent à constituer une forme galénique intéressante pour la délivrance pulmonaire de PA du fait des possibilités qu'elles offrent dans la protection et l'amélioration de l'absorption et de la distribution des PA. Ce faisant, elles seraient potentiellement à même de permettre le développement de nouvelles applications de la voie inhalée **(Arulmuthu 2007; Bailey et Berkland 2009; Hureaux 2009; Albasarah 2012; Ali et Rytting 2014; Bohr et al. 2014; Paranjpe et Müller-Goymann 2014; El-Sherbiny et al. 2015; Hidalgo et al. 2015; Liang et al. 2015; Resnier et al. 2016; Scherließ 2019; Lavanya et al. 2020)**.

Toutefois, il convient de noter que toutes ces potentialités thérapeutiques peuvent induire d'autres problèmes qu'il convient de démasquer et d'élucider, avant de pouvoir les appliquer en clinique. Ainsi, ces nouvelles formes galéniques et les nouveaux DM conduiraient à des dépôts pulmonaires et une absorption plus élevée. Ce faisant, les effets thérapeutiques attendus seraient donc plus importants. Cependant, il est aussi fort probable que les effets indésirables connus soient plus importants, voire d'observer l'apparition de nouveaux effets indésirables. Enfin, la démultiplication de l'offre thérapeutique pourrait poser des problèmes de bioéquivalence, comme cela fut le cas pour les biothérapies inhalées **(Apiou-Sbirlea et al. 2013; Ruge et al. 2013)**.

Enfin, des problèmes autres que pharmacologiques et techniques se posent pour faire de l'aérosolthérapie une voie d'administration optimisée. Dans un premier temps, de nombreux soucis d'observance thérapeutique de l'aérosolthérapie ont été constatés. En effet, en fonction des pathologies respiratoires étudiées, il a été montré que 30 à 50% des patients ne prenaient pas leurs traitements selon les recommandations des cliniciens et les spécifications des fabricants. Les conséquences de cette non-observance sont un mauvais contrôle de la pathologie, avec de forts risques d'aggravation de l'état clinique pouvant justifier le recours aux services d'urgence. Ainsi, outre les effets néfastes propres au patient, ces manques d'observance représentent aussi un coût sociétal important **(Crompton et al. 2006; Goralski et Davis 2014; Ari 2015; Wallin et al. 2018)**.

Ce manque d'observance de la part des patients a été corrélé avec un manque d'entraînement des patients à l'utilisation de leur traitement, conduisant à des mésusages. En outre, certains patients réclament d'être plus impliqués et responsabilisés dans les choix associés à leur santé. Enfin, il a aussi été montré que face aux très grands nombres de DM et de PA utilisés en

aérosolthérapie, les professionnels de santé sont eux aussi demandeurs de formation sur l'utilisation des produits d'aérosolthérapie. Ces demandes concernent particulièrement les médecins généralistes et les personnels paramédicaux, notamment les personnels infirmiers, les masseurs-kinésithérapeutes et les ergothérapeutes (**Crompton et al. 2006; Rau 2006; Goralski et Davis 2014; Ari 2015; Wallin et al. 2018**).

Malgré tous les intérêts de l'aérosolthérapie, il apparaît que des solutions intégratives sont nécessaires soit pour le développement de nouvelles thérapeutiques soit pour l'ajustement des traitements aux patients (**Cipolla et al. 2010**). Dans un contexte réglementaire particulier, où les DM et les PA répondent à deux réglementations différentes, le développement de nouvelles thérapeutiques demeure un processus long, complexe et coûteux nécessitant le recours à des modèles expérimentaux pour fournir des preuves scientifiques et cliniques robustes, pertinentes et reproductibles avant l'accès au marché (**AFNOR 2009; Scheuch et al. 2010; Hughes et Health 2019; ISO 2019**).

Modèles d'études de la cartographie des dépôts d'aérosols et de l'absorption pulmonaire des principes actifs

Du fait de la nécessité d'approches intégratives pour comprendre, prédire et moduler les dépôts d'aérosol dans le tractus respiratoire, l'utilisation de modèles est devenue très fréquente dans les étapes les plus précoces du développement. En effet, ils permettent, en fonction des critères de jugement choisis, de démasquer des points critiques et orienter les choix nécessaires. Avant de présenter les différents types de modèles existants, il est nécessaire de s'intéresser aux paramètres qui permettent d'évaluer les dépôts d'aérosols.

1. Évaluation des dépôts en aérosolthérapie

L'évaluation des dépôts pulmonaires d'un aérosol est un examen complexe. En effet, à l'inverse des autres voies d'administration, l'étude des doses déposées est compliquée à mettre en place du fait de l'importance de la respiration, de l'accessibilité à l'organe, de la variabilité constatée dans les dépôts d'aérosols et de la faible absorption pulmonaire. Bien que les méthodes d'évaluation doivent être adaptées à la finalité de l'étude, l'utilisation de la médecine nucléaire reste la méthode prépondérante. Elle consiste à utiliser un traceur radioactif aérosolisé qui sera inhalé par un patient. Lorsque la quantité de radioactivité déposée est suffisante, le patient est placé dans un dispositif d'imagerie médicale qui détecte les désintégrations radioactives du traceur. Il est, ainsi, possible d'imager les dépôts de l'aérosol dans tout le tractus respiratoire, ainsi que d'évaluer la clairance mucociliaire de l'aérosol déposé, en fonction des

radiopharmaceutiques utilisés (**Snell et Ganderton 1999; Anderson 2000; O’Riordan et Smaldone 2016**).

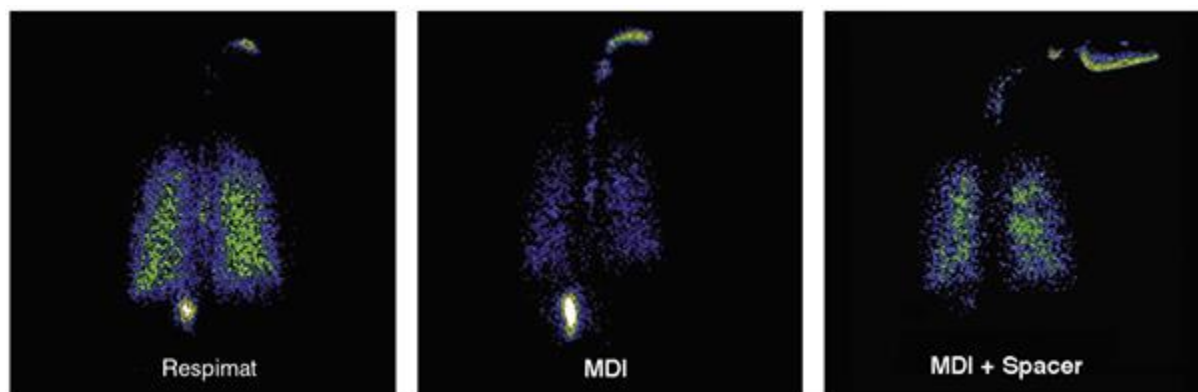


Figure 43 - Exemples d'images acquises lors d'expérience d'évaluation de dépôts d'aérosols générés par différents DM, d'après (Newman et Wilding 1999).

Cette méthode est, actuellement, la plus précise mais elle présente des risques pour le patient par exposition à des rayonnements ionisants. En outre, les appareillages, locaux et autorisations des institutions sanitaires nécessaires pour mettre en place ces études représentent un frein majeur. C'est pourquoi la majorité de ces études sont conduites dans des centres hospitalo-universitaires, qui utilisent couramment ces équipements et examens dans leur pratique clinique.

C'est pourquoi d'autres méthodes ont été mises en place pour évaluer les dépôts d'aérosol. Les essais de PK restent une méthode de choix, relativement peu invasive, pour de telles études. Elles consistent à exposer le patient à l'aérosol et à prélever, à intervalles de temps données, des échantillons d'urine et de sang du patient et à quantifier les concentrations en PA. Les essais de PK nécessitent, cependant, de bloquer les phénomènes d'absorption par voie orale qui surviennent suite aux dépôts naso-oro-pharyngés et à la clairance mucociliaire, généralement par utilisation de charbon actif pour chélater le PA. En outre, dans le cas de l'utilisation de certains analogues à des substances endogènes, il est obligatoire de connaître les niveaux sanguins basaux. Ces études sont donc complexes à mettre en place et sont contraignantes pour le patient et pour l'équipe de recherche (**Snell et Ganderton 1999; O’Riordan et Smaldone 2016**). D'autres méthodes d'évaluation, par réalisation de bronchoscopies pour prélever des échantillons dans les voies aériennes et le parenchyme pulmonaire ou pour étudier les dépôts d'un aérosol fluorescent, sont possibles mais elles sont particulièrement invasives pour le patient, et nécessitent l'utilisation d'équipement coûteux dont la manipulation requiert une expertise importante. Elles sont donc très peu utilisées, réalisées uniquement lorsqu'un tel examen est déjà prévu pour le patient (**Snell et Ganderton 1999; Conway et al. 2013; O’Riordan et Smaldone 2016**).

Quelle que soit la méthode d'évaluation utilisée, il convient de déterminer différentes doses pour, ensuite, comparer les dépôts de l'aérosol. On définit la dose nominale, aussi appelée la charge, comme étant la dose initiale placée dans le DM d'aérosolisation. Les équations suivantes permettent de calculer toutes les doses nécessaires à l'évaluation de base des dépôts d'aérosol (**O'Riordan et Smaldone 2016**) :

Équation 13 - Formule de la dose nébulisée

$$\text{dose nébulisée} = \text{dose nominale} - \text{dose après aérosolisation}$$

Équation 14 - Formule de la dose inhalée

$$\text{dose inhalée} = \text{dose nébulisée} - \text{dose expirée}$$

Équation 15 - Formule de la dose déposée

$$\text{dose déposée} = \text{dose inhalée} - \text{dose expirée}$$

Il est important de noter que les doses inhalées et déposées peuvent être déterminées comme une proportion de la dose nominale ou comme une proportion de la dose nébulisée. Dans le premier cas, cela permet de calculer l'efficacité du DM dans les processus d'aérosolisation. Dans le second cas, cela permet la comparaison entre différents DM en termes de dosimétrie. Enfin, la dose déposée peut être étudiée à l'échelle de l'organisme entier ou à l'échelle de chaque organe ou région d'organe. On définit alors la somme déposée totale comme la somme de toutes les doses déposées.

Cette évaluation initiale des dépôts d'aérosol est très majoritairement réalisée par imagerie scintigraphique, *via* des gamma caméras. Les acquisitions d'images peuvent être réalisées en deux dimensions, on parle alors de scintigraphies planaires, ou en trois dimensions, appelées tomographies d'émissions monophotonique (TEMP) (« single photon emission computed tomography » ; SPECT en anglais) (Figure 44) (**Newman et Wilding 1999; Snell et Ganderton 1999; Fleming et al. 2003, 2012, 2012; Montesantos 2008; Scheuch et al. 2010; Conway et al. 2013; Corcoran 2015; O'Riordan et Smaldone 2016**). Les gamma caméras présentent un fonctionnement qui peut être assimilé à la photographie, exception faite que les ondes détectées ne sont pas des photons lumineux mais des photons gamma dont l'énergie est dépendante du radioisotope utilisé. Étant donné la composante photonique de la détection, des phénomènes d'atténuation et de diffusion sont observés et doivent être corrigés pour permettre une évaluation quantitative précise (Figure 45) (**Snell et Ganderton 1999; Lee et al. 2001; Fleming et al. 2003**).



Figure 44 - Exemples d'images de dépôts d'aérosol obtenues par scintigraphies planaires ou par tomographie, d'après (Newman et Wilding 1999).

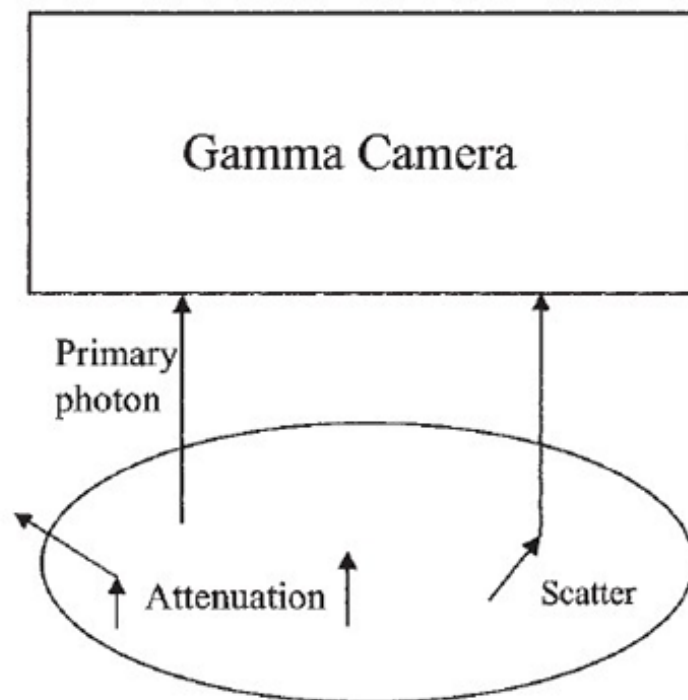


Figure 45 - Représentation schématiques des phénomènes ondulatoires constatés en imagerie nucléaire, d'après (Fleming et al. 2003).

L'évaluation initiale des dépôts d'aérosol peut être complétée par une évaluation plus fine. Celle-ci consiste à déterminer la régionalisation des dépôts au sein des VAI, c'est-à-dire à évaluer les composantes centrales (*i.e.* dans les VAI de conduction) et périphériques (*i.e.* dans les VAI de ventilation) des dépôts. La Figure 46 présente les différences méthodes de découpage des zones pulmonaires pour la détermination de la composante centrale et

périphérique des dépôts. Il est aussi possible de déterminer l'index de pénétration de l'aérosol (PI), qui est le ratio de la dose périphérique sur la dose centrale. La détermination de la régionalisation des dépôts est particulièrement importante dans la comparaison des dépôts générés par des DM différents, notamment pour le ciblage des régions pulmonaires (**Snell et Ganderton 1999; Clark 2012; Newman et al. 2012; Conway et al. 2013; O'Riordan et Smaldone 2016**). Cette évaluation nécessite, cependant, le recours à des examens complémentaires. En effet, du fait de la faible résolution spatiale des gamma caméras, il est complexe d'observer finement les structures anatomiques, voire de définir les contours des poumons. Ainsi, le couplage d'une étude scintigraphique des dépôts d'aérosols peut être complétée par des études scintigraphiques de ventilation en utilisant des gaz radioactifs, tels que le $^{81m}\text{krypton}$ (**Snell et Ganderton 1999; Fleming et al. 2003; O'Riordan et Smaldone 2016**) ou couplé à l'imagerie médicale scanographique (appelée tomodensitométrie, TDM) (**Newman et Wilding 1999; Snell et Ganderton 1999; Conway et al. 2013**) ou encore à de l'imagerie par résonance magnétique (IRM ou MRI en anglais). Toutefois, cette dernière nécessite l'utilisation d'une méthodologie particulière et/ou d'agents de contraste du fait de la faible densité de la majorité des tissus pulmonaires (**Newman et Wilding 1999; Montesantos 2008; Thompson et Finlay 2012**).

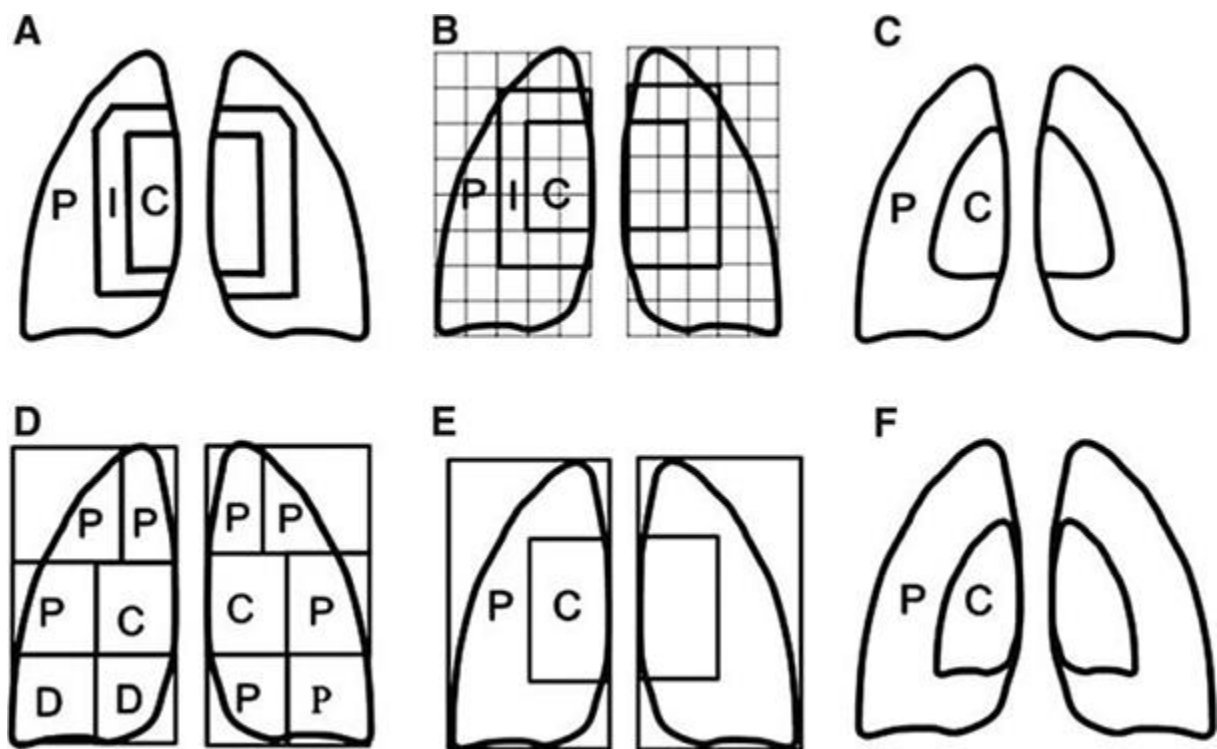


Figure 46 - Représentation schématique des différents découpages possibles pour la détermination des doses centrales et périphériques, d'après (Newman et al. 2012). C : central. I : intermédiaire. P : périphérique.

Les évolutions dans le domaine de l'imagerie nucléaire ont permis d'améliorer les études de dépôts des aérosols, tant sur la résolution spatiale que sur le développement de nouveaux radiotraceurs.

Historiquement, seules les scintigraphies planaires et les TEMP étaient disponibles pour ce type d'études. Elles se basent sur l'utilisation du ^{99m}technétium comme radiotraceur, dont la demi-vie est de 6h et qui est un émetteur gamma dit monophotonique, c'est-à-dire qu'à chaque désintégration, un photon est émis dans une direction unique. C'est le comportement stochastique des désintégrations qui induit l'émission dans les trois dimensions de l'espace **(Newman et Wilding 1999; Snell et Ganderton 1999; Lee et al. 2000; Dolovich 2001; Montesantos 2008; Venegas et al. 2012)**.

L'utilisation d'autres radioisotopes, tels que le ⁶⁷gallium ou le ¹⁸fluorodésoxyglucose (FDG), qui sont des émetteurs de positrons, a permis l'émergence de la tomographie par émission de positron (TEP, PET en anglais). Un positron est l'antiparticule d'un électron, c'est-à-dire un électron chargé positivement. Très rapidement après son émission et après avoir perdu son énergie cinétique par différentes interactions avec la matière (ionisation, excitation et agitation thermique), cette particule d'antimatière génère une réaction d'annihilation, lorsqu'elle rencontre sa particule de matière. Cette réaction d'annihilation, au cours de laquelle les masses des deux particules sont transformées en énergie, produit simultanément 2 photons d'annihilation d'une énergie de 511 keV et orientés à 180° l'un de l'autre. L'image TEP est générée par la détection, en coïncidence, des photons sur deux modules de détection en vis-à-vis. On compare aussi le temps mis par chaque photon pour venir heurter chaque détecteur pour affiner la localisation du site de la réaction annihilation, réalisant ainsi une mesure du temps de vol. La mise au point de la TEP a permis d'améliorer la résolution spatiale des images acquises **(Newman et Wilding 1999; Snell et Ganderton 1999; Lee et al. 2000; Dolovich 2001; Montesantos 2008; Venegas et al. 2012)**.

Il est important de noter que quel que soit le radioisotope utilisé, il est possible de réaliser des études fonctionnelles de dépôts d'aérosol, afin de suivre les phénomènes d'absorption et de clairance mucociliaire. De mise en place plus complexe, ces expérimentations ont permis très tôt de quantifier ces phénomènes. Actuellement, les examens de clairance mucociliaire sont les seuls encore utilisés en routine dans certaines pathologies pulmonaires **(Hatch et al. 1964; Bisgaard et al. 2001; O'Riordan et Smaldone 2016)**.

Tableau 9 - Comparaison des techniques d'imagerie utilisables pour l'évaluation des dépôts d'aérosols, d'après (Corcoran 2015).

Technique d'imagerie	Avantages	Limites
Scintigraphie planaire	Procédures standardisées Technique de quantification établies	Mauvaise résolution spatiale Pas de représentation tridimensionnelle
TEMP	Couplage avec scanner ou MRI pour amélioration de la résolution spatiale Acquisition tridimensionnelle	Temps d'acquisition longs Quantification plus complexe
TEP	Couplage avec scanner ou MRI pour amélioration de la résolution spatiale Acquisition tridimensionnelle Possibilité de marquage direct des PA	Production des radiopharmaceutiques plus complexe Temps de demi-vie des radioisotopes courts
IRM	Acquisition tridimensionnelle Très bonne résolution spatiale Suivi des dépôts et de la ventilation possible simultanément	Utilisation limitée chez l'être humain du fait des quantités nécessaires en agents de contraste

L'évaluation des dépôts d'aérosol présentée dans cette section bien qu'étant la méthode primordiale et réglementaire, ne peut pas systématiquement être mise en place à toutes les étapes du développement d'un nouveau DM ou d'un nouveau PA. En effet, toutes les réglementations éthiques mises en place pour encadrer les expérimentations sur la personne humaine, ainsi que les coûts et délais associés ne sont pas compatibles avec le développement d'un nouveau produit, particulièrement dans le cas des DM dont le cycle de vie est court **(AFNOR 2009; Scheuch et al. 2010; Hughes et Health 2019; ISO 2019)**.

Ainsi, le recours à des modèles précliniques a été nécessaire pour permettre le maintien de l'innovation en aérosolthérapie. Les quatre grands types de modèles (*in silico*, *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*) sont présentés dans les sections suivantes.

2. Apports et limites des modèles *in silico*

Les modèles *in silico* ou modèles mathématiques consistent à créer une équation permettant de prédire le comportement de l'aérosol dans le tractus respiratoire. Du fait des variabilités inter- et intra-individuelle existantes chez l'être humain, ces modèles se basent généralement sur des conceptions idéalisées du tractus respiratoire au sein desquels sont implémentés les

mécanismes de dépôt des aérosols et la dynamique ventilatoire (**Martonen 1993; Martonen et al. 2000**).

Les modèles *in silico* peuvent être classés en différentes catégories en fonction des concepts mathématiques utilisés pour développer le modèle : semi-empirique, déterministe ou stochastique basés sur la mécanique des fluides (Tableau 10) (**Ganguly et al. 2019**).

Tableau 10 - Vue d'ensemble des différents modèles mathématiques utilisés pour l'évaluation des dépôts d'aérosols, d'après (Ganguly et al. 2019).

	Semi-empiriques	Déterministes	Stochastiques
Échelle de modélisation	Poumon entiers	Poumons entiers	Poumons entiers ou site-spécifique
Résolution des dépôts	Régionale	Succession de branchement de voies aériennes	Succession de branchement de voies aériennes ou continu
Suivi particulaire	Non	Modèle eulérien ou lagrangien	Modèle eulérien ou lagrangien
Méthode de calcul	Ajustement de formules mathématiques avec des données expérimentales	Équations différentielles non linéaires	Équations différentielles non linéaires ou équations différentielles partielles
Utilisation	Faible	Modérée	Importante
Exemples	« Human Alimentary Tract Model »	« Multiple-Path Particle Dosimetry Model »	« Computational Fluid and Particle Dynamics »
Modélisation pathologique	Non	Possible	Oui

Les modèles semi-empiriques des dépôts sont des modèles historiques. Ils se basent sur les équations présentées dans la section Mécanismes de dépôt, qui sont modifiées pour s'ajuster à des données expérimentales. Ils ne permettent d'obtenir des prévisions qu'à des niveaux régionaux, généralement corrélés aux lobes et lobules pulmonaires (**Ganguly et al. 2019**).

Les modèles déterministes, eux, reposent sur des concepts mathématiques plus complexes. Ces modèles sont basés sur le diamètre aérodynamique des particules, considérées comme isolées et n'interagissant pas entre elles, dans des modèles idéalisés des voies aériennes (Figure 47) (**ICRP 1994; Darquenne et Paiva 1996; Hofmann 1996; Heyder 2004; Albuquerque 2013; Martin et al. 2018; Ehrmann et al. 2020**). Ces dernières obtenues à partir de données issues de patients, ont été lissées et harmonisées pour être ajustées au modèle de bifurcations pulmonaires de Weibel (**Yeh et Schum 1980**). Les dynamiques ventilatoires sont, ensuite, appliquées aux particules, qui sont considérées dans un espace bidimensionnel. Ces modèles découpent les dépôts en composantes extrathoracique (nasales

et oro-pharynx-laryngées) et en composantes intrathoracique en fonction des générations des voies aériennes (trachées et grosses bronches, petites bronches et bronchioles, acini) (ICRP 1994; Darquenne et Paiva 1996; Hofmann 1996; Heyder 2004; Albuquerque 2013; Martin et al. 2018; Ehrmann et al. 2020).

L'un des modèles déterministes les plus connus est le « Lung Dose Evaluation Program » (LUDEP), qui est né d'une initiative de la Commission Internationale sur la Protection Radiologique (ICRP) en 1994. Les limitations inhérentes à ce modèle (*i.e.* modélisation d'un homme adulte sain pour des expositions professionnelles) n'étaient pas compatibles avec la modélisation des dépôts d'un aérosol médical. Un autre modèle déterministe, le « Multiple-Path Particle Dosimetry » (MPPD) représente une itération importante par rapport au LUDEP, car il permet d'utiliser différents modèles idéalisés des voies aériennes humaines ou animales et estime les dépôts en fonction des paramètres de l'aérosol (MMAD, GSD, densité, facteur de forme). Le MPPD estime aussi la clairance de l'aérosol. Il propose des estimations en découpant le tractus respiratoire en 3 grandes régions : tête, voies aériennes de conduction et voies aériennes de ventilation, elles-mêmes subdivisées en régions pulmonaires anatomiques (ICRP 1994; Darquenne et Paiva 1996; Hofmann 1996; Heyder 2004; Albuquerque 2013; Martin et al. 2018; Ehrmann et al. 2020).

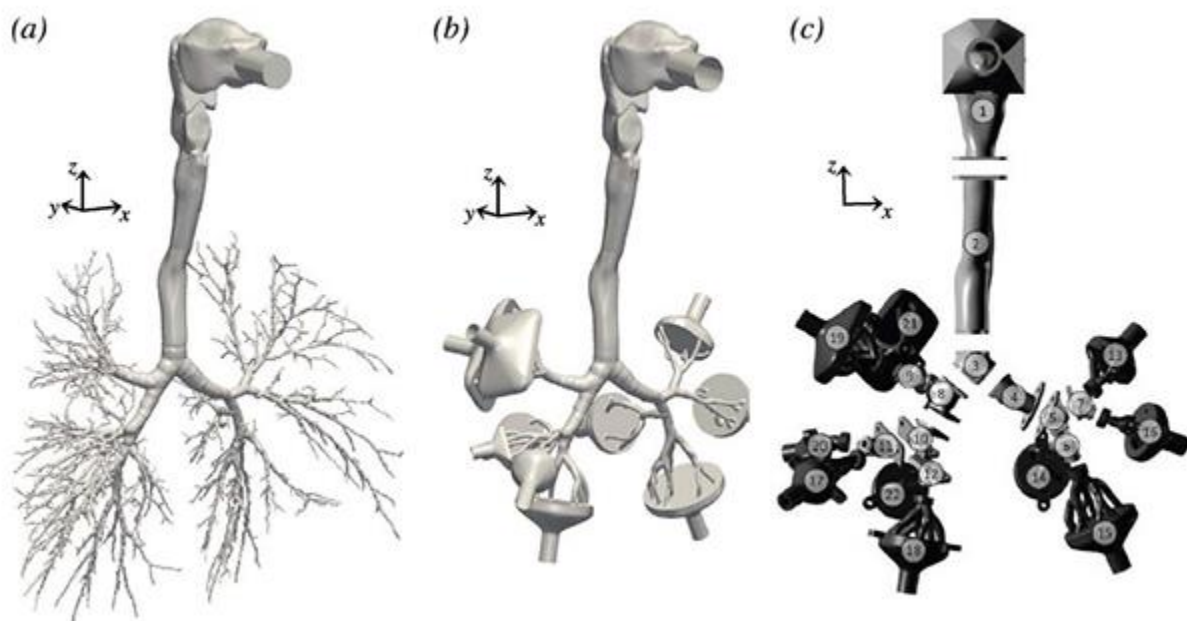


Figure 47 - Exemple de modèle idéalisé des voies aériennes, d'après (Koullapis et al. 2018). (a) : Géométrie réaliste des voies aériennes. (b) : Géométrie adaptée pour expérimentation. (c) : Modèle physique pour expérience de dépôts.

Les modèles stochastiques ou « Computational Fluid Dynamics » (CFD) représentent les modèles les plus récents et les plus complexes dans l'estimation mathématique des dépôts

d'aérosol découlant de la résolution de l'équation de Navier-Stokes. Basés sur des résultats expérimentaux ou sur des théories mathématiques, ils sont une itération importante des modèles déterministes, car ils prennent en compte les flux d'air à l'intérieur du tractus respiratoire. Ce dernier est découpé en différentes sections en fonction du comportement des flux d'air et en fonction du découpage anatomique (Figure 48) **(Darquenne et Paiva 1994, 1996; Hofmann 1996; Choi 2007; Burrowes et al. 2017; Oakes et al. 2017; Koullapis et al. 2018; Martin et al. 2018; Vulović et al. 2018; Longest et al. 2019; Ehrmann et al. 2020) :**

- Cavités nasale et buccale : flux turbulent
- Pharynx et larynx : flux turbulent
- Trachée : flux turbulent modulé par l'effet du flux laryngé
- VAI de conduction : flux turbulent
- VAI de ventilation : flux laminaire
- Acini : flux laminaire

Du fait de la prise en compte de la mécanique des fluides, ces modèles peuvent être utilisés en considérant des débits ventilatoires variables, à l'état d'équilibre ou dépendant du temps. En outre, les modélisations peuvent être réalisées en considérant une, deux ou trois dimensions, ce qui permet de mieux coller à l'anatomie réelle des poumons, qui ne sont plus des structures idéalisées mais qui sont directement issues d'acquisitions sur des individus sains ou malades **(Darquenne et Paiva 1994, 1996; Hofmann 1996; Choi 2007; Burrowes et al. 2017; Oakes et al. 2017; Koullapis et al. 2018; Martin et al. 2018; Vulović et al. 2018; Longest et al. 2019; Ehrmann et al. 2020)**. Cela permet de prendre en compte l'effet des pathologies dans l'estimation des dépôts d'aérosol **(Burrowes et al. 2017; Oakes et al. 2017; Ganguly et al. 2019; Longest et al. 2019)**.

Les modèles CFD les plus récents essaient de prendre en compte les phénomènes pharmacologiques survenant lorsque l'aérosol s'est déposé dans les voies aériennes. L'idée rémanente derrière ces modèles et d'être à même d'estimer les paramètres PK (absorption et clairance notamment) pour, ensuite, réaliser des modèles intégratifs physiologiques et pharmacologiques pour prédire les effets d'un aérosol (« Physiologically Based PK ») **(Bäckman et al. 2018; Martin et al. 2018; Vulović et al. 2018; Longest et al. 2019)**.

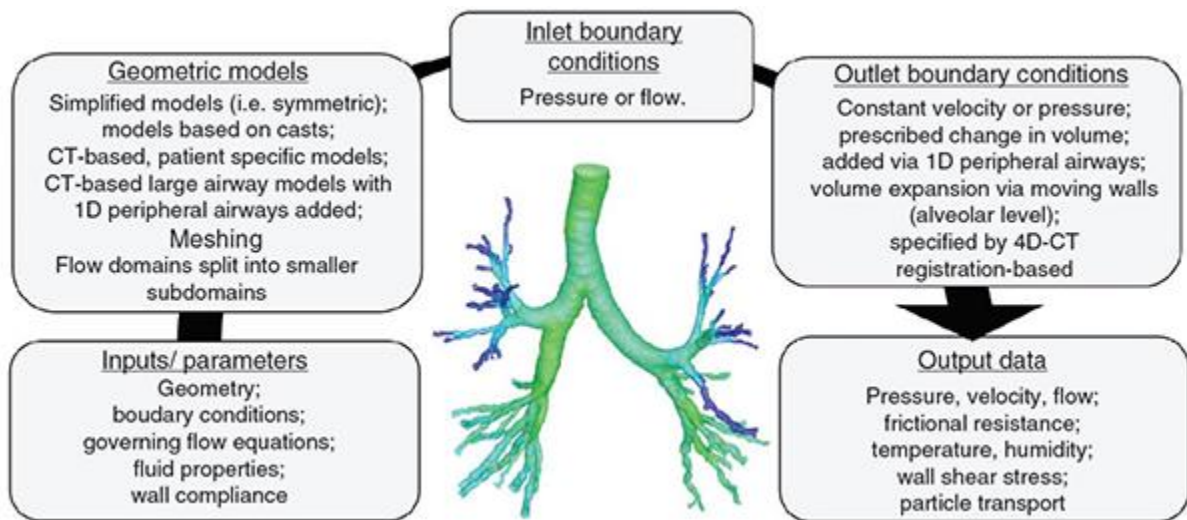


Figure 48 - Points-clés dans le développement d'un modèle de dépôts par CFD, d'après (Burrowes et al. 2017).

3. Apports et limites des modèles *in vitro*

Les modèles *in vitro* sont des modèles purement expérimentaux qui peuvent être divisés en deux catégories. D'une part, les bancs d'essai qui permettent d'étudier les caractéristiques physico-chimiques de l'aérosols et d'effectuer des expériences de dosimétrie. D'autre part, les cultures cellulaires qui permettent d'étudier les effets PD (et quelques paramètres PK) d'un aérosol.

Les bancs d'essais utilisent différents dispositifs pour étudier les dépôts d'aérosol dans la sphère ORL et pour déterminer la dose d'aérosol à même d'atteindre la trachée. La première étape d'un banc d'essai consiste à utiliser un impacteur en cascade (

Figure 49) reconnu par une pharmacopée pour déterminer le MMAD de l'aérosol (Son et al. 2011; Ehrmann et al. 2020).

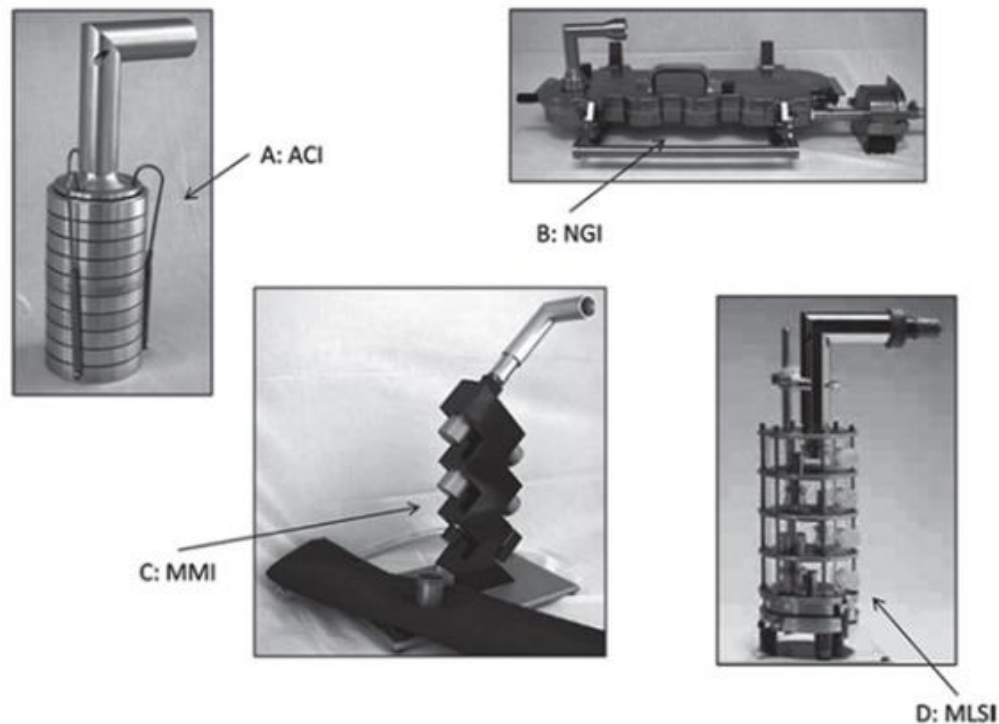


Figure 49 - Exemples d'impacteur en cascade reconnu par la Pharmacopée Européenne, d'après (Son et al. 2011).
 A : Andersen Cascade Impactor. B : Next Generation Impactor. C : Marple Miller Impactor. D : Multistage Liquid Impinger.

Ces bancs, relativement minimalistes, ne permettent cependant pas d'étudier les doses déposées au niveau de la sphère ORL ni la dose qui arrivera dans la trachée. Ainsi, des bancs d'essais plus complexes ont été développés. Ils utilisent des pompes respiratoires, afin de mimer les débits ventilatoires humains, qui peuvent être modifiés pour prendre en compte des différences dues à des pathologies ou les variabilités liées à l'âge. Ces pompes se composent d'un piston contrôlé par un ordinateur. Afin d'accroître leur pertinence, la plupart de ces bancs utilisent une réplique tridimensionnelle des VAS, qui peuvent être des modèles idéalisés ou des répliques de tête de patients, imprimées en trois dimensions (Figure 50) ou issues de plastination d'individu ayant légué leur corps à la science. Des filtres sont utilisés pour collecter la fraction non déposée de l'aérosol à la sortie de la réplique (Son et al. 2011; Le Guellec et al. 2014; Leclerc et al. 2014a, 2014b, 2015; Lizal et al. 2015; El Merhie et al. 2016; Verbanck et al. 2016; Pourchez et al. 2017a; Moghadam et al. 2018; Upadhyay et Palmberg 2018; Ehrmann et al. 2020).

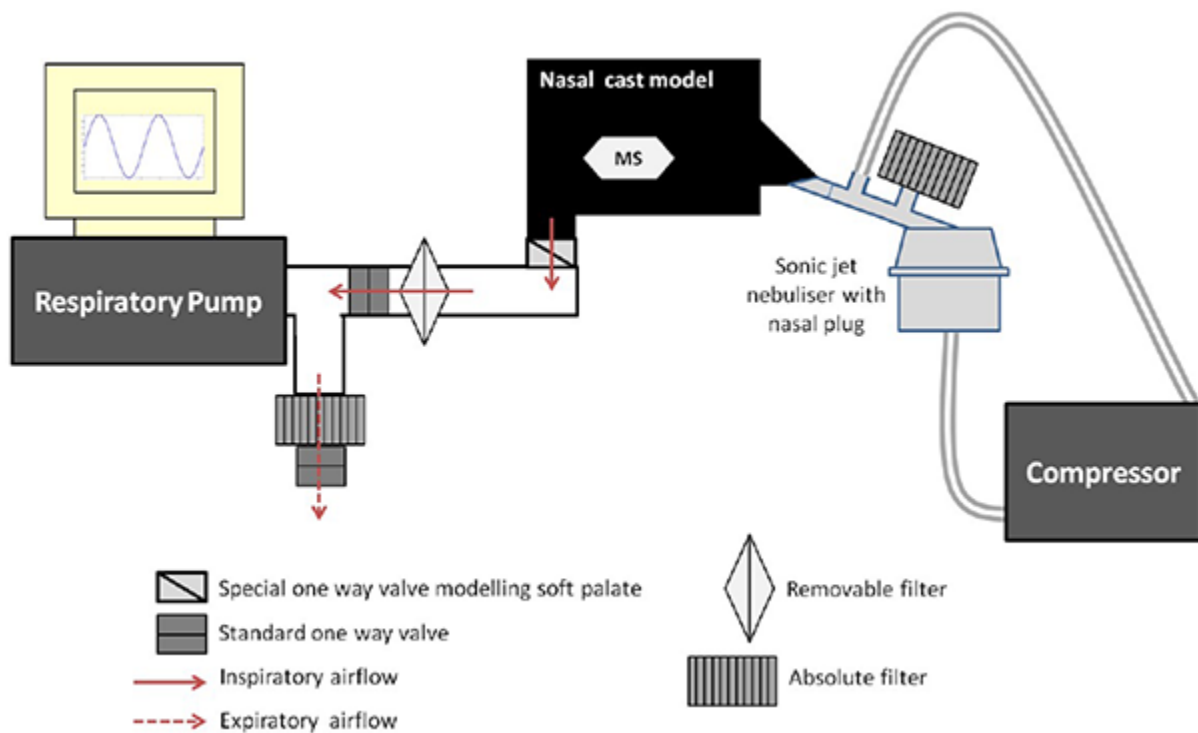


Figure 50 - Exemple d'un banc d'essai utilisant une réplique imprimée en trois dimension pour l'évaluation des dépôts d'aérosol, d'après (Leclerc et al. 2014a).

Les modèles cellulaires sont utilisés depuis maintenant plusieurs décennies pour étudier la PD d'un PA lorsqu'il est mis en contact avec les cellules. Certains phénomènes de PK peuvent être étudiés, tels que l'absorption au travers d'un tapis de cellules épithéliales ou les mécanismes de métabolisation. Initialement, les cellules étaient cultivées lignées par lignées, afin d'étudier l'effet d'un aérosol sur chacune. Cependant, cette méthode s'est révélée biaisée, car des différences ont été constatées, en termes de morphologie, de métabolisme ou de polarisation, entre les cellules en monoculture et les cellules observées *in situ* en histologie. C'est alors que sont apparus des modèles de co-culture intégrant deux lignées cellulaires ou plus. Toutefois, ces modèles restent limités, car les cellules sont immergées, ce qui n'est pas physiologique pour ces cellules dont la face apicale est exposée à l'air. De plus, dans les cultures immergées, la mise en contact des cellules avec l'aérosol se fait soit en déposant l'aérosol à la surface du milieu de culture cellulaire soit en dissolvant le PA dans ledit milieu. C'est de ce constat que sont apparus les systèmes ALI (« air-liquid interface »), qui permettent de déposer directement l'aérosol sur le tapis cellulaire, *via* des systèmes de nébulisation dédié comme le Vitrocell Cloud (Figure 51) (Buckley et al. 2011; de Souza Carvalho et al. 2014; Hittinger et al. 2017; Hiemstra et al. 2018; Ehrmann et al. 2020).

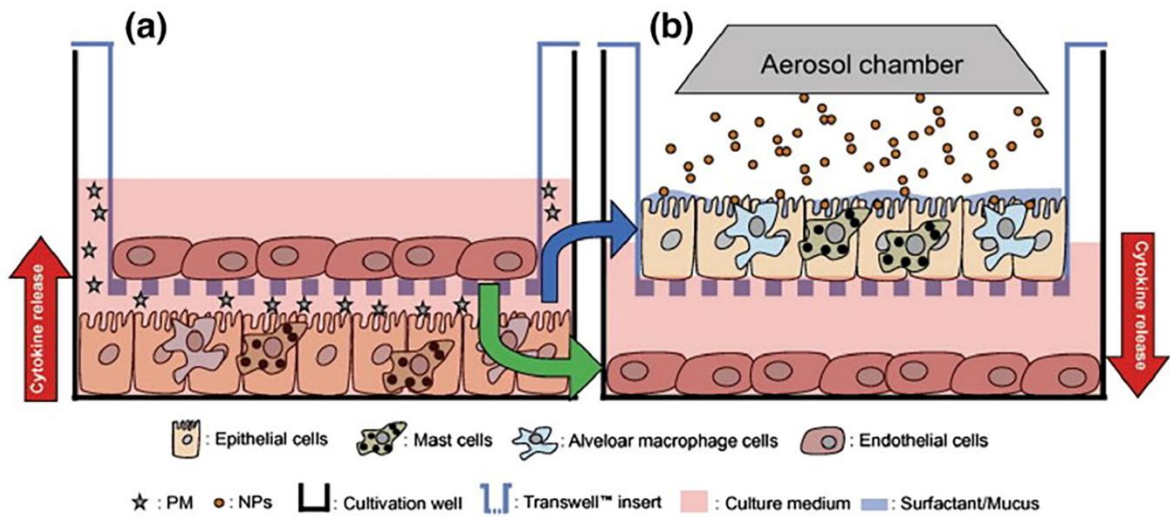


Figure 51 - Représentation schématique d'un système ALI, d'après (de Souza Carvalho et al. 2014).

Les systèmes de culture les plus récents et les plus complexes ont été développés en capitalisant sur les systèmes ALI et en essayant d'y adjoindre plus de biomimétisme. En effet, du fait de la finesse de la barrière alvéolo-capillaire, les cellules sont en contact avec de l'air sur leur face apicale et sont directement posées sur la membrane basale, elle-même en contact avec l'endothélium des capillaires pulmonaires. Ainsi, elles sont soumises de part et d'autre à des pressions, gazeuse d'un côté et liquidienne de l'autre. C'est de ce design que sont inspirés les « lung-on-chip » qui ont pour but recréer la barrière alvéolo-capillaire (Figure 52) (de Souza Carvalho et al. 2014; Hittinger et al. 2017; Hiemstra et al. 2018; Artzy-Schnirman et al. 2019).

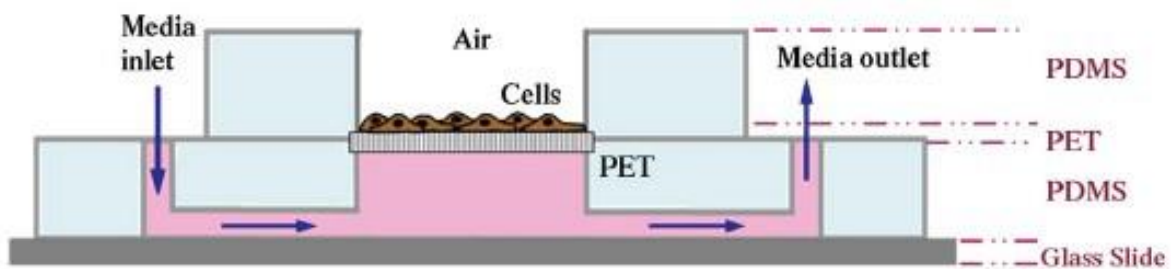


Figure 52 - Représentation schématique d'un « lung-on-chip », d'après (de Souza Carvalho et al. 2014).

Le tableau ci-dessous présente les avantages et les limitations des modèles *in vitro* d'étude des dépôts d'aérosol.

Tableau 11 - Comparaison des modèles *in vitro*, d'après (de Souza Carvalho et al. 2014; Upadhyay et Palmberg 2018; Ehrmann et al. 2020).

Modèles	Avantages	Limitations
<i>Impaction en cascade</i>	Réglementaire Facile à mettre en place et à utiliser Comparaison DM et formulation	Estimation des dépôts empiriques
<i>Bancs d'essais</i>	Facile à mettre en place et à utiliser Comparaison DM et formulation Standardisation des débits ventilatoires	Débits peuvent induire des biais (surtout pour les DPI) Biomimétisme des répliques Standardisation des débits ventilatoire ne prend pas en compte l'état physiopathologique
<i>Cultures cellulaires immergées</i>	Coût-efficient	Biomimétisme de l'épithélium respiratoire Dose déposée difficilement estimable/comparable avec la réalité Adjonction au milieu de culture peuvent créer des biais
<i>Cultures ALI</i>	Biomimétisme de l'épithélium respiratoire Dépôts de PA biomimétique (particule et gaz) Dose contrôlée	Coûteux Long Difficile à mettre en place Pas de particules > 5 µm
« <i>Lung-on-chip</i> »	Perfusion Biomimétisme	Faible débit du milieu de culture cellulaire Coûteux Difficile à mettre en place et à utiliser

4. Apports et limites des modèles *in vivo*

Les modèles *in vitro* sont complémentaires des modèles *in vivo*, car ils permettent d'étudier certains des phénomènes majeurs consécutifs à l'administration d'un aérosol. Cependant, la complexité d'un organisme complet est impossible à appréhender par l'*in vitro*. C'est pourquoi

les modèles *in vivo* restent, à l'heure actuelle, nécessaires pour comprendre le devenir de particules inhalées dans l'organisme. En théorie, le meilleur modèle *in vivo* disponible pour étudier les dépôts d'aérosols serait l'être humain. Cependant, même si de tels essais réglementaires sont obligatoires pour la mise sur le marché d'un produit de santé, les raisons éthiques évidentes, renforcées par des textes législatifs, limitent la possibilité d'expérimentation sur la personne humaine. En outre, les techniques utilisées pour l'évaluation des dépôts d'aérosols étant considérées comme risquées ou invasives, le recrutement de patient reste limité à quelques individus par les autorités de santé et les comités de protection des personnes. À titre d'exemple, l'équipe de Rissler *et al.* s'est intéressée aux dépôts d'aérosols environnementaux, qui est une préoccupation de santé publique à l'échelle mondiale. Leur étude, publiée en 2017, comptait un effectif de 67 personnes, ce qui est considérable pour ce type d'étude (**Rissler et al. 2017**). À titre de comparaison, en 2017, Dugernier *et al.* publiaient une étude sur la comparaison de deux nébuliseurs pour l'administration à travers des canules nasales à haut débit d'O₂, qui est sujet d'intérêt dans les services de réanimation. L'effectif de cette étude était de 6 patients (**Dugernier et al. 2017**). Enfin, en 2019, Reychler *et al.* ont pu recruter 6 patients pour une étude portant sur l'impact de la position du nébuliseur sur les dépôts d'aérosol (**Reychler et al. 2019**).

Compte tenu de ces limitations, les expérimentations *in vivo* sur animaux semblent être une alternative intéressante. Cependant, l'une des premières limites, et la plus importante, à ce genre d'étude est l'éthique de l'expérimentation animale. En 1959, Russel et Burch introduisent le principe des 3R (**National Center for Replacement, Reduction and Refinement of Animal Research 2018**). Au cours du temps, ce concept s'est développé et est de plus en plus présent de nos jours (**Fenwick et al. 2009; Hughes et Health 2019; NIH 2019**). Il consiste à réduire les souffrances animales non nécessaires à l'aide de trois grands principes :

- **Remplacer** (Replace) autant que possible les modèles animaux par des modèles alternatifs, principalement par des modèles *in vitro* ou *in silico* mais lorsque cette substitution est impossible par l'utilisation d'espèce moins à même de ressentir les effets de cette expérimentation (poissons, insectes, mollusques, ...).
- **Réduire** (Reduce) à un strict minimum le nombre d'animaux utilisés, bien souvent par le calcul d'un nombre de sujet nécessaire en vue de l'effet escompté. En outre, lorsque cela est possible, il est demandé de ne pas sacrifier les animaux (animaux contrôles, études non invasives, pathologies non terminales).
- **Raffiner** (Refine) le plus possible la méthodologie utilisée d'une part en minimisant les biais qui pourraient conduire à la nécessité de reconduire l'étude mais aussi en choisissant des critères d'interruption de l'étude et des critères de jugements qui permettent la minimisation de la souffrance animale.

Les concepts des 3R et de l'éthique de l'expérimentation animale ont été intégrés dans les textes législatifs (directive n°2010/63/EU) et sont respectés à l'échelle internationale.

Lorsque l'expérimentation animale est nécessaire, le choix de l'espèce animale qui sera le support de l'étude est un paramètre crucial, car les données générées doivent être extrapolables à l'espèce humaine. Il est alors intéressant de se tourner vers la physiologie et l'anatomie comparées, afin de choisir l'espèce la plus pertinente. Ainsi, les espèces mammifères représentent un choix intéressant. Les espèces les plus utilisées pour la recherche en aérosol sont le macaque, la souris, le rat, le porc, le mouton et le lapin.

Rongeurs et lagomorphes

Les espèces de rongeurs et de lagomorphes sont utilisées du fait de leur élevage aisé, du contrôle possible de leur génome permettant de développer des modèles pathologiques, des coûts d'entretien relativement faibles qu'ils représentent et, enfin, pour leur maniabilité. Leur respiration est exclusivement nasale, ce qui limite l'utilisation d'interface et nécessite l'utilisation de dispositifs particuliers pour l'administration des aérosols, qui outrepassent les VAS (instillation intra-trachéale) ou qui délivrent l'aérosol dans l'environnement de l'animal (dispositifs corps entier ou « nose only »). En outre, l'anatomie du tractus respiratoires, par rapport à celui de l'être humain, présente des sections plus faibles et plus courtes (Tableau 12), ce qui représente une limite pour la taille des particules respirables et diminue les phénomènes d'impaction. À l'inverse, en termes de proportions, les VAS occupent une surface plus importante et présentent un trajet plus tortueux ce qui augmente les phénomènes de dépôts dans cette région anatomique (**Guillon et al. 2013; Harkema 2015; Reece 2015**). En outre, il existe des différences de proportion dans la composition cellulaire de l'épithélium respiratoire, ce qui peut induire des différences dans les phénomènes de dépôts d'aérosol et d'absorption pulmonaire de l'aérosol déposé (**Brown 2015; Mercer et Crapo 2015; Plopper et Hyde 2015; Reynolds et al. 2015**). Enfin, la position quadrupède des rongeurs et lagomorphes peut impacter de manière significative les dépôts d'aérosol (**Brown 2015**).

Tableau 12 - Anatomie comparée de la structure du tractus respiratoire, d'après (Peake et Pinkerton 2015).

	Être humain	Macaque	Rongeurs	Cochon
Plèvre	Épaisse	Fine	Fine	Épaisse
Tissu conjonctif interlobaire	Étendu, peut entourer plusieurs lobules	Petit	Si présent, petit	Étendu, peut entourer plusieurs lobules
Bronchioles non respiratoires	Plusieurs générations, prolongées par les bronchioles respiratoires	Quelques générations, dont une seule prolongée en bronchioles respiratoires	Plusieurs générations prolongées en conduits alvéolaires (ou quelques bronchioles respiratoires, très courtes)	Plusieurs générations prolongées en conduits alvéolaires (ou quelques bronchioles respiratoires, très courtes)
Bronchioles respiratoires	1 à 3 générations	Plusieurs générations	Absente ou 1 seule courte génération	Absente ou 1 seule courte génération

La physiologie respiratoire des rongeurs et lagomorphes présente aussi des différences importantes avec l'être humain. Ainsi, leur fréquence respiratoire est 10 à 15 fois supérieure pour des VC plus faibles d'un facteur 200 à 400. Ces différences sont à même de générer des différences majeures dans les dépôts pulmonaires (Tableau 13). En outre, les résistances des voies aériennes sont très supérieures aux valeurs humaines, d'un facteur 200 à 400 chez la souris, d'une facteur 40 à 80 chez le rat et d'un facteur 5 à 10 chez le lapin (Figure 53) (**Guillon et al. 2013; Bates 2015; Hazari et Farraj 2015**).

Tableau 13 - Comparaison des paramètres respiratoires de base chez différents mammifères, d'après (Guillon et al. 2013; Hazari et Farraj 2015).

Espèces	VC (mL)	MV (L/min)	Fréquence (cycle/min)
Homme (77,8 kg)	426	8,7	14,7
Macaque (2 – 3 kg)	250 – 270	0,31 – 1,41	31 – 52
Rat (0,300 – 0,305 kg)	1,32 – 2,05	0,172 – 0,209	103 – 130
Souris (0,020 kg)	0,74	0,011 – 0,036	84 – 230
Porc (25 kg)	286	6	15 – 24

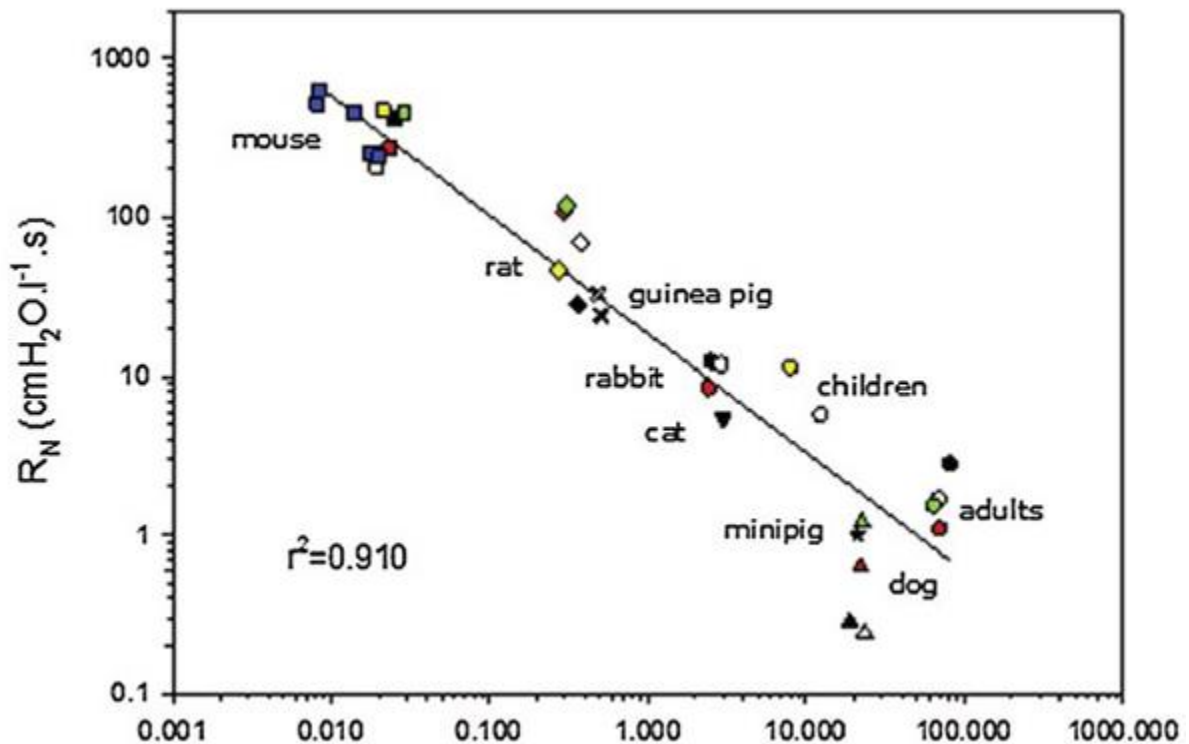


Figure 53 - Résistances des voies aériennes pour plusieurs espèces de mammifères en fonction du poids corporel, d'après (Bates 2015).

Macaque

Le macaque appartient à la catégorie des primates non humains. Étant donné sa proximité évolutive et anatomique avec l'être humain, il est possible d'administrer des aérosols en position verticale, à l'aide d'interfaces adaptées mais qui peuvent engendrer des pertes d'aérosol. Lorsque la coopération de l'animal n'est pas obtenue, il est nécessaire de le sédaté. Ce faisant, des biais peuvent apparaître par modification du profil respiratoire. Comparativement à d'autres espèces de mammifères, l'architecture du tractus respiratoire est proche de celle de l'être humain, exception faites des VAS qui sont, aussi, plus tortueuses et importantes (**Guillon et al. 2013; Harkema 2015; Reece 2015**). En termes de d'anatomie et de physiologie respiratoire, le macaque est plus proche d'un enfant que d'un adulte, du fait de sa petite taille (Tableau 12 & Tableau 13). La composition cellulaire de l'épithélium reste relativement proche de celle de l'être humain (**Brown 2015; Mercer et Crapo 2015; Plopper et Hyde 2015; Reynolds et al. 2015**).

De manière générale, les avantages et limites des modèles macaques sont similaires à ceux des rongeurs et lagomorphes, exception faite des structures anatomiques qui sont plus proches de celles utilisées de l'être humain. En outre, les primates non humains sont moins sensibles à l'insufflation des volumes d'air.

Porc

Les porcs représentent des modèles animaux très utilisés en aérosolthérapie, particulièrement en ventilation mécanique (**Goldstein 2005; Lu et al. 2010; Manunta et al. 2013**). L'anatomie des VAS n'est, cependant, pas compatible avec des administrations d'aérosol en ventilation spontanée (**Guillon et al. 2013; Harkema 2015; Reece 2015**). L'anatomie du tractus respiratoire porcin présente des similitudes et des disparités par rapport à l'être humain. Alors que la plèvre et le tissu conjonctif interlobaire sont semblables à ceux de l'être humain, les bronchioles respiratoires et non respiratoires sont plus proches de celles des rongeurs (Tableau 12). Le reste de l'arbre trachéobronchique est, lui, similaire à celui de l'être humain. En outre, il est important de noter que la partie crâniale du lobe supérieur droit est directement abouchée sur la trachée par le biais d'une bronche trachéale (**Pinkerton et al. 2015**). La composition de l'épithélium respiratoire du porc est l'une des plus proche de celle de l'être humain, avec des proportions très similaires des différents types cellulaires (**Brown 2015; Mercer et Crapo 2015; Plopper et Hyde 2015; Reynolds et al. 2015**). La physiologie respiratoire du porc est aussi très proche de celle de l'humain avec des VC, des MV et des résistances très comparables (Tableau 13 & Figure 53).

L'intérêt du porc dans la recherche en aérosolthérapie est notable de par sa grande similarité avec l'être humain. Cependant, son utilisation en expérimentation animale représente un coût particulièrement important en termes d'équipements et d'infrastructures nécessaires, qui doivent être compatibles avec ces animaux imposants. Par conséquent, de nombreuses études sont menées sur le jeune porcelet, ce qui diminue la proximité anatomique et physiologique par rapport à l'être humain adulte. En outre, leur manipulation nécessite des techniciens spécialisés. Enfin, peu d'élevage produisent des porcs pour l'expérimentation animale, l'intérêt de ces derniers étant plus importants dans l'industrie agro-alimentaire.

Malgré les considérations éthiques et financière, les modèles animaux *in vivo* restent, actuellement, une nécessité dans la recherche préclinique en aérosolthérapie. Cependant, leur utilisation est génératrice de biais qui doivent être impérativement pris en compte, afin de permettre la génération de données robustes et pertinentes pour être extrapolables à l'être humain (**Phalen et al. 2008**).

5. Apports et limites des modèles *ex vivo*

Les modèles *ex vivo* sont moins connus que les autres modèles pour l'étude préclinique des dépôts intrathoraciques d'aérosols. Un des premiers modèles *ex vivo* développé utilisait des poumons isolés de lapins. Après exsanguination, les poumons et le bloc cardiaque étaient prélevés, puis canulés. La perfusion sanguine était assurée par le biais d'une pompe à flux

laminaire, tandis qu'une ventilation mécanique était mise en place par le biais d'un respirateur dédié à l'expérimentation animale. Ce modèle fut utilisé pour étudier la PK de l'isoprénaline et de ses prodrogues. Cependant, la complexité de ce modèle et les compétences requises pour le faire fonctionner n'ont pas permis sa démocratisation (**Brazzell et al. 1982**). Toutefois, une dizaine d'années plus tard Seeger *et al.* réutilisèrent ce modèle pour étudier la physiopathologie vasculaire du SDRA, sans utilisation d'aérosol (**Seeger et al. 1994**). Ce sont Beck-Broichsitter *et al.* qui réutiliseront ce modèle, 15 ans plus tard, pour étudier la faisabilité de l'aérosolisation de nanoparticules et leurs dépôts pulmonaires, ainsi que la PK associée (**Beck-Broichsitter et al. 2009**). Cependant, ce modèle reste très peu utilisé. Une variante de ce modèle, adaptée pour des poumons de rat, a été développée et utilisée pour l'évaluation des dépôts d'un aérosol issu d'un DPI et l'effet de plusieurs formulations de poudres (**Ewing 2010**). Bien que ces modèles présentent un intérêt notable, ils n'ont pas été pérennisés. En outre, l'extrapolation des données générées avec ces modèles reste compliquée du fait des différences anatomiques et physiologiques existantes avec l'être humain, particulièrement dans le cas du modèle murin.

Un autre modèle *ex vivo* basé sur l'utilisation d'un poumon de porc plastiné, distribué par la compagnie Nasco, a été publiée en 2015 par Morozov *et al.* L'étude réalisée visait à étudier les dépôts de différents aérosol de taille micro- et nanométriques (**Morozov et Kanev 2015**). Bien que le design de l'étude semble intéressant, celle-ci souffre de biais étant donné le type de poumon utilisé (poumon droit plastiné) et l'administration de l'aérosol.

Ainsi, le premier modèle *ex vivo* par ventilation passive pour les études précliniques de dépôts intra-thoracique d'aérosol a été développé par Perinel *et al.*, lors de sa thèse au sein de notre laboratoire. Ce modèle se compose d'un tractus pulmonaire porcin placé dans une enceinte étanche. La ventilation spontanée est générée grâce à un générateur de dépression, créant des pressions négatives dans l'enceinte, afin de mimer la dépression intra-pleurale. Une réplique humaine des VAS, dans un premier temps plastinée puis stéréolithographiée, complète le modèle, lui apportant un biomimétisme satisfaisant pour l'étude des dépôts d'aérosol (Figure 54). Le profil respiratoire du modèle, réglable grâce aux générateurs de dépression, permet de générer une grande variété de modes ventilatoires (**Perinel et al. 2016, 2017**). Ce modèle *ex vivo* a également été appliqué à l'étude de dépôts pulmonaires d'un bioaérosol bactérien de *Legionella pneumophila* (**Perinel et al. 2018**).

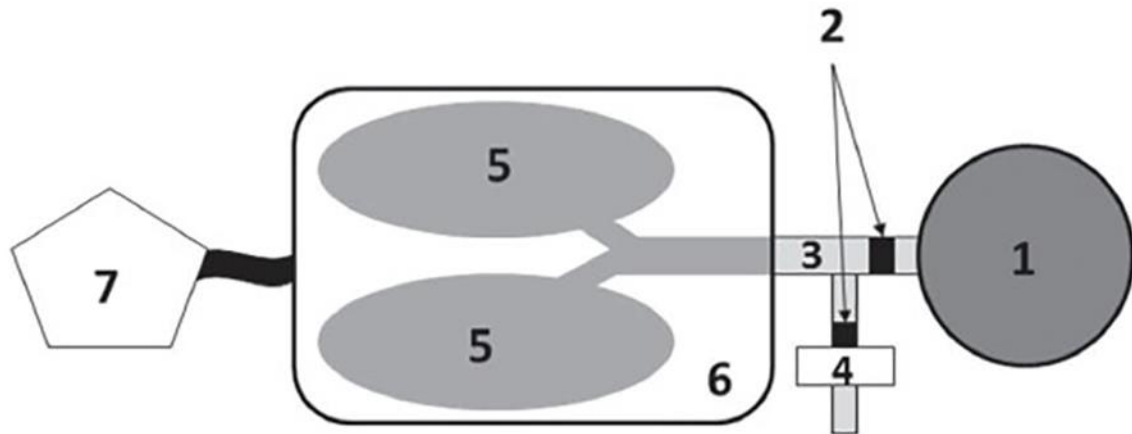


Figure 54 - Représentation du modèle préclinique ex vivo développé par (Perinel et al. 2017). 1 : Réplique de tête humaine. 2 : valve à sens unique. 3 : tube plastique. 4 : filtre expiratoire. 5 : tractus pulmonaire porcine. 6 : enceinte instrumentée. 7 : générateur de dépression.

Ce modèle innovant présente, cependant, des limitations qui sont génératrices de potentiels biais dans l'étude des dépôts pulmonaires. La position du modèle, en décubitus dorsal, diminue la pénétration de l'aérosol dans le poumon. L'absence de cage thoracique ne permet pas de stabiliser les volumes pulmonaires en fin d'expiration, ces derniers ne dépendant que des propriétés mécaniques intrinsèques du tractus respiratoire utilisé, qui sont soumises à des variations inter-individuelles. Ainsi, des phénomènes d'hyperinflation peuvent être observés, générant des inégalités régionales de la ventilation. Enfin, ce modèle représente un sujet adulte sain et ne permet donc pas d'étudier les spécificités des dépôts d'aérosol dans les pathologies pulmonaires ou chez des patients pédiatriques.

Cependant, les avantages apportés par ce modèle, tels que sont faible coût, sa facilité d'utilisation, l'absence de restrictions éthiques du fait de l'utilisation de tractus respiratoires porcins collectés dans des abattoirs (donc des déchets de l'alimentation humaine) et son biomimétisme de la ventilation spontanée chez l'adulte humain font de ce modèle un outil préclinique d'intérêt pour la cartographie précise des dépôts d'aérosols.

Partie 2

Objectifs et méthodologie utilisée

Objectifs du travail de thèse

Les différents modèles précliniques d'étude des dépôts d'aérosols semblent complémentaires, les avantages des uns palliant les limites des autres. Le choix d'un type de modèle par rapport à un autre est motivé par la finalité des études à mener.

Toutefois, peu de modèles d'utilisation simple, présentant de faibles coûts associés, ayant un biomimétisme suffisant, en termes de modélisation de l'anatomie et de la ventilation humaine (saine ou pathologique), et ne présentant que peu de restrictions éthiques existent actuellement.

À la lumière des éléments présentés dans l'Introduction ce travail de thèse consiste à capitaliser sur les compétences acquises au sein du laboratoire lors du développement du modèle préclinique *ex vivo* porcin. L'obtention d'une bourse ANR JCJC, grâce aux connaissances et compétences développées au sein du laboratoire, a permis le financement de ce travail de thèse. Ce projet ANR AMADEUS (Anatomical Models to study Aerosol DELivery to the lUngS for obstructive diseases) repose sur les difficultés inhérentes à l'obtention de la cartographie précise des dépôts lors du développement préclinique d'un nouveau DM/PA. L'objectif de ce projet est, ainsi, d'améliorer le modèle préalablement développé pour en réduire les biais et de le diversifier en le « pathologisant » pour accroître son biomimétisme.

L'objectif sous-tendant la totalité de ce travail est la mise à disposition d'un panel de modèles *ex vivo* pathologiques et sains, dans le but d'accélérer et de faciliter les études de cartographie des dépôts d'aérosols. Le Tableau 14 présente la segmentation initiale du projet, qui se propose de développer deux modèles de pathologies obstructrices, la bronchiolite chez le patient pédiatrique et la bronchopneumopathie chronique obstructive chez le patient adulte, et de comparer ces modèles pathologiques à leur équivalent sain. Le but est, ainsi, d'étudier la pertinence de ces modèles pour les proposer en tant qu'outil pour l'accélération du développement de nouveaux DM d'aérosolthérapie.

Tableau 14 - Organisation initiale du projet AMADEUS, tel que proposé dans le dossier d'ANR.

WORK PACKAGE	MAIN DELIVERABLES
<p>WP1: Development of pediatric chimeric models</p>	<p>Task 1.1: Development of infant upper airways replica by 3D printing connected to <i>ex vivo</i> rabbit pulmonary tract ventilated artificially by passive expansion</p> <p>Task 1.2 and 1.3: Physiological validation of the pediatric chimeric model including: (i) measurement of pleural depressions and tidal volumes for different conditions (task 1.2) and determination of lung ventilation by ^{81m}Krypton scintigraphy (task 1.3)</p>
<p>WP2: From healthy to obstructive respiratory conditions</p>	<p>Task 2.1: Development of an “infant” chimeric model mimicking bronchiolitis</p> <p>Task 2.2: Development of an “adult” chimeric model mimicking COPD</p>
<p>WP3: Relevance of chimeric models for aerosol deposition studies</p>	<p>Task 3.1: Regional aerosol deposition in the “adult” chimeric model (healthy versus COPD respiratory conditions, two interfaces for inhalation mask versus mouthpiece)</p> <p>Task 3.2: Regional aerosol deposition in the “infant” chimeric models (healthy versus bronchiolitis respiratory conditions)</p>

Fort de ces objectifs ambitieux, ce projet a évolué et a été modifié pour mieux s’adapter à la réalité du projet et à l’implication des parties prenantes. Ainsi, ce travail de thèse se découple en deux axes principaux, composés de différents « work packages » (Tableau 15).

Tableau 15 - Tableau récapitulatif des axes de recherches de ce travail de thèse.

Axes	Work packages	Avancement/valorisation
Développement de nouveaux modèles précliniques ex vivo pathologiques	Modèle ex vivo pédiatrique de dysplasie bronchopulmonaire (BPD) en ventilation spontanée	1 article publié 1 présentation en congrès international
	Modèle ex vivo adulte d'IPF en ventilation spontanée	1 article publié 1 poster en congrès international
	Modèle ex vivo adulte en ventilation mécanique invasive	1 article publié
	Modèle ex vivo adulte de COPD en ventilation spontanée	Article en cours de rédaction
	Modèle ex vivo adulte perfusé en ventilation mécanique invasive	Expériences préliminaires réalisées
	Recherche d'une position optimale pour les nébuliseurs sur les circuits de ventilation en ventilation mécanique invasive	1 article en cours de rédaction 1 présentation en congrès international
Applications thérapeutiques des modèles précliniques ex vivo	Faisabilité de l'aérosolisation de nanoparticules théranostiques pour une extension d'indication thérapeutique par étude des dépôts pulmonaires en imagerie multimodale	1 article publié 1 présentation en congrès national
	Développement et optimisation d'une méthodologie pour l'acquisition et la quantification des dépôts pulmonaires d'un aérosol par MRI	1 article publié 1 présentation en congrès international
	Cartographie des dépôts pulmonaires des émissions de cigarette électronique	1 article publié 1 présentation en congrès international
	Recherche de solutions pour l'aérosolisation de PA bronchodilatateurs par une cigarette électronique	Données préliminaires obtenues permettant la mise en place d'une thèse dédiée au sujet

Matériels et méthodes

La Figure 55 présente le modèle *ex vivo* actuel, basé sur le modèle *ex vivo* initial et amélioré pour permettre le suivi en temps réel des débits ventilatoires et des dépressions au sein de l'enceinte instrumentée. Brièvement, ce modèle se compose :

- D'une réplique de tête humaine avec structures laryngées d'un sujet sain féminin reconstruite à partir de coupes scanographiques, effectuées sur prescription médicale et avec consentement de la patiente, et produite par stéréolithographie. L'anatomie de chaque réplique a été validée par une médecin radiologue sénior.
 - « Coco » : réplique anatomique complète des VAS d'un sujet adulte féminin sain de 28 ans
 - « Lola » : réplique anatomique complète des VAS d'un sujet pédiatrique féminin sain de 9 ans
 - « Arthur » : réplique anatomique complète des VAS d'un sujet pédiatrique masculin sain de 2 ans
 - « Chucky » : réplique anatomique complète des VAS réalisée à partir du « SAINT model » (**Janssens et al. 2001**)
- D'un système de raccords connectant l'extrémité distale des structures laryngées à un tube transmural sur l'enceinte
- D'un tractus respiratoire porcin placé dans l'enceinte instrumentée étanche
- D'un générateur de dépression créant des pressions négatives imitant les dépressions intra-pleurales (SuperDimension®, Covidien, Dublin, Irlande)
- D'une instrumentation permettant le suivi en temps réel des débits ventilatoires à la tête et des dépressions à l'intérieur de l'enceinte (Biopac®, Biopac, Goleta, États-Unis d'Amérique)

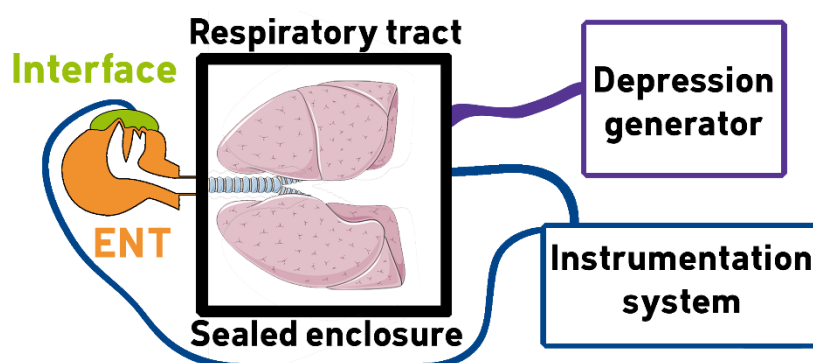


Figure 55 - Représentation schématique du modèle préclinique ex vivo actuel. ENT : réplique de tête humaine par stéréolithographie. Interface : embout buccal ou masque naso-buccal en fonction des besoins.

1. Collecte et traitement des tractus respiratoires

Les tractus respiratoires de porc et d'agneaux sont gracieusement fournis par un abattoir local, propriété du groupe Despinasse Viandes (La Talaudière, France). Les cages thoraciques de lapin, contenant les structures cardio-pulmonaires et le diaphragme ont été gracieusement fournies par la boucherie Rouget Volailles (La Talaudière, France). Ces pièces sont, en tant que telles, considérées comme des déchets de l'industrie agro-alimentaire. Ce faisant, elles satisfont à toute la réglementation de sécurité sanitaire française au moment de leur collecte. Leur utilisation ne nécessite pas d'autorisation spécifique.

Lors de leur récupération, les tractus respiratoires sont soumis à une étape de dissection, à une étape de réparation des plaies et, enfin, à une bronchoscopie. Avant tout ce processus de préparation, une observation visuelle de l'état des structures pulmonaires est réalisée pour exclure les tractus présentant des atteintes qui seraient incompatibles avec leur utilisation (plaies profondes du parenchyme pulmonaire, plaies sur des bronches de calibres importants, plaies trachéales à proximité immédiate de la carène ou des bronches souches, ...).

Dissection des tractus respiratoires de porc et d'agneaux

Lors de leur extraction du thorax des animaux, les tractus respiratoires présentent encore des reliquats de structures cardio-vasculaires, diaphragmatiques et œsophagiennes, voire hépatiques dans le cas des tractus respiratoires d'agneaux. En outre, les structures laryngées sont elles aussi présentes.

Ces structures sont soigneusement ôtées à l'aide d'instruments de chirurgie, afin de ne conserver que les structures respiratoires. La partie médiastinale de la plèvre est sectionnée, sans mise à nue du parenchyme pulmonaire, afin de faciliter la mobilisation des lobes inférieurs. Les structures cardiaques (reliquats ventriculaires, auriculaires et péricardiques) et les structures vasculaires (crosse aortique, aorte thoracique et veines pulmonaires) sont excisées de manière conservative pour éviter la mise à nue des structures vasculaires pulmonaires. La trachée est sectionnée au niveau de la partie distale des structures laryngées et est, ensuite, recoupée pour obtenir une longueur trachéale d'environ 15 cm. L'œsophage est ôté sur toute sa longueur (Figure 56).

Ces étapes de dissection permettent d'obtenir des poumons « nus » à même d'être aisément manipulés.

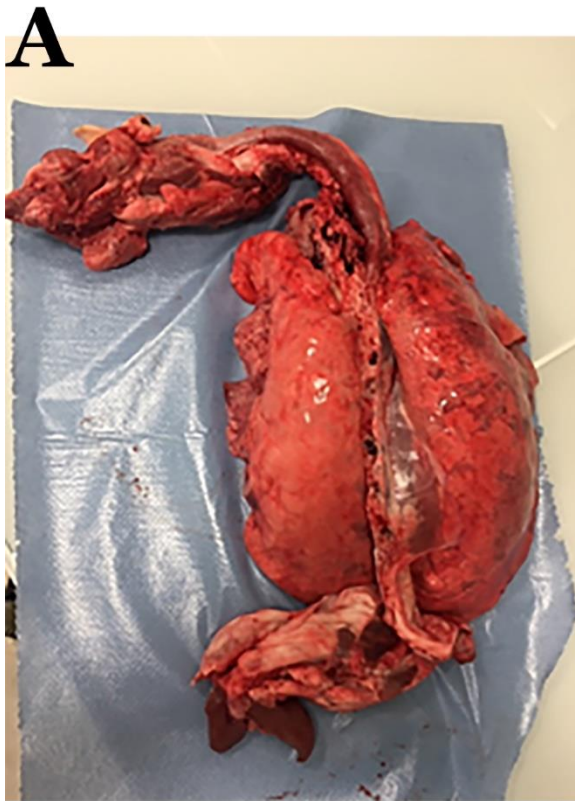


Figure 56 - Images d'un tractus respiratoire porcin avant (A) et après (B) l'étape de dissection.

Réparation des plaies pulmonaires

Lors de leur extraction du thorax dans l'abattoir, les tractus respiratoires sont lésés par les couteaux des opérateurs, créant des plaies pulmonaires, parenchymateuses et/ou bronchiques, diverses, qui doivent être réparées pour minimiser les fuites créées par les lésions.

Les plaies sont catégorisées en plaies superficielles, d'une profondeur inférieure à 2 cm, et en plaies profondes. Les plaies superficielles d'une longueur inférieure à 4 cm sont suturées par des points simples, espacés d'environ 0,8 cm, verrouillés par des nœuds plats. Les plaies superficielles de longueur plus importantes sont suturées par des surjets simples ou en X dont les points sont espacés d'environ 0,8 cm. Lorsque des plaies profondes ne sectionnent pas de structures bronchiques de calibre supérieur à 5 mm, elles sont réparées par un surjet simple en X sur le plan profond et d'un second surjet sur le plan superficiel. Les surjets sont serrés et verrouillés par des nœuds plats. Le serrage des sutures doit mettre en contact les marges de la plaie sans réaliser de pression trop importante sous peine de déchirure du parenchyme lors de la ventilation. Les plaies bronchiques, lorsque le calibre est compris entre 1 et 5 mm, sont ligaturées par des nœuds simples.

Les plaies présentes sur les languettes pulmonaires, lorsqu'elles sont trop conséquentes ou irréparables, induisent l'exclusion de la languette concernée au moyen d'une boucle circulaire

serrée et verrouillée par des nœuds plats. L'exclusion est validée lors de la ventilation du tractus.

Enfin, certaines plaies, de petite taille, ne pouvant être suturées ou ligaturées sont obstruées à l'aide de colle à base de cyanoacrylates.

À la suite de cette étape de réparation des plaies pulmonaires, les poumons sont nettoyés sur leur face externe et humidifiés par immersion dans l'eau, en prenant soin de ne pas immerger la trachée. Ils sont, ensuite, pesés et identifiés par un numéro de série.

Ventilation et bronchoscopie des tractus pulmonaires

Les tractus respiratoires sont placés dans une enceinte étanche. La trachée est connectée à un tube transmural pour permettre leur abouchement sur l'environnement extérieur. Un raccord transmural, sur la paroi opposée, permet la connexion entre l'enceinte et le générateur de dépression SuperDimension® (Covidien, Dublin, Irlande). Ce dernier génère des pressions négatives cycliques à l'intérieur de l'enceinte, afin de mimer les dépressions intrapleurales, permettant la ventilation passive des poumons, simulacre de respiration spontanée chez l'être humain. La valeur des pressions négatives et les paramètres de cyclisation (temps inspiratoires et expiratoires) sont réglés pour simuler différents profils respiratoires. La ventilation est évaluée à l'œil nu. Il convient de s'assurer du recrutement de tous les lobes pulmonaires.

Chaque tractus respiratoire subi, ensuite, une bronchoscopie à l'aide d'un bronchoscope Bronchoflex® et d'une tablette d'acquisition vidéo SCREENi® (Axess Vision, Joué-les-Tours, France). L'objectif est, ici, de nettoyer l'arbre trachéobronchique. En effet, suite à la mise à mort des animaux, il est fréquent d'observer la présence de caillot ou de contenu gastrique. En outre, des bouchons muqueux peuvent apparaître dans l'arbre trachéobronchique. Il convient, ici, de s'assurer, de manière la plus exhaustive possible, de la levée de toutes les obstructions proximales, totales ou partielles, qui pourraient modifier le profil respiratoire ou les dépôts d'un aérosol.

Stockage et conservation des tractus pulmonaires

En fonction de la disponibilité des tractus respiratoire et des expérimentations prévues, les tractus respiratoires peuvent être utilisés « frais » dans les 24h suivant leur préparation. Ils sont alors conservés à 4°C dans un environnement humide. Lorsqu'une conservation à plus long terme est nécessaire, les tractus sont, alors, conservés à -20°C. Avant utilisation, ils seront décongelés à température ambiante pendant au moins 8h et, ensuite, stockés à 4°C jusqu'à la réalisation de l'expérimentation.

2. Collecte des données physiologiques

Les données physiologiques des tractus respiratoires sont collectées à l'aide du système Biopac® (Biopac, Goleta, États-Unis d'Amérique), qui se compose d'un système d'acquisition MP160, d'un pneumotachographe TSD117 connecté à la réplique de tête humaine et d'un capteur de pression différentielle TSD160D connecté à l'enceinte.

Les données sont collectées avec le logiciel propriétaire AcqKnowledge 5.0 (Biopac, Goleta, États-Unis d'Amérique), qui permet l'acquisition et le traitement des données (débits ventilatoires à la tête et pressions internes de l'enceinte). Le système Biopac® est calibré avant chaque acquisition, d'une durée de 4 minutes. La première minute, correspondant à l'équilibration des poumons, est exclue lors du traitement des données. Ainsi, un minimum de 40 cycle respiratoire sont collectés à chaque acquisition.

Les courbes de débit et de pression obtenues sont, ensuite, traitées pour permettre calcul de différents marqueurs respiratoires (temps respiratoires, fréquence respiratoire, volume courant, ventilation-minute, résistances des voies aériennes et compliance pulmonaire). Ces marqueurs sont obtenus pour chaque cycle respiratoire et sont, ensuite, présentés sous forme de moyenne \pm écart-type.

3. Évaluation de l'homogénéité de la ventilation et cartographie des dépôts d'aérosols

Ces deux évaluations sont réalisées au sein du service de Médecine Nucléaire du CHU de Saint-Étienne sous la supervision de la cheffe de service, Nathalie Prévôt-Bitot. Les acquisitions bi-ou tridimensionnelles sont réalisées sur un appareil de SPECT/CT (Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography) Symbia T2 (Siemens, Knoxville, États-Unis d'Amérique) avec une matrice de 256 x 256 et collimateurs de faible énergie/haute résolution (champ visuel utile : 533 mm x 387 mm ; champ visuel centré : 400 mm x 290 mm).

L'évaluation de l'homogénéité de la ventilation est permise par la réalisation de scintigraphies planaires à l'aide de gaz de $^{81\text{m}}$ krypton ($^{81\text{m}}\text{Kr}$), qui est l'examen clinique de référence dans l'évaluation de la ventilation régionale (**Fazio et Jones 1975; Li et al. 1979; Hayes et Taplin 1980; Cunningham et Lavender 1981; Stavngaard et Mortensen 2005; Bajc et al. 2009; Conway et al. 2013**). Le gaz de $^{81\text{m}}\text{Kr}$ est obtenu à partir d'un générateur au 81 rubidium (^{81}Ru ; Kryptoscan®, Covidien, Dublin, Irlande). L'intérêt du $^{81\text{m}}\text{Kr}$ réside dans sa faible demi-vie radioactive de 13 s. Ainsi, la diffusion du $^{81\text{m}}\text{Kr}$ dans les structures pulmonaires est assimilée à la diffusion de l' O_2 . Son inhalation est permise par le biais d'un masque naso-buccal fixé sur la réplique de tête humaine. Pour chaque scintigraphie, des zones d'intérêt

correspondant aux poumons droit et gauche sont réalisées, afin d'évaluer la répartition de la ventilation entre les deux poumons (Möller et al. 2009). Ensuite, au sein de chaque poumon, une délimitation des structures centrales et des structures périphériques est réalisée afin de calculer l'index de pénétration (Équation 16) (Fazio et Jones 1975; Fazio et al. 1982; Dolovich 2001; Clark 2012; Fleming et al. 2012; Newman et al. 2012).

Équation 16 - Formule du calcul de l'index de pénétration du ^{81m}Kr , d'après (Fazio et al. 1982).

$$\text{Index de pénétration} = \frac{\text{nombre de désintégrations dans les structures périphériques}}{\text{nombre de désintégrations dans les structures centrales}}$$

La cartographie des dépôts d'aérosols est permise par la réalisation de scintigraphies planaires ou d'une acquisition tridimensionnelle couplant scintigraphies et scanner, grâce à un aérosol de ^{99m}Tc -acide diéthylène triamine penta acétique (^{99m}Tc -DTPA), qui est une méthode couramment utilisée pour l'étude clinique de la cartographie et de la clairance des dépôts d'un aérosol (Newman et al. 1982; Newman et Wilding 1999; Kim 2000; Fleming et al. 2003, 2006; Corcoran 2015). L'aérosol a été généré par un nébuliseur pneumatique ou à tamis vibrant. Dans le cas des expériences impliquant une cigarette électronique, l'aérosol était généré à partir d'une solution de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ et d'un mélange d'excipients (propylène glycol, glycérine végétale, Tween® 80 et éthanol). En fonction des études réalisées, l'interface d'administration de l'aérosol a été un masque naso-buccal ou un embout buccal exclusif (nécessitant l'occlusion des fosses nasales). Une quantité de 100 MBq de ^{99m}Tc -DTPA (ou de 400 MBq de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ le cas échéant) est utilisée pour chaque acquisition. Chaque expérience de cartographie des dépôts d'un aérosol nécessite une succession d'acquisition :

- Seringue de ^{99m}Tc -DTPA avant injection dans le réservoir du système d'aérosolisation
- Seringue de ^{99m}Tc -DTPA après injection dans le réservoir du système d'aérosolisation
- Système d'aérosolisation après aérosolisation
- Éléments du modèle *ex vivo*
- Interface d'administration
- Filtre expiratoire
- Réplique anatomique de tête humaine
- Tractus respiratoire
- Filtre « pompe »

Pour chaque image obtenue, des corrections sont mises en place pour tenir compte du bruit de fond radiatif, de l'atténuation des divers éléments du modèle et de la décroissance radioactive du ^{99m}Tc . En fonction des besoins propres à chaque étude, les données de dépôt peuvent être exprimées comme une proportion de la dose nominale, de la dose nébulisée ou de la dose déposée. Lorsque nécessaire, l'index de pénétration de l'aérosol a été calculé, de même que le ratio de dépôt poumon gauche/poumon droit.

Ces expériences générant des déchets radioactifs, ces derniers sont inclus dans le circuit de traitement des déchets radioactifs du CHU de Saint-Étienne. Ainsi, les déchets sont stockés jusqu'à décroissance du radioélément utilisé et, ensuite, détruits par incinération. Les éléments « chaud » du modèle *ex vivo* sont stockés dans le service de Médecine Nucléaire jusqu'à décroissance et sont, ensuite, ramenés au laboratoire pour être nettoyés avant réutilisation.

Valorisation des modèles développés

Les différents projets réalisés au cours de ce travail de thèse ont permis une valorisation des modèles *ex vivo*, que ce soit le développement de nouveaux modèles ou l'application de ces modèles pour répondre à des questionnements cliniques. La valorisation a pris la forme de publications scientifiques, de participation à des congrès ou de contractualisation avec des industriels.

Publications scientifiques

Les travaux réalisés ont permis de publier un total 6 articles :

- 5 articles en tant que 1^{er} auteur :
- 3 dans *Scientific Reports* avec un IF_{5ans} de 4,525
- 1 dans *International Journal of Nanomedicine* avec un IF_{5ans} de 5,166
- 1 dans *Journal of Aerosol Science* avec un IF_{5ans} de 2,663
- 1 article en tant que 2nd auteur dans *Magnetic Resonance in Medicine* avec un IF₂₀₁₉ de 3,635
- Deux autres articles sont en cours de rédaction sur les modèles *ex vivo*, en tant que premier auteur.

Congrès scientifiques

Les travaux réalisés ont permis de participer à un total de 8 congrès scientifiques internationaux :

- 1 présentation orale au congrès European Respiratory Society 2018
- 1 poster au congrès International Society of Aerosol Medicine 2019
- 1 présentation orale au colloque Nanohybrides en 2019
- 1 présentation orale au 6th Workshop on Pulmonary Drug Delivery 2019 (Best Oral Presentation Award)
- 1 présentation orale à la Third Aerosol Dosimetry Conference en 2019
- 1 poster au congrès Drug Delivery to the Lung en 2019

- 1 présentation orale au congrès European Society of Intensive Care Medicine en 2019, réalisée par Aurore Louf-Durier
- 1 poster au congrès European Society of Molecular Imaging en 2019, réalisé par Yannick Crémillieux

Contractualisation du modèle

De par sa versatilité et sa facilité d'utilisation, le modèle peut être contractualisé, afin de servir de support pour le développement de nouveaux DM à visée pulmonaire.

Ainsi, Sur demande de la société Axess Vision, 3 séances de tests d'un prototype de bronchoscope ont été réalisées au sein du laboratoire. De même d'autres industriels semblent intéressés par le modèle *ex vivo* comme support à de la recherche appliquée ou au développement de nouveaux outils et/ou DM.

Au cours de mon travail de thèse, un travail collaboratif avec le Dr. Nicolas Barbe, anesthésiste-réanimateur au CHU de Saint-Étienne, a conduit au développement d'un dispositif de canulation orale d'un nouveau genre. Un processus de dépôt de brevet a été débuté, sous la supervision de la SATT Pulsalys.

Développement de modèles de pathologies respiratoires précliniques *ex vivo* pour l'étude du dépôt d'aérosols

Après une mise en contexte sur l'étude des dépôts d'aérosol et une présentation générale des matériels et méthodes utilisés, cette partie se concentre sur le développement de nouveaux modèles *ex vivo* de pathologies respiratoires dont l'objectif est de proposer une alternative à l'expérimentation animale, pour l'étude de la régionalisation des dépôts d'aérosols, qui s'inscrive de manière pertinente parmi les modèles précliniques existants. En effet, il est impossible pour un modèle, qui par essence est une représentation simplifiée de la réalité, de supplanter tous les autres modèles existants.

Ainsi, les quatre chapitres suivants présentent quatre modèles développés durant ces travaux de thèse. Parmi eux, trois ont fait l'objet d'une publication dans un journal scientifique, tandis que les données supportant le développement du quatrième modèle sont en cours de formalisation pour publication.

Ces modèles s'intéressent à des pathologies respiratoires diverses, tant chez l'adulte que chez le sujet pédiatrique. Il est important de noter que la « pathologisation » des modèles vise à simuler des profils respiratoires similaires à ceux des patients et que le modèle ne se veut pas un modèle biologique cellulaire. Aussi, il ne nous est pas possible, à l'heure actuelle, de proposer un modèle physiopathologique complet mais seulement un modèle respiratoire présentant des modifications ventilatoires rencontrées chez les patients et obtenues dans la littérature scientifique. À des fins de simplification et de généralisation, les modèles représentent les caractéristiques les plus répandues chez les patients sans tenir spécifiquement compte de potentielles sous-populations.

Modèle pédiatrique de dysplasie bronchopulmonaire en ventilation passive

1. Introduction

Le premier modèle développé est, ainsi, un modèle pédiatrique de nouveau-né, atteint de dysplasie bronchopulmonaire. Cette pathologie touche les enfants nés avant terme. En effet, le tractus respiratoire, et plus particulièrement les alvéoles pulmonaires, terminent leur développement *in utero* à partir de la 32^e semaine de gestation. Cette étape est appelée le stage sacculaire.

Ainsi, les enfants nés avant 32 semaines de gestation présentent des défauts de ventilation, qui sont la cause de défauts d'oxygénation. Leur traitement appliquée, dans ce cas, est une ventilation mécanique, invasive ou non, avec une forte fraction en O₂, afin de maintenir une saturation sanguin en dioxygène suffisante pour permettre la viabilité du patient. Cependant, ces pratiques de ventilation, complétées par des traitements à base de corticoïdes, ont des effets secondaires important, tels que des détériorations nerveuses, particulièrement dans le système nerveux central, engendrant chez l'enfant des retards de développement (cognitif, comportemental, moteur) et une fonction respiratoire diminuée.

L'administration inhalée de traitement, tels que les corticoïdes et le surfactant, semble être une voie d'abord d'intérêt. Cependant, les difficultés associées au contrôle des dépôts d'aérosols chez le nouveau-né et les restrictions éthiques liées aux essais cliniques sur les populations pédiatriques n'ont, actuellement, pas permis de montrer une supériorité des traitements inhalés face aux voies d'administration vasculaires. En outre, la grande variété des prises en charge ne permet pas une systématisation des pratiques et est à l'origine de potentiels biais lors des études.

En prenant en compte ces points, le modèle pédiatrique de dysplasie bronchopulmonaire se veut être un outil de développement de nouveaux DM ou de nouvelles pratiques pour l'administration de traitement inhalé. Notre optique de recherche s'est particulièrement portée sur les surfactants, car les coûts de ces derniers étant extrêmement importants dans les prises en charge, il nous a semblé important de disposer d'un modèle permettant d'étudier les dépôts de tels traitements.

Le développement de ce modèle a été fait en collaboration avec Jean-Christophe DUBUS, pneumo-pédiatre. Son expertise nous a permis de déterminer les paramètres critiques de notre modèle, ainsi que ses limites.

2. Article

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Development of an *ex vivo* respiratory pediatric model of bronchopulmonary dysplasia for aerosol deposition studies

Yoann Montigaud¹, Sophie Périnel^{2,3}, Jean-Christophe Dubus⁴, Lara Leclerc¹, Marie Suau¹, Clémence Goy^{2,3}, Anthony Clotagatide^{2,3}, Nathalie Prévôt^{2,3} & Jérémie Pourchez¹

Received: 27 October 2018
Accepted: 20 March 2019
Published online: 05 April 2019

Ethical restrictions are limitations of *in vivo* inhalation studies, on humans and animal models. Thus, *in vitro* or *ex vivo* anatomical models offer an interesting alternative if limitations are clearly identified and if extrapolation to human is made with caution. This work aimed to develop an *ex vivo* infant-like respiratory model of bronchopulmonary dysplasia easy to use, reliable and relevant compared to *in vivo* infant data. This model is composed of a 3D-printed head connected to a sealed enclosure containing a leporine thorax. Physiological data and pleural-mimicking depressions were measured for chosen respiratory rates. Homogeneity of ventilation was assessed by ^{81m}krypton scintigraphies. Regional radioaerosol deposition was quantified with ^{99m}technetium-diethylene triamine pentaacetic acid after jet nebulization. Tidal volumes values are ranged from 33.16 ± 7.37 to 37.44 ± 7.43 mL and compliance values from 1.78 ± 0.65 to 1.85 ± 0.99 mL/cmH₂O. Ventilation scintigraphies showed a homogenous ventilation with asymmetric repartition: $56.94\% \pm 9.4\%$ in right lung and $42.83\% \pm 9.36$ in left lung. Regional aerosol deposition in lungs exerted $2.60\% \pm 2.24\%$ of initial load of radioactivity. To conclude the anatomical model satisfactorily mimics a 3-months old BPD-suffering bronchopulmonary dysplasia and can be an interesting tool for aerosol regional deposition studies.

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is one of the most common pathology of pre-term newborns^{1–4}. This pathology is characterized by the need of supplemental oxygenation or ventilation for at least 28 days of age. Severity is assessed with the remaining need of oxygen at respectively 36 and 56 weeks post-menstrual age (PMA) for infants born before or after 32 weeks of gestation. Physiopathologically, BPD represents the interruption of lung development before the saccular stage, starting at 32 weeks PMA, and corresponds to the formation and architectural development of alveoli⁵. Risk factors to develop BPD are numerous: internal factors (prematurity, gender, genetics, *in utero* tobacco exposure), iatrogenic factors (hyperoxia related to mechanical ventilation or/and oxygen supplementation, blood transfusion) or external factors (antenatal or/and postnatal infection)^{3,6–8}.

Treatments of BPD include prophylactic and symptomatic approaches such as aerosol delivery of surfactant, ante- and/or postnatal administration of corticosteroids and ventilation strategies^{6,9–11}. Despite existing therapeutic options, there are still long-term outcomes of BPD with high rates of cognitive or behavioral impairments and reduced lung function¹², even impacts on motor skills, cognitive and language developments^{6,13}. Administration of corticosteroids, by systemic or inhaled administration route, remain one of the main strategy to limit outcomes of BPD and to wean infants from ventilation¹⁴. Moreover, current inhaled treatments were tested against systemic corticoids. No statistical differences could be found between the two administration routes¹⁰. Inhaled corticotherapy could be used as a prophylactic treatment on very low birth weight preterms but failed to show significant efficacy^{15,16} and as a symptomatic treatment¹⁷. However, these approaches are known to impair neurologic development of newborn¹⁸ and infants and to increase relative risk associated to death for extremely preterm newborns¹⁹. This could be due to a non-optimized nebulization technology, leading to an uncontrolled or uneven

¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U1059 Sainbiose, Centre CIS, F-42023, Saint-Etienne, France. ²INSERM U1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, F-42023, Saint-Etienne, France. ³CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France. ⁴Médecine infantile, pneumo-allergologie, CRCM & CNRS, URMITE 6236, Assistance publique-Hôpitaux de Marseille, 13385, Marseille cedex 5, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P. (email: pourchez@emse.fr)

RR	30 cycles/min	35 cycles/min	40 cycles/min
RR (cycles/min)	29.35 ± 0.83 [29.08; 29.62]	35.23 ± 1.16 [34.85; 35.61]	40.31 ± 0.84 [40.03; 40.58]
IT (s)	0.46 ± 0.09 [0.43; 0.49]	0.46 ± 0.08 [0.43; 0.49]	0.43 ± 0.07 [0.41; 0.46]
ET (s)	1.58 ± 0.10 [1.54; 1.61]	1.24 ± 0.09 [1.21; 1.27]	1.06 ± 0.08 [1.03; 1.08]
PIF (mL)	138.6 ± 21.75 [131.4; 145.7]	141.2 ± 21.93 [134.0; 148.4]	134.6 ± 22.23 [127.3; 142.0]
PEF (mL)	31.14 ± 8.13 [28.47; 33.81]	35.52 ± 11.42 [31.77; 39.28]	35.59 ± 11.74 [31.73; 39.45]
TV (mL)	36.63 ± 7.31 [34.23; 39.03]	37.44 ± 7.43 [34.99; 39.88]	33.16 ± 7.37 [30.74; 35.58]
MV (L/min)	1.07 ± 0.21 [1.01; 1.14]	1.32 ± 0.25 [1.23; 1.40]	1.34 ± 0.31 [1.24; 1.44]
R (cmH ₂ O/L ⁻¹ ·s ⁻¹)	290.1 ± 92.77 [320.6; 259.6]	258.0 ± 84.70 [285.8; 230.1]	253.5 ± 82.50 [280.6; 226.4]
C (mL/cmH ₂ O)	1.85 ± 0.99 [1.52; 2.17]	1.78 ± 0.65 [1.57; 2.00]	1.78 ± 0.84 [1.50; 2.06]

Table 1. Comparison of respiratory parameters and breathing pattern for each respiratory rate ($n = 38$; data are presented as mean ± SD [confidence interval 95%]). Respiratory rate (RR), inspiratory time (IT), expiratory time (ET), peak inspiratory flow (PIF), peak expiratory flow (PEF), tidal volume (TV), minute ventilation (MV), resistances (R), compliance (C).

deposition of drugs in the lungs. Hence, there is an unmet medical need in the cartography and quantification of pulmonary deposition of aerosolized drugs. All things considered, considering the well known side effects of systemic administration, local delivery of drugs to the lungs are expected to be an interesting route of administration as an alternative to systemic therapies in the management of BPD.

The aerosol deposition cartography depend on airborne particles properties (e.g. aerodynamic size, hydroscopic properties, electrical surface charge, etc.) and also on anatomic and physiologic (e.g. diameter of airways, breathing frequency, tidal volume, etc.)^{20,21}. Nonetheless, as radiolabeled aerosols are the gold standard to assess regional aerosol deposition of inhaled particles within lungs²² *in vivo* human studies are still scarce due to ethical restrictions. Therefore, as an alternative, *in vivo* deposition studies using rodent models are frequent^{23,24}. For example, *in vivo* studies on rats are common and different models were developed especially for BPD studies²⁵. Other *in vivo* animal models exist, such as baboon²⁶, macaque²⁷, piglet²⁸ or rabbit²⁹, and could be used as infant-like model for aerosol regional deposition studies. However, using animal models is expensive and time-consuming (i.e. very high cost involved in breeding and housing, length of protocols for animal experiments). Also, there are remaining discrepancies to mimic infants/newborns respiratory tracts, such as breathing frequencies or anatomy of lungs. Finally, *in vivo* human studies of regional deposition assessed by radiolabeled aerosols are focused mainly on adults, thus infant/newborn features are addressed by mathematical modeling³⁰. Deposition models for inhaled particles are based on extrapolation of data from young adults to avoid bias of growth and aging³¹. These mathematical models predictions tends to overestimate tracheobronchial deposition and to underestimate pulmonary one for children compared to adult³². Hence, a greater pulmonary dose could be administered to infants due to architecture of airways, lung surface area or breathing pattern³³. This lack of data concerning inhalation studies focused on infants requires relevant and reliable respiratory models to perform inhalation studies.

Therefore, this study aimed to develop an *ex vivo* respiratory model of infants, which could be a useful tool for the study of aerosol treatments of BPD. Based on previous work of our laboratory^{34,35}, this chimeric model is composed of a 3D-printed upper airways replica of the Sophia Anatomical Infant Nose-Throat (SAINT) model connected to an *ex vivo* leporine respiratory thorax placed in a sealed instrumented enclosure specifically designed for that purpose. Leporine lungs are ventilated by applying negative pressure in the enclosure to mimic pleural depression and passive ventilation. Objectives of this work were to validate the likelihood of this innovative *ex vivo* respiratory model in comparison with infants' respiratory physiology and existing alternative animal models used in literature. This study is divided into 3 main parts: i) breathing pattern and respiratory parameters, ii) assessment of ventilation and iii) regional aerosol deposition within respiratory tract.

Results and Discussion

Breathing pattern and respiratory parameters. Validation of respiratory parameters was performed using 38 respiratory models with various breathing frequencies in the range 30–40 cycles/min. For each respiratory rate, 6 respiratory parameters were assessed: peak inspiratory flow (PIF), peak expiratory flow (PEF), tidal volume (TV), minute-ventilation (MV), resistances (R) and compliance (C). These parameters were calculated for each respiratory model ($n = 38$) by collecting data from at least 50 breathing cycles to calculate mean values for each respiratory model. Table 1 and Fig. 1 report mean values and the dispersion of the experimental data collected for each of the 38 respiratory models at various breathing frequencies (30, 35 and 40 cycles/min).

Breathing frequency and inspiratory/expiratory time. IT and ET are easily tunable. IT was set at 0.4 s and then ET values vary (set at 1.6 s, 1.3 s and 1.1 s respectively) in order to obtain chosen breathing frequencies (i.e. 30, 35 and 40 cycles/min respectively). This range of respiratory rates (RR) is similar to those found in infants suffering from BPD, 43.7 ± 13.5 cycles/min³⁶. Experimental data collected demonstrated that, as awaited, no significant difference ($p = 0.0568$) were obtained for the experimental IT when compared to aimed value. RR and ET are close from aimed values meaning that this model is tunable at will for these breathing frequencies.

Peak inspiratory/expiratory flow. PIF values varied between 134.6 ± 22.23 mL and 141.2 ± 21.93 mL, while PEF values spread from 31.14 ± 8.13 mL to 35.59 ± 11.74 mL (Table 1). PIF values are around two times

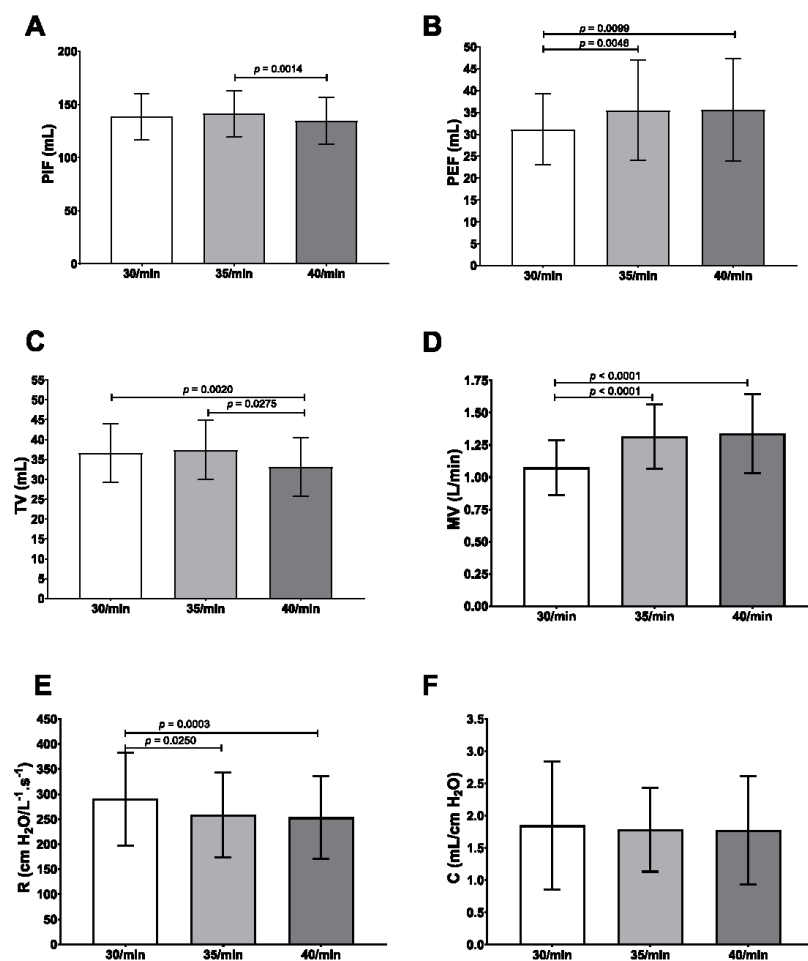


Figure 1. Comparison of respiratory parameters (mean \pm SD; $n = 38$), $p < 0.05$ is considered as significant. (A) Peak inspiratory flow (PIF). (B) Peak expiratory flow (PEF). (C) Tidal volume (TV). (D) Minute ventilation (MV). (E) Resistances (R). (F) Compliance (C).

higher than values reported in literature. However, PEF values are almost 2 times lower than *in vivo* data³⁷. Latzin *et al.*³⁷ study focused on BPD-suffering infants (113–121 days of age), they found PIF values of 76 ± 16 mL/s and PEF values of 70 ± 17 mL/s. These differences could be explained by the tuning of IT and ET that are slightly different from *in vivo* pediatric values exerting a longer IT and a shorter ET.

Tidal volume and respiratory minute-ventilation. TV values fluctuated from 33.16 ± 7.37 mL to 37.44 ± 7.43 mL and MV values ranged from 1.07 ± 0.21 L/min to 1.34 ± 0.31 L/min (Table 1). Results found in different papers showed that TV of infants suffering from BPD are often around 30 mL^{37,38}. Besides, in another study, they detected lower TV, around 15 mL, but this could be due to body weight of infants, that are lower than those of other studies³⁶. Consequently, MV values obtained with the chimeric model are also in good accordance with data reported in the literature. Hence, the developed model showed TV and MV values very similar to *in vivo* data.

Resistances and compliance. Lastly, R values are comprised between 253.5 ± 82.50 cmH₂O/L⁻¹.s⁻¹ and 290.1 ± 92.77 cmH₂O/L⁻¹.s⁻¹, while C values covered the range from 1.78 ± 0.65 to 1.85 ± 0.99 mL/cmH₂O.

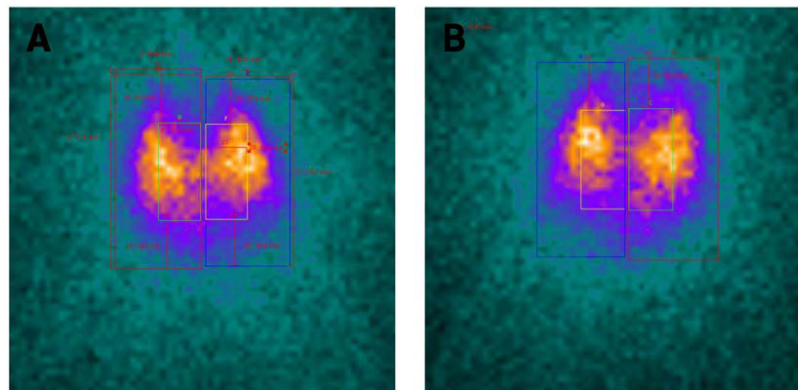


Figure 2. ^{81m}Kr scintigraphic images of lungs. (A) anterior view. (B) posterior view.

(Table 1), R values are lower than $383 \pm 36 \text{ cmH}_2\text{O}/\text{L}^{-1}\text{s}^{-1}$ found in the study of Fok *et al.*³⁹. C values are relatively lower in literature. C values are relatively lower in literature. Indeed, Greenspan *et al.*⁴⁰ found C values around $1.51 \pm 0.69 \text{ mL}/\text{cmH}_2\text{O}$ and Pfenninger *et al.*⁴¹ values were around $1.04 \pm 0.42 \text{ mL}/\text{cmH}_2\text{O}$. All things considered, R and C values seem to be in the same order of magnitude of *in vivo* pediatric data^{39–44}. The chimeric model suffers from few limitations that could impact these results of compliance and resistance such as the lack of lung surfactant and the absence of blood perfusion. Indeed, surfactant is responsible for approximately 50% of compliance of the system⁴⁴. Perfusion of lungs is also an important parameter related to resistances.

To sum up, all the 6 parameters assessed are found to be very similar to *in vivo* data reported in literature from infant or animal models frequently used as surrogates. However, due to the narrow dispersion of experimental data collected, significant differences can be observed for some of these 6 parameters measured when the breathing frequency varies (see Fig. 1). All things considered, the respiratory rate of 35 cycles/min appears to be the best compromise. To conclude, the *ex vivo* pediatric model developed in this study satisfactorily mimics breathing pattern and respiratory parameters of a BPD-suffering infant of 3 to 4 Kg of body weight.

Assessment of ventilation by ^{81m}Kr scintigraphy. Scintigraphic measurements of ventilation using ^{81m}Kr were made on 13 thoraxes. For these nuclear medicine experiments, the RR was set at 35 cycles/min as it appeared to be the best compromise. According to ^{81m}Kr half-life, repartition of this gas within lungs is considered to be representative of regional ventilation⁴². The repartition of total count between right and left lung was studied and compared with pediatric *in vivo* studies^{43,45,46} (Fig. 2). Experiments showed an asymmetry in left/right regional ventilation with $56.94\% \pm 9.4\%$ [51.23%; 62.65%] in right lung and $42.83\% \pm 9.36$ [37.17%; 48.49%] with a significant difference between lungs ($p = 0.019$). Literature lack of quantitative data because ^{81m}Kr ventilation scintigraphies are coupled with ^{99m}Tc -albumin scintigraphy to assess ventilation/perfusion mismatch. Hence, comparison with available *in vivo* data was only qualitative. Ventilation repartition was similar to the one noticed in mild BPD⁴⁶ with a higher proportion of signal in the right lung.

Regional aerosol deposition. The regional aerosol deposition within the respiratory tract was assessed with ^{99m}Tc complexed with diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) radioaerosol. The aerosol regional deposition was recorded by planar scintigraphy using gamma-camera imaging ($n = 6$, using 6 different respiratory models) and 3D scintigraphic images using SPECT-CT ($n = 1$). Three-dimensional images showed a repartition of nebulized dose in accordance with 2D results (Figs 3 and 4). Deposited fractions along nebulization system and within respiratory tracts were quantified and results are shown in Table 2. The different fractions are expressed as proportions of the initial activity in the nebulizer. Literature of such deposition studies *in vivo* is very scarce, even more considering pediatric *in vivo* studies. Most of studies did not use the same nebulizers as ours (Philips Sidestream[®]), which make results obtained in these studies difficult to compare to our own. Moreover, most of studies focused on intubated infants or surrogate animal models that represents an important bias. Table 3 reports data available in literature. Only studies using a jet nebulizer were selected to allow relevant comparison with these data produced using the chimeric model. Results demonstrated that lung deposited fraction in the *ex vivo* chimeric model is in good accordance with *in vivo* data for 3-months old infants. Therefore, the developed model appears to be an interesting tool to successfully assess the regional deposition of aerosol for pediatric model of BPD-suffering infants.

However, this model raises few limitations, such as the supine position during nebulization process that decreases penetration of airborne particles and obviously the lack a physiopathological features of the disease. Thus, regional aerosol deposition could be slightly modified.

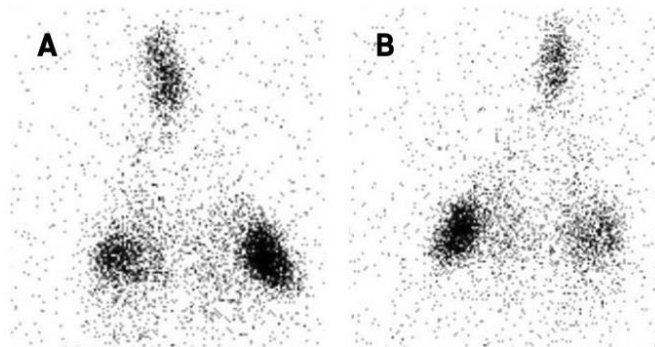


Figure 3. Diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) planar scintigraphic images of the *ex vivo* pediatric model developed in this study. (A) anterior view. (B) posterior view.

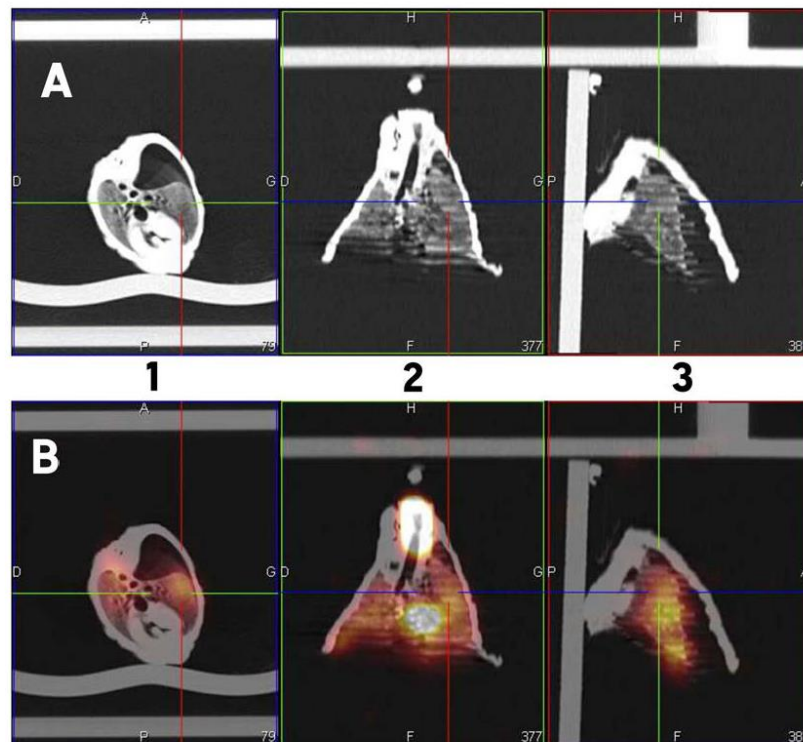


Figure 4. Diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) images after three dimension reconstruction of the *ex vivo* model developed in this study. (A) tomography images. (B) fusion of tomography and scintigraphic images. 1: transversal view. 2: coronal view. 3: sagittal view.

Conclusion

BPD induced mortality, as one of the most common diseases of preterm infants, decreased since neonatal care unit became more and more qualified. However, new techniques induced a modification of the physiopathology and morbidity of this disease partly due to side effects of mechanical ventilation and oxygen supplementation. In

Nebulized activity	Interface	Replica	Expiratory filter	Lungs	Pump filter
50.33 ± 6.75%	7.82% ± 6.91%	15.34% ± 10.20%	23.57% ± 13.87%	2.60% ± 2.24%	1.00% ± 1.38%

Table 2. Deposited fractions along nebulization system as a proportion of initial activity in the nebulizer (mean ± SD, n = 6). Interface: naso-buccal mask. Replica: 3D-printed infant nasal replica with connecting tube. Expiratory filter: collection of exhaled aerosols. Pump filter: security filter to avoid contamination of the depression generator.

Study	Model	Age	Weight	Nebulizer	Lung deposited fraction
Montigaud <i>et al.</i>	<i>Ex vivo</i> chimeric model	Around 3 months	Between 3–4Kg	Philips Sidestream	2.60% ± 2.24%
Watterberg <i>et al.</i> ⁵¹	Intubated infants/toddlers	9–36 months	NA	Travenol #2C7161	≤1%
Fok <i>et al.</i> ⁵²	Intubated infants	Around 2.5 months	Around 1.7Kg	MedicAid Sidestream	0.4 to 2.62%
	Non-intubated infants	Around 3 months	Around 2.4Kg		0.87 to 3.43%
Fok <i>et al.</i> ⁵³	Ventilated rabbits	NA	Around 3Kg	Hudson RCI Flo Thru [®]	3.34%
Dubus <i>et al.</i> ^{27,28}	Ventilated macaques	44 months	2.5 to 2.8Kg	MistyNeb	0.4 to 1.4%
	Ventilated piglets	2 days	1.7Kg ± 0.3Kg		0.50 to 7.70%
Cameron <i>et al.</i> ⁵⁴	Ventilated rabbits	NA	1.5Kg	Mallinckrodt Ultravent [®]	2.8%

Table 3. Comparison of published studies using jet nebulizers in pediatric models. NA: not available.

response, some drugs are used to wean prematurely born infants from ventilation or oxygen supplementation but they have adverse effects. Inhaled therapies could be an interesting route of administration for such treatments, aiming the specifically defective organ. However, uneven and/or uncontrolled deposition of drugs along respiratory tract is one the remaining challenge to improve inhaled therapies.

In this study, an *ex vivo* respiratory model of BPD was developed to assess aerosol regional deposition. This chimeric model consists in a 3D-printed infant upper airways replica connected to a leporine thorax placed in a sealed enclosure producing pleural depression. This method mimics passive ventilation by inducing negative pressure within the enclosure. Breathing pattern and parameters are easily and reproducibly controllable. Three RR were tested (*i.e.* 30, 35 and 40 cycles/min) that led to experimentally measure 6 parameters. Results obtained clearly demonstrated that the breathing pattern obtained for the chimeric model was very similar compared to *in vivo* data of 3-months old BPD-suffering infants available in the literature. Then, using ^{81m}Kr planar scintigraphies, homogeneity of ventilation of the developed model was proved to be comparable to ventilation behavior observed in infants. Lastly, a regional aerosol deposition with ^{99m}Tc-DTPA planar and 3D SPECT/CT experiments was performed. The results obtained were analogous to those found for *in vivo* studies from the literature. However, the developed model suffers from limitations, among others, the supine position and the lack of lung surfactant and blood perfusion. To counterbalance these limitations, this *ex vivo* chimeric model presents many advantages. It perfectly fits the 3R guidelines (Refine, Reduce and Replace) as a good and relevant surrogate model to animal experiments. Secondly, this model is relatively costs saving. Indeed, it does not need any animal husbandry (nor animals). Lastly, this model is easy to use and could be tuned as wanted. Hence, this study demonstrated that this new *ex vivo* model could reliably simulate BPD with less ethical restrictions and allowing an alternative to animal experiments.

Materials and Methods

Materials. Upper airways and larynx are composed of a stereolithographed infant nasal replica obtained by reconstruction from CT scan images of a SAINT model⁴⁷ and by three-dimensional printing technology. It integrated laryngeal structures to mimic vocal folds resistances. This 3D-printed replica is well adapted and was previously used for nasal and pulmonary deposition studies^{26,47–49}. Rabbit thoraxes are obtained from leporine slaughterhouses (Rouget Volailles, La Talaudière France), satisfying French sanitary controls, and were used within 24 hours or frozen at –20 °C depending on availability. Visual control of wound was performed and assessment of recruitment of each lung was carried out. Thoraxes were placed in a sealed enclosure and ventilated using a depression generator SuperDimension[®] (Covidien, Dusseldorf, Germany) mimicking pleural depression similarly to *in vivo* passive ventilation. A picture of the setup is available online as Supplementary Figs S1 and S2.

Forty leporine thoraxes were used to analyze respiratory parameters. Twelves of them (30%) were used within 48 h, others were frozen and thawed at least 12 hours before experiments due to supplier unavailability. Among 43 thoraxes, 5 (5%) were excluded due to major lung injuries that impaired ventilation. Thoraxes were not used for more than 8 hours. A video of ventilating model is available as Supplementary Video SV1. Before slaughter, rabbits were around 3Kg of bodyweight.

The 3R guidelines (Refine, Reduce and Replace) are 50 years old framework focused on ethical considerations of animal use in research. It defines ways to reduce animal suffering and increase reliability of produced data. Moreover, it recommends using substitutive methods to animal experiments. As our *ex vivo* model uses wastes of food industry instead of live animals, it fits in these guidelines and represents a good alternative to animal experiments.

Passive ventilation assessment. Instrumentation of the enclosure was realized with a Biopac® system (Biopac, Goleta, USA) composed of a pneumotachograph (TSD 117) and a differential pressure transducer (TSD160D), which are connected to amplifier (DA100C) plugged on unit acquisition (M160). This system allowed a real-time follow-up of depression in the enclosure and airflow at the replica. AcqKnowledge® 5.0 software was used to determine respiratory parameters for each cycle: peak inspiratory flow (PIF), peak expiratory flow (PEF), tidal volume (TV), minute-ventilation (MV), respiratory rate (RR), inspiratory time (IT), expiratory time (ET), total time (TT), resistances (R) and compliance (C).

Data were recorded for 3 minutes with fixed IT of 0.4 s and tuned ET to reach 30, 35 and 40 respiratory rates (1.6 s, 1.3 s and 1.1 s respectively). Average, standard deviation and 95% confidence interval were calculated for at least 50 cycles to obtain a representative values for each thorax. Breathing patterns and parameters were chosen to represent infants with BPD at rest.

Ventilation and regional aerosol deposition. Regional ventilation was assessed using ^{81m}krypton (^{81m}Kr) scintigraphy⁵⁰ while regional aerosol deposition was observed with ^{99m}technetium complexed with diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc-DTPA) scintigraphy. Aerosol was generated from a 100 MBq in 3 mL solution of ^{99m}Tc-DTPA using a Sidestream® jet nebulizer (Philips Healthcare, Suresnes, France) connected to the infant nasal replica with a naso-buccal mask (Ambu®, Bordeaux, France).

For ventilation scintigraphies, an acquisition was made for each RR with a naso-buccal mask. Two different regions of interest (ROI) were identified on ventilation scintigraphies to define left and right lung. Additional details about the method are provided in the online data supplement. Scintigraphic measurements of ventilation using ^{81m}Kr were made on 14 thoraxes but 1 (7.1%) had to be censored due to obstruction of a primary bronchi leading to biased repartition of the gaz.

For aerosol regional deposition study, 6 thoraxes were used for 2D scintigraphies. These planar scintigraphic images (matrix 256*256) were recorded with a variable angle dual detector Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT/CT, SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, TN) equipped with a low-energy, high-resolution collimator (FWHM 8.3 mm at 10 cm); tested weekly for uniformity (UFOV 533 mm × 387 mm, CFOV 400 mm × 290 mm). Before conducting the inhalation experiments, the initial radioactive doses filled in the nebulizer were quantified (scintigraphic images, 60-sec anterior/posterior, were acquired corresponding to the full and empty syringe). Once the inhalation experiments were performed, 180-sec anterior/posterior images of the experimental setup were acquired for each element: empty nebulizer, expiratory filter, infant nasal replica and lungs. An interest ROI was delimited on the images with a correction of the background radiation using the mean of three external ROIs. Results were expressed in terms of the activity loaded into the nebulizer.

After acquiring 2D images with the same gamma camera (SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, TN), SPECT and CT acquisitions were performed immediately for attenuation correction and anatomical mapping. A 3D SPECT acquisition of the lungs was performed with 64 (2 × 32) projection images, each 30 s. Finally, a CT was performed with the following parameters: 130 kV, 90 mAs, 1.25 mm slice thickness, 0.9 mm increment, 1.6 mm pitch, and rotation time of 1.5 s. A multimodality computer platform (Symbia net; Siemens) was used for image reviews and manipulations. Both the transmission and emission scans were reconstructed using 3D OSEM by default (8 subsets, 5 iterations), with pre-reconstruction smoothing using a 3D Butterworth filter (cutoff: 0.45 cycles/cm; order 5), a 128 × 128 image matrix, a 1.23 zoom, and a pixel size of 3.9 mm. SPECT images were reconstructed using scatter correction (scatter energy window) and CT attenuation correction. CT and SPECT images were matched and fused into trans-axial images. The tracheobronchial area included the trachea and the left and right main bronchi. There, 1 thorax was used to collect data.

Statistical analyses. Results are expressed as mean ± standard deviation (95% confidence interval). For respiratory parameters, Gaussian distribution was assessed with a Shapiro-Wilk normality test. If Gaussian distribution was validated, a repeated-measure one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison *post hoc* test was used. If distribution was not Gaussian, Friedmann's test with Dunn's multiple comparison *post hoc* test was performed. For ventilation studies, a paired t-test was used to compare left and right lung fraction of total counted radioactivity. All tests were two-sided and *p* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

References

- Kair, L. R., Leonard, D. T., Anderson, J. M. & Med. Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr. Rev.* **33**, 255–264 (2012).
- Jensen, E. A. & Schmidt, B. Epidemiology of bronchopulmonary dysplasia. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* **100**, 145–157 (2014).
- Kalikkot Thekkeveedu, R., Guaman, M. C. & Shivanna, B. Bronchopulmonary dysplasia: A review of pathogenesis and pathophysiology. *Respir. Med.* **132**, 170–177 (2017).
- Bronchopulmonary dysplasia: Pathophysiology and potential anti-inflammatory therapies. *Paediatr. Respir. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2018.07.007> (2018).
- Hadchouel, A., Franco-Montoya, M.-L. & Delacourt, C. Altered lung development in bronchopulmonary dysplasia. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* **100**, 158–167 (2014).
- Ali, Z., Schmidt, P., Dodd, J. & Jeppesen, D. L. Bronchopulmonary dysplasia: a review. *Arch. Gynecol. Obstet.* **288**, 325–333 (2013).
- Keszler, M. & Sant'Anna, G. Mechanical Ventilation and Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin. Perinatol.* **42**, 781–796 (2015).
- Simpson, S. J., Hall, G. L. & Wilson, A. C. Lung function following very preterm birth in the era of 'new' bronchopulmonary dysplasia. *Respirology* **20**, 535–540 (2015).
- Amin, R. S. & Rutter, M. I. Airway Disease and Management in Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin. Perinatol.* **42**, 857–870 (2015).
- Cole, C. H. Postnatal glucocorticoid therapy for prevention of bronchopulmonary dysplasia: routes of administration compared. *Semin. Neonatol.* **6**, 343–350 (2001).
- Darlow, B. A. & Morley, C. J. Oxygen Saturation Targeting and Bronchopulmonary Dysplasia. *Clin. Perinatol.* **42**, 807–823 (2015).

12. McEvoy, C. T. & Aschner, J. L. The Natural History of Bronchopulmonary Dysplasia: The Case for Primary Prevention. *Clin. Perinatol.* **42**, 911–931 (2015).
13. Bhandari, A. & McGrath-Morrow, S. Long-term pulmonary outcomes of patients with bronchopulmonary dysplasia. *Semin. Perinatol.* **37**, 132–137 (2013).
14. Delara, M. *et al.* Efficacy and safety of pulmonary application of corticosteroids in preterm infants with respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* fetalneonatal-2017-314046, <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-314046> (2018).
15. Onland, W., Offringa, M. & Kaam, A. van. Late (≥ 7 days) inhalation corticosteroids to reduce bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002311.pub4> (2017).
16. Shah, S. S., Ohlsson, A., Halliday, H. L. & Shah, V. S. Inhaled versus systemic corticosteroids for preventing bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight preterm neonates. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002058.pub3> (2017).
17. Shah, S. S., Ohlsson, A., Halliday, H. L. & Shah, V. S. Inhaled versus systemic corticosteroids for the treatment of bronchopulmonary dysplasia in ventilated very low birth weight preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002057.pub4> (2017).
18. Onland, W., Jaegers, A. P. D., Offringa, M. & Kaam, A. van. Systemic corticosteroid regimens for prevention of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Cochrane Database Syst. Rev.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD010941.pub2> (2017).
19. Bassler, D. *et al.* Long-Term Effects of Inhaled Budesonide for Bronchopulmonary Dysplasia. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708831> (2018).
20. Schüpp, K. G. *et al.* In Vitro Determination of the Optimal Particle Size for Nebulized Aerosol Delivery to Infants. *J. Aerosol Med.* **18**, 225–235 (2005).
21. Geiser, M. & Kreyling, W. G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 2 (2010).
22. Baskin, M. I. Regional Deposition of Aerosolized Pentamidine: Effects of Body Position and Breathing Pattern. *Ann. Intern. Med.* **113**, 677 (1990).
23. Coosthuizen, M. A., Oberholzer, H. M., Scriba, M. R., van der Spuy, W. J. & Pretorius, E. Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles. *Micron* **43**, 863–869 (2012).
24. McKinney, V. *et al.* Pulmonary and cardiovascular responses of rats to inhalation of a commercial antimicrobial spray containing titanium dioxide nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* **24**, 447–457 (2012).
25. O'Reilly, M. & Thebaud, B. Animal models of bronchopulmonary dysplasia. The term rat models. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **307**, L948–L958 (2014).
26. Albuquerque-Silva, I. *et al.* Particle Deposition in a Child Respiratory Tract Model: In Vivo Regional Deposition of Fine and Ultrafine Aerosols in Baboons. *PLOS ONE* **9**, e95456 (2014).
27. Dubus, J. C. *et al.* Aerosol Deposition in Neonatal Ventilation. *Pediatr. Res.* **58**, 10–14 (2005).
28. Dubus, J.-C. *et al.* Lung Deposition of HFA Beclomethasone Dipropionate in an Animal Model of Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr. Res.* **61**, 21–25 (2007).
29. Dubus, J.-C., Rhem, R., Monkman, S. & Dolovich, M. Delivery of Salbutamol Pressurized Metered-Dose Inhaler Administered Via Small-Volume Spacer Devices in Intubated, Spontaneously Breathing Rabbits. *Pediatr. Res.* **50**, 384–389 (2001).
30. Köbrich, R., Rudolf, G. & Stahlhofen, W. A Mathematical Model of Mass Deposition in Man. *Ann. Occup. Hyg.* **38**, 15–23 (1994).
31. Phalen, R. F. & Oldham, M. J. Methods for modeling particle deposition as a function of age. *Respir. Physiol.* **128**, 119–130 (2001).
32. Phalen, R. F., Oldham, M. J., Beaucage, C. B., Crocker, T. T. & Mortensen, J. Postnatal enlargement of human tracheobronchial airways and implications for particle deposition. *Anat. Rec.* **212**, 368–380 (1985).
33. Hofmann, W. Mathematical model for the postnatal growth of the human lung. *Respir. Physiol.* **49**, 115–129 (1982).
34. Perinel, S. *et al.* Development of an ex vivo human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Sci. Rep.* **7** (2017).
35. Perinel, S. *et al.* Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new ex vivo preclinical model. *Respir. Res.* **17** (2016).
36. Patzak, A., Foltzik, B., Mrowka, R. & Schmalisch, G. Time of measurement influences the variability of tidal breathing parameters in healthy and sick infants. *Respir. Physiol.* **128**, 187–194 (2001).
37. Latzin, P. *et al.* Lung Volume, Breathing Pattern and Ventilation Inhomogeneity in Preterm and Term Infants. *PLoS ONE* **4** (2009).
38. Olden, C., Symes, E. & Seddon, P. Measuring tidal breathing parameters using a volumetric vest in neonates with and without lung disease. *Pediatr. Pulmonol.* **45**, 1070–1075 (2007).
39. Fok, T. F. *et al.* Randomised crossover trial of salbutamol aerosol delivered by metered dose inhaler, jet nebuliser, and ultrasonic nebuliser in chronic lung disease. *Arch. Dis. Child. - Fetal Neonatal Ed.* **79**, F100–F104 (1998).
40. Greenspan, J. S., Wolfson, M. R., Locke, R. G., Allen, J. L. & Shaffer, T. H. Increased Respiratory Drive and Limited Adaptation to Loaded Breathing in Bronchopulmonary Dysplasia. *Pediatr. Res.* **32**(3), 356–359 (1992).
41. Pfenninger, J. & Aebi, C. Respiratory response to salbutamol (albuterol) in ventilator-dependent infants with chronic lung disease: pressurized aerosol delivery versus intravenous injection. *Intensive Care Med.* **19**(5), 251–255 (1993).
42. West, J. B. & West, J. B. *Pulmonary pathophysiology: the essentials.* (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2012).
43. Bajc, M. *et al.* EANM guidelines for ventilation/perfusion scintigraphy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **36**, 1356–1370 (2009).
44. Li, D. K. *et al.* Krypton-81m: A Better Radiopharmaceutical for Assessment of Regional Lung Function in Children. *Radiology* **130**, 741–747 (1979).
45. Björkman, K. C. *et al.* Postoperative regional distribution of pulmonary ventilation and perfusion in infants with congenital diaphragmatic hernia. *J. Pediatr. Surg.* **46**, 2047–2053 (2011).
46. Kjellberg, M., Björkman, K., Rohdin, M., Sanchez-Crespo, A. & Jonsson, B. Bronchopulmonary dysplasia: Clinical grading in relation to ventilation/perfusion mismatch measured by single photon emission computed tomography. *Pediatr. Pulmonol.* **48**, 1206–1213 (2013).
47. Janssens, H. M. *et al.* The Sophia Anatomical Infant Nose-Throat (Saint) Model: A Valuable Tool to Study Aerosol Deposition in Infants. *J. Aerosol Med.* **14**, 433–441 (2001).
48. Laube, B. L. *et al.* Deposition of Albuterol Aerosol Generated by Pneumatic Nebulizer in the Sophia Anatomical Infant Nose-Throat (SAINT) Model. *Pharm. Res.* **27**, 1722–1729 (2010).
49. Réminiac, F. *et al.* Nasal high flow nebulization in infants and toddlers: An in vitro and in vivo scintigraphic study. *Pediatr. Pulmonol.* **52**, 337–344 (2017).
50. Fazio, E. & Jones, T. Assessment of regional ventilation by continuous inhalation of radioactive krypton-81m. *Br. Med. J.* **3**, 673–676 (1975).
51. Watterberg, K. L., Clark, A. R., Kelly, H. W. & Murphy, S. Delivery of aerosolized medication to intubated babies. *Pediatr. Pulmonol.* **10**, 136–141 (1991).
52. Fok, T. F. *et al.* Efficiency of aerosol medication delivery from a metered dose inhaler versus jet nebulizer in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr. Pulmonol.* **21**, 301–309 (1996).
53. Fok, T. F. *et al.* Pulmonary Deposition of Salbutamol Aerosol Delivered by Metered Dose Inhaler, Jet Nebulizer, and Ultrasonic Nebulizer in Mechanically Ventilated Rabbits. *Pediatr. Res.* **42**, 721 (1997).
54. Cameron, D., Arnot, R., Clay, M. & Silverman, M. Aerosol delivery in neonatal ventilator circuits: A rabbit lung model. *Pediatr. Pulmonol.* **10**, 208–213 (1991).

Author Contributions

Y.M., S.P.R., N.P. and J.P. designed experiments. Y.M., S.P.R., L.L., M.S., C.G., A.C., N.P. and J.P. conducted the experiments. All authors analyzed the data. Y.M. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42103-2>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

3. Informations supplémentaires

Development of an *ex vivo* respiratory pediatric model of bronchopulmonary dysplasia for aerosol deposition studies

Yoann Montigaud¹, Sophie Périnel^{2,3}, Jean-Christophe Dubus⁴, Lara Leclerc¹, Marie Suau¹, Clémence Goy^{2,3}, Anthony Clotagatide^{2,3}, Nathalie Prévôt^{2,3}, Jérémie Pourchez¹

¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F - 42023 Saint-Etienne France.

²INSERM U 1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, F-42023, France.

³CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France.

⁴Médecine infantile, pneumo-allergologie, CRCM & CNRS, URMITE 6236, Assistance publique-Hôpitaux de Marseille, 13385 Marseille cedex 5, France.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P. (email: pourchez@emse.fr)

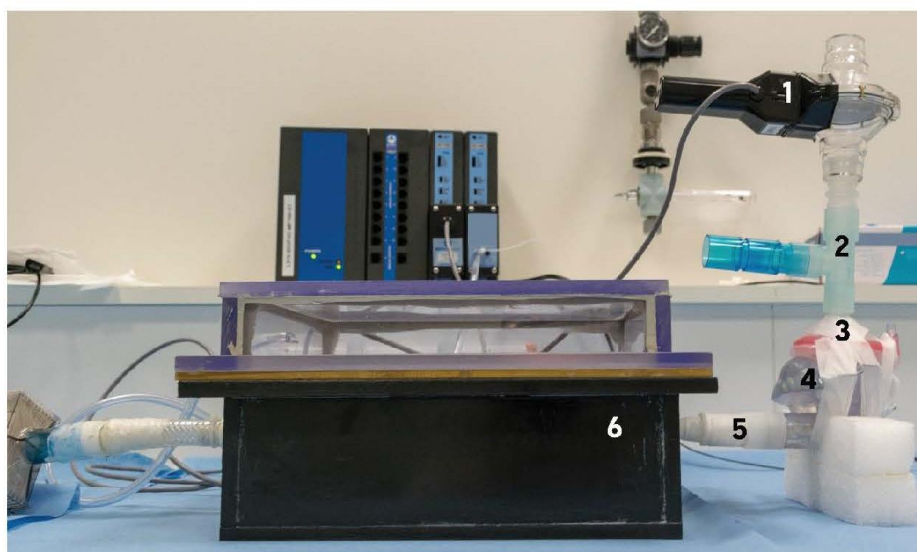


Figure S1 - Image of the setup used to acquire physiological measurements. 1: pneumotachograph. 2: connecting tube. 3: mask. 4: SAINT model replica. 5: connecting tube. 6: sealed enclosure.

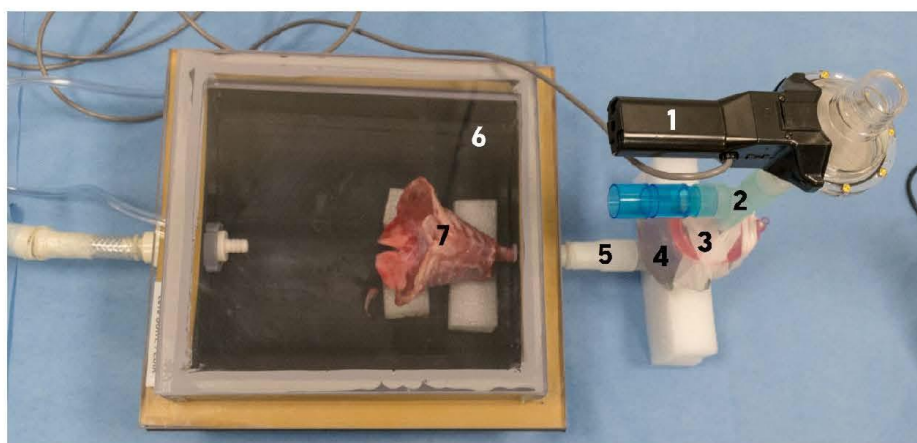


Figure S2 - Image of the setup used to acquire physiological measurements. 1: pneumotachograph. 2: connecting tube. 3: mask. 4: SAINT model replica. 5: connecting tube. 6: sealed enclosure. 7: leporine thorax.

4. Conclusions et perspectives

Le développement de ce modèle pédiatrique de dysplasie bronchopulmonaire a nécessité beaucoup d'adaptation de notre matériel. Dans un premier temps, il nous a fallu adapter nos protocoles de dissection et de préparation aux tractus respiratoires de lapin, qui sont fournis avec leur cage et organes thoraciques. Ensuite, il nous a fallu faire évoluer l'enceinte de ventilation pour prendre en compte le diamètre trachéal du modèle. Enfin, il nous a fallu adapter le protocole de ventilation à la haute fréquence de ventilation des nouveau-nés atteints de dysplasie bronchopulmonaire.

Une fois ces ajustements faits, le développement du modèle a pu être réalisé. Différents points bloquants ont été rencontrés et résolus. Dans un premier temps, la variabilité des mesures physiologiques était plus importante que lors du développement du modèle adulte sain. Deux explications sont possibles et non mutuellement exclusives sont possibles : la variabilité des temps de réponse des valves de la pompe de ventilation et la faible valeurs de volumes mobilisés. La variabilité crée par ces deux paramètres a donc été monitorée, afin de déterminer l'intervalle de ces variations, qui s'est avéré être relativement constant et similaire à celle des mesures réalisées chez les patients pédiatriques. Dans un second temps, du fait des faibles volumes respiratoires du modèle, une incertitude existait quant à la mesure de la radioactivité déposée dans le tractus respiratoire. En effet, du fait de la faible fraction pulmonaire déposée, il était relativement complexe d'obtenir des images avec un ratio signal/bruit suffisant. Pour lever cette incertitude, des expériences ont été réalisées avec une dose nominale plus importante. Les résultats étaient cohérents avec ceux précédemment obtenus. Nous avons, ainsi, pu valider notre modèle comme étant pertinent et similaire à ce qui est observé chez le patient pédiatrique ou sur les modèles *in vivo* animaux.

Ce modèle présente donc des caractéristiques ventilatoires et de régionalisation des dépôts intéressantes pour des études précliniques en aérosolthérapie. Les perspectives de ce modèle peuvent, ainsi, suivre des axes différents :

- La réduction des limites inhérentes à ce modèle, telles que l'humidification et le réchauffement des gaz inhalés.
- L'application de ce modèle à l'étude des traitements inhalés de surfactants pour la détermination de la régionalisation des dépôts, ainsi que l'étude de l'efficacité des DM utilisés pour déposer les traitements.
- L'application de ce modèle à l'étude des effets de différents paramètres de ventilation mécanique sur la cartographie des dépôts d'aérosols dans le tractus respiratoire. Toutefois, cette application nécessiterait des adaptations du montage expérimental.

Modèle adulte de fibrose pulmonaire idiopathique en ventilation passive

1. Introduction

Ce second modèle est le fruit d'une collaboration avec Laurent PLANTIER, spécialiste en physiologie pulmonaire de la fibrose pulmonaire. Sous le terme générique de « fibrose pulmonaire », on retrouve une catégorie de maladies, les pathologies interstitielles pulmonaires, dont la fibrose pulmonaire idiopathique est la plus représentée.

Bien que d'incidence très faible, cette pathologie présente une mortalité importante d'environ 50% dans les 5 ans suivant le diagnostic. En outre, les thérapeutiques existantes sont symptomatiques et ne font que retarder la progression de la maladie.

Ainsi, l'administration pulmonaire pourrait être une solution thérapeutique pertinente dans le traitement de cette pathologie tout en permettant de diminuer les effets indésirables associés. De plus, cette voie d'administration permettrait, potentiellement, de pouvoir traiter les adjacents aux lésions fibrotiques, qui présentent souvent des modifications microscopiques mais pas encore de lésions macroscopiques et cliniques.

Cependant, pour développer des DM d'aérosolthérapie, il convient prendre en compte le fait que les lésions fibrotiques sont à l'origine d'un syndrome restrictif sur le tractus respiratoire. En outre, ces lésions fibrotiques étant diffuses et inhomogènes, elles induisent des modifications locales de la compliance pulmonaires, qui sont associées à des réductions des dépôts dans les zones fibrosées.

Aussi, il est nécessaire de montrer sur des modèles précliniques, l'efficacité de nouveaux dispositifs d'aérosolthérapie permettant d'améliorer les dépôts dans les zones de fibrose pulmonaire.

OPEN Development of an *ex vivo* preclinical respiratory model of idiopathic pulmonary fibrosis for aerosol regional studiesYoann Montigaud¹, Sophie Périnel-Ragey^{2,3}, Laurent Plantier⁴, Lara Leclerc¹, Clémence Goy^{2,3}, Anthony Clotagatide³, Nathalie Prévôt^{2,3} & Jérémie Pourchez^{1*}

Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive disease with unsatisfactory systemic treatments. Aerosol drug delivery to the lungs is expected to be an interesting route of administration. However, due to the alterations of lung compliance caused by fibrosis, local delivery remains challenging. This work aimed to develop a practical, relevant and ethically less restricted *ex vivo* respiratory model of fibrotic lung for regional aerosol deposition studies. This model is composed of an Ear-Nose-Throat replica connected to a sealed enclosure containing an *ex vivo* porcine respiratory tract, which was modified to mimic the mechanical properties of fibrotic lung parenchyma - *i.e.* reduced compliance. Passive respiratory mechanics were measured. ^{81m}Kr scintigraphies were used to assess the homogeneity of gas-ventilation, while regional aerosol deposition was assessed with ^{99m}Tc-DTPA scintigraphies. We validated the procedure to induce modifications of lung parenchyma to obtain aimed variation of compliance. Compared to the healthy model, lung respiratory mechanics were modified to the same extent as IPF-suffering patients. ^{81m}Kr gas-ventilation and ^{99m}Tc-DTPA regional aerosol deposition showed results comparable to clinical studies, qualitatively. This *ex vivo* respiratory model could simulate lung fibrosis for aerosol regional deposition studies giving an interesting alternative to animal experiments, accelerating and facilitating preclinical studies before clinical trials.

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a progressive fibrotic disease of the lungs without identified etiology, is the most common form of idiopathic interstitial pneumonia^{1,2}. Estimated incidence is around 2.8/100000 in North America and Europe, while lower incidences are observed in Asia and South America³. The spontaneous 3–5 years survival is around 50%^{4–6}. IPF is characterized by progressive fibrotic lesions extending into the lungs from subpleural regions with a heterogeneous distribution throughout the lung. This leads to impairments of lung mechanics with a prominent reduction of lung compliance^{7–12} - *i.e.* decreased ability of the lung to stretch and expand during the breathing cycle. IPF symptoms include cough, exertional dyspnea^{1,7,13–18}, alterations in pulmonary gas exchange^{8,17}, physiology of airways¹⁹ and pulmonary hemodynamics^{14–16,20,21}.

Currently, IPF is treated with systemic antifibrotic drugs, such as pirfenidone and nintedanib, which have been shown to delay the progressive decrease of lung function and to reduce mortality^{3,22–24}. However, neither pirfenidone nor nintedanib stops disease progression, while lung transplantation is associated with significant morbidity and mortality^{25–28}. Thus, new treatments for IPF are strongly needed.

Pulmonary delivery of drugs is expected to be an interesting route of administration as an alternative to systemic therapies in IPF. Indeed, work is ongoing to develop inhaled IPF therapies using either repurposed drugs such as interferon gamma²⁹ or new chemical entities, such as the $\alpha_v\beta_3$ integrin inhibitor GSK3008348³⁰. Nevertheless, optimization of nebulization technologies appears necessary to reach this aim. Indeed, due to the alterations of lung compliance in IPF, aerosolized delivery of treatments remains challenging. Heterogeneous reduction of lung compliance is associated with impaired deposition of aerosol in affected pulmonary regions³¹.

¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F - 42023, Saint-Etienne, France. ²INSERM U 1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France. ³CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France. ⁴CEPR/INSERM UMR1100, LabexMablImprove & Service de Pneumologie et Explorations Fonctionnelles Respiratoires, Hôpital Bretonneau, Université François Rabelais, Tours, F-37044, France. *email: pourchez@emse.fr

Moreover, human *in vivo* data lacks of precise mapping and quantification of aerosol deposition patterns in IPF. Thus, there is an urgent need for inexpensive preclinical studies devoted to the quantitative assessment of aerosol regional deposition in fibrotic lungs. Such studies would help to improve nebulization technologies for local administration to fulfill the unmet need for better treatments.

Airborne particles properties (*e.g.* aerodynamic size, hygroscopic properties, electrical surface charge, etc.) are some of the main parameters affecting regional deposition of aerosolized drugs within the respiratory tract. However, anatomical and physiological features (*e.g.* diameter and branching of airways, breathing frequency, tidal volume, etc.)^{32,33} also represent key factors in regional deposition. Although they allow to accurately study these parameters, *in vivo* human studies are scarce due to ethical considerations and costs involved, as radiolabeled aerosols are the gold standard method to assess regional deposition of inhaled particles within lungs³⁴. Consequently, animals (particularly rodents) are common surrogate models even if animal use also suffers from ethical restrictions^{35,36}. Animal models are also time-consuming and expensive due to costs involved in breeding and housing. Moreover, such models are different from humans in terms of anatomy of upper airways, bronchial divisions and lung segmentation³⁷. Ventilation patterns are also very different in rodents. As an example, breathing frequency at rest for rats is about 80 cycles per minute while it is 15 per minute for adult humans. Additionally, no model sufficiently reproduces the pathophysiological features of IPF lungs that it may be used for relevant aerosol deposition studies. These discrepancies are commonly recognized as biases in aerosol deposition patterns. Thus, extrapolation from these models to humans should be carefully performed. To overcome these limitations, mathematical and computational deposition models for inhaled particles were developed but were mainly based on extrapolation from healthy young adults^{38–40}. Moreover, these models are confronted to a data gap for some parameters, such as submicron sized particles or specific anatomical features. This lack of database is challenging for these models and lead to issues to validate obtained predictions. Consequently, inhalation studies require relevant and reliable respiratory models.

Therefore, based on previous works of our laboratory^{41,42}, this study aimed to develop an adult *ex vivo* respiratory model, which could be a useful tool for practical and less expensive preclinical studies devoted to the local delivery of drugs to fibrotic lungs. This respiratory model is composed of a 3D-printed Ear-Nose-Throat (ENT) replica connected to an *ex vivo* porcine respiratory tract placed in a sealed instrumented enclosure. To mimic some of the alterations associated with fibrosis, lungs were modified to reduce the lung compliance and to create restrictive abnormalities at lung bases and upper lobes representing fibrotic lesions. Then, lungs were ventilated by applying negative pressure in the enclosure to simulate pleural depression and, thus, passive ventilation. Aims of this work were to validate the reliability of this innovative *ex vivo* model of pulmonary fibrosis and to compare it, in terms of respiratory mechanics and features of aerosol regional deposition, to the previously developed healthy *ex vivo* respiratory model^{41,42} (*i.e.* before the modification performed to depict the physiological alterations associated with IPF) and to IPF-suffering patients^{7,8,10,12,19,20,31,43–45}. Consequently, this study is divided into 4 main parts: (i) development and comparison of various physical procedures to reduce the pulmonary compliance (ii) measurements of respiratory mechanics before and after modifications of lung tissue, (iii) assessment of regional gas-ventilation and (iv) regional aerosol deposition within fibrotic lungs.

Results and Discussion

Performance analysis of physical methods to reduce lung compliance mimicking the mechanical behavior of a fibrotic lung. These experiments aimed to find a reliable and reproducible method to simulate lung fibrosis on *ex vivo* porcine respiratory tracts (Fig. 1 and Tables S1 and S2 the Supplementary Information). Figure 1 presents the resistances and the dynamic compliance of the respiratory tract expressed as mean \pm standard deviation of the relative value of the “healthy” stage of the lungs (*i.e.* lungs with no modification). Resistances (R) with glue (G) method appeared to be uneven with important dispersion of data. Inversely, steam (S) method showed a much narrower dispersion and a slight modification of R when compared to the healthy stage. However, when reaching stage 4 (*i.e.* methods applied to whole lungs) with S method we observed an important increase of the standard deviation showing a lack of reproducibility for this specific stage (see Supplementary Information). Glue + steam (GS) method suffered from a wide dispersion of data as G method (Fig. 1A). Dynamic compliance of lung decreased with the incrementing stages of the three methods. The strongest variations of compliance were seen with G and GS method. S method induced a less important reduction of compliance (Fig. 1B).

Considering the presented results, G and GS methods were generating barely reproducible data, while S method was more reproducible and repeatable. One hypothesis explaining the differences between G and S methods is that G method is more likely to simulate a pleural disease while the thermal treatment of the S method is more likely to simulate “fibrotic lung pattern” by denaturing extracellular matrix proteins^{46–48}. Moreover, applying the S method on lung parenchyma induced a visual shrinking of the treated regions. However, we did not assess that this thermal treatment had any significant impact of the small airways, which exert a relative widening in parenchymal regions suffering from IPF^{19,21}. Thus, careful extrapolation should be made for this point, which should not impact the validity of aerosol deposition pattern. Therefore, we decided to select the S method as the more relevant method to generate modifications of lung parenchyma leading to impaired mechanical properties of the lung needed to simulate the decreased lung compliance observed in IPF. Lastly, as the aim of this study was to simulate a moderate IPF, it was decided to focus on stage 3 (*i.e.* physical method applied to entire upper lobes + bases of lower lobes). Indeed, this stage induces a slight modification of resistances for an important modification of compliance (Figs. S2–S4 in Supplementary Information). The selected method did not include mucus accumulation in the airways, which is an uncommon feature of IPF. Moreover, even if we were unable to precisely assess the mucus status in the broncho-alveolar regions, we could assume that mucus is present and could be accumulated in these regions as observed in IPF-suffering patients⁵.

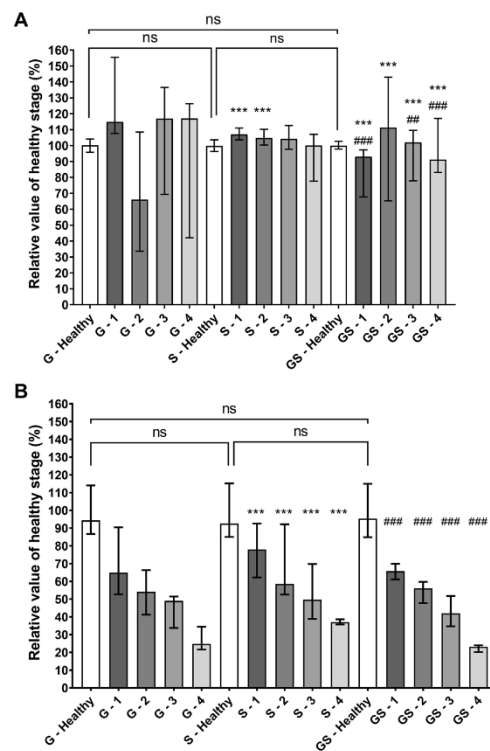


Figure 1. Variability of resistances (A) and compliance (B) with different fibrosis methods and stages ($n = 4$). G: Glue method; S: Steam method; GS: Glue + Steam method. 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. “G healthy” (respectively the “S healthy” and the “GS healthy”) corresponds to the lungs before modifications which will be induced at different stages by the G method (respectively the S method and the GS method). Data are presented as median and inter-quartile range of the relative value of the healthy stage of the corresponding method. ***Corresponds to $p < 0.0001$ when compared to glue method. ## and ### corresponds to $p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively when compared to steam method. ns corresponds to non-significant.

Assessment of respiratory mechanics. *Overall results.* Table 1 reports mean \pm standard deviation values and 95% confidence interval of experimental data collected for the 30 *ex vivo* respiratory models. As expected, inspiratory time (IT), expiratory time (ET) and respiratory rates (RR) are very close from aimed values meaning that the developed respiratory model is tunable at will and reliable for these RR. Reliability and reproducibility data are presented in Tables S3 and S4 in the Supplementary Information. For “healthy” lungs, two RR were tested: 15 and 25 cycles/min. For “fibrotic” lungs, only 25 cycles/min was used. Fifteen cycles per minute was used as RR for healthy lungs in accordance with our previous data used to validate the “healthy” *ex vivo* respiratory model^{41,49}. The RR of 25 cycles per minute was chosen to mimic IPF. These RR are similar to those found for healthy adult subjects and IPF-suffering adult patients^{8,10,12}. According to experimental data and predefined thresholds – *i.e.* inter-individual variations about 30% and intra-individual variations about 15% – we assumed the reliability and the reproducibility of our model.

The healthy ex vivo respiratory model. Before application of S, tidal volume (TV) was 515.2 ± 77.0 mL and minute-ventilation (MV) was 7.86 ± 1.11 L/min. Mean inspiratory flow (MIF) was 361.4 ± 39.3 mL/s. Lastly, R values were 13.23 ± 3.41 cmH₂O/(L/s), while dynamic compliance (C) values were 90.44 ± 27.97 mL/cmH₂O. Observed results are consistent with previously published data concerning the healthy *ex vivo* respiratory model^{41,49} and in good accordance with data available in the literature from *in vivo* studies on healthy subjects¹⁰. MIF values appear to be similar to values obtained of healthy subjects as showed Renzi *et al.*¹⁰. Lastly, experimental C values, 90.44 ± 27.97 mL/cmH₂O, are almost 2 times lower than commonly considered as normal for healthy

	Healthy <i>ex vivo</i> model RR set as 15	Healthy <i>ex vivo</i> model RR set as 25	Healthy <i>in vivo</i> data	IPF <i>ex vivo</i> model RR set as 25	IPF <i>in vivo</i> data
Aimed RR (cycles/min)	15	25	15* ¹⁰	25	25* ¹⁰
Measured RR (cycles/min)	15.25 ± 0.49 [15.07; 15.43]	25.23 ± 0.82 [24.93; 25.53]	N/A	25.31 ± 0.89 [24.98; 25.64]	N/A
IT (s)	1.42 ± 0.09 [1.39; 1.46]	0.90 ± 0.07 [0.88; 0.93]	1.6* ¹⁰	0.85 ± 0.06 [0.83; 0.87]	0.9* ¹⁰
ET (s)	2.52 ± 0.11 [2.47; 2.56]	1.48 ± 0.07 [1.45; 1.51]	2.4* ¹⁰	1.52 ± 0.08 [1.50; 1.55]	around 1.5* ¹⁰
TV (mL)	513.8 ± 76.8 [485.2; 542.5]	297.1 ± 41.5 [281.6; 312.6]	500 ¹⁰	261.1 ± 44.3 [244.5; 277.6]	400* ¹⁰
MV (L/min)	7.84 ± 1.12 [7.42; 8.26]	7.49 ± 1.01 [7.11; 7.86]	7.5* ¹⁰	6.59 ± 1.10 [6.18; 7.00]	10* ¹⁰
MIF (mL/s)	360.6 ± 39.46 [345.9; 375.3]	328.8 ± 30.3 [317.5; 340.1]	400 ¹⁰ 440 ⁶¹	305.8 ± 39.4 [291.1; 320.5]	400 ¹⁰ 440 ⁶¹
R (cmH ₂ O/(L/s))	13.254 ± 3.29 [12.31; 14.76]	11.68 ± 1.52 [11.11; 12.25]	3.23 ± 0.29* ⁶⁰ 2.25 ± 0.28* ⁶¹	10.71 ± 1.07 [10.31; 11.11]	N/A
C (mL/cmH ₂ O)	90.16 ± 27.72 [79.81; 100.50]	96.28 ± 28.69 [85.57; 107.00]	167.22* ⁶²	69.39 ± 20.52 [61.73; 77.05]	50* ⁷¹⁰

Table 1. Comparison of respiratory parameters and breathing pattern for each respiratory rate ($n = 30$; data are presented as mean \pm standard deviation [confidence interval 95%]). Respiratory rate (RR), inspiratory time (IT), expiratory time (ET), tidal volume (TV), minute ventilation (MV), mean inspiratory flow (MIF), resistances (R) and compliance (C). N/A: not applicable. *corresponds to value extracted from a plot. #corresponds to data recalculated from correspondent literature.

subjects. The relatively low values obtained with our model were most probably due to the lack of perfusion and the unknown status of surfactant.

The fibrotic *ex vivo* respiratory model. We applied the S method to the lungs to reduce lung compliance by modifying the mechanical properties of lungs parenchyma. We also modified the RR, which was set at 25, to better simulate the breathing pattern of an IPF-suffering patient. TV was 259.4 \pm 48.8 mL while MV was 6.62 \pm 1.10 L/min. Results found in literature showed that TV of IPF-suffering patient is around 400 mL^{8,10,12}, which is higher than the developed model. R and C values were respectively 10.54 \pm 1.39 cmH₂O/(L/s) and 70.27 \pm 21.65 mL/cmH₂O. C values appeared to be relatively close to human *in vivo* data. Indeed, Renzi¹⁰ *et al.* found values about 43,3 mL/cmH₂O and Zapletal⁷ *et al.* found a mean value of 50 mL/cmH₂O.

Physiological reliability of the respiratory *ex vivo* model. To sum up, all the 5 respiratory features assessed were found to be in the same order of magnitude as *in vivo* data for adult suffering of IPF and with previously obtained results on "healthy" *ex vivo* model. However, features by features, we observed that some results were different than expected values. Nevertheless, differences observed between our experimental data - particularly the low TV for the IPF model - and those obtained from literature could be due to patients' ability to increase muscle workload during inspiration and expiration to compensate lung stiffness, while we only applied fixed negative pressures. To compensate this phenomenon, we are currently developing a new depression generator allowing to tune the applied negative pressure in the enclosure. Moreover, some limitations of the *ex vivo* model could impact these respiratory physiological features as the lack of lung surfactant and the absence of blood perfusion. Indeed, surfactant is responsible for approximately 50% of compliance of the system⁵⁰. Perfusion of lungs is also an important parameter related to resistances.

Assessment of regional gas-ventilation by ^{81m}Kr scintigraphies. Figure 2 presents scintigraphic images of ^{81m}Kr gas-ventilation. Scintigraphic measurements of ventilation using ^{81m}Kr were made on 12 lungs whose compliance was modified with the S method at stage 3 (*i.e.* physical method applied to entire upper lobes + bases of lower lobes). Due to the very short half-life of ^{81m}Kr, repartition of this gas within lungs is widely considered to allow imaging of regional gas-ventilation⁵¹. Experiments showed a symmetry in left/right regional gas-ventilation with 50.10% \pm 3.60% in the left lung and 49.91% \pm 3.60 in the right lung. When compared to the previously developed healthy *ex vivo* model^{41,49}, there was no significant differences in terms of left/right regional gas-ventilation (Table 2, Fig. 2 and Figs. S5 and S6 in Supplementary Information). However, when taking into account the central-to-peripheral ratio, we observed that the penetration index of ^{81m}Kr gas in our IPF model, 53.10 \pm 1.98%, is lower compared to the data observed on the previous healthy *ex vivo* model, which exerted a central-to-peripheral ratio about 62.56%⁴¹ ($p < 0.0001$). However, literature lacks of quantitative data because ^{81m}Kr ventilation scintigraphies are usually coupled with ^{99m}Tc-albumin scintigraphy, to assess the qualitative ventilation/perfusion mismatch. Hence, comparison with available *in vivo* data was only qualitative. This gas-ventilation homogeneity is in good accordance with *in vivo* data obtained from patients suffering of IPF^{14-16,20,44,52}.

Regional aerosol deposition. *Healthy versus fibrotic ex vivo respiratory model: impact of the alteration of lung compliance on the aerosol regional deposition.* The regional aerosol deposition was recorded by planar scintigraphies using gamma-camera imaging (using 6 different respiratory tracts) and 3D scintigraphic images using

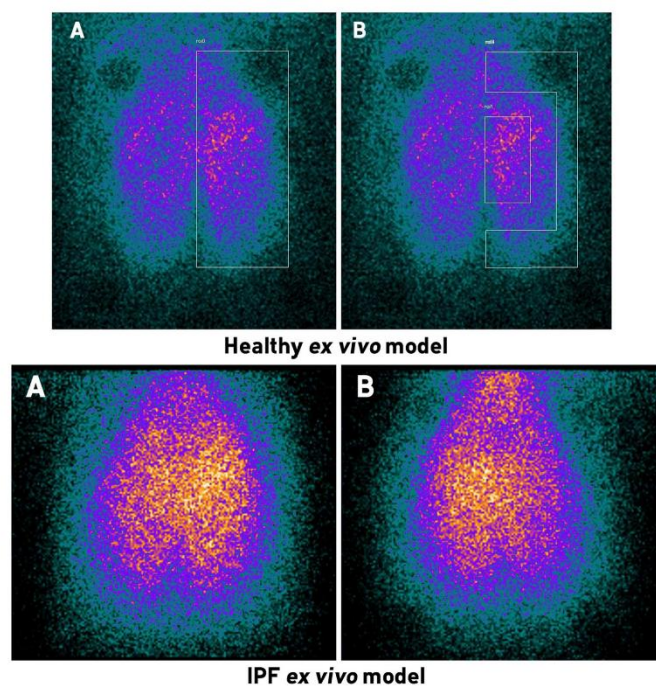


Figure 2. ^{81m}Kr scintigraphic images of IPF simulating lungs. A: anterior view. B: posterior view.

	IPF <i>ex vivo</i> model		Healthy <i>ex vivo</i> model ^{41,49}	
	Left lung	Right lung	Left lung	Right lung
^{81m}Kr repartition (% of total radioactivity)	50.10 ± 3.60 [47.81; 52.38]	49.91 ± 3.60 [47.62; 52.19]	50.31 ± 3.57 [48.33; 52.29]	49.69 ± 3.57 [47.71; 51.67]
Central/peripheral ratio (% of radioactivity in lung)	53.10 ± 1.98 [51.84; 54.36]		62.56 ± 6.24 [58.96; 66.16]	

Table 2. Left/right ventilation distribution and central/peripheral repartition within lung assessed with ^{81m}Kr (^{81m}Kr). Data are presented as mean ± standard deviation [95% confidence interval] (n = 12).

Nebulized fraction	Interface	ENT	Lungs	Filters
10.60 ± 6.15%	1.34 ± 0.86%	1.26% ± 0.61%	5.60% ± 3.27%	2.39% ± 1.81%

Table 3. Deposited fractions along nebulization system as a proportion of nominal dose of radioactivity (mean ± standard deviation, n = 6). Nebulized fraction corresponds to the dose of ^{99m}Tc -DTPA that was efficiently nebulized. Interface: naso-buccal mask. ENT: 3D-printed Ears-Nose-Throat replica with connecting tube. Filters: filters connected between depression generator and the enclosure to receive aerosol leaking from the lungs.

SPECT-CT (n = 1). Deposited fractions along nebulization system and within respiratory tracts were quantified and results are shown in Table 3. The nebulized fraction corresponds to the proportion of the nominal dose that was efficiently nebulized (*i.e.* the initial activity injected into the nebulizer tank minus the remaining activity that remains after the nebulization process in the device). We observed on 2D scintigraphies (Fig. 3) that radiolabeled aerosol was deposited within lungs with a more intense signal in the central regions of the lungs.

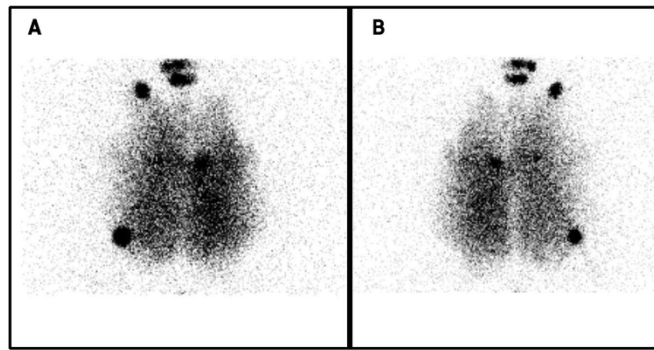


Figure 3. ^{99m}Tc -DTPA planar images of the *ex vivo* model developed in this study ($n = 6$). (A) anterior view. (B) posterior view.

Finally, Fig. 4A illustrates the SPECT-CT aerosol deposition imaging within the healthy *ex vivo* model. As easily seen, the deposition pattern is quite homogeneous and the aerosol had a deep penetration in the healthy lung, to reach peripheral regions. At the contrary, Fig. 4B depicts a SPECT-CT image of a fibrotic lung after thermal treatment of the parenchyma with the S method at stage 3. It shows very poor deposition pattern in the bases of lower lobes.

Compared to data generated on the “healthy” *ex vivo* model¹¹, aerosol penetration within the fibrotic lung was not as deep. Indeed, lung bases did not show the deposition of the radiolabeled aerosol. These two images showed that despite its limitations, this model presented regional aerosol deposition features associated with reduced lung compliance in regions treated to modify the mechanical properties of the parenchyma. However, it should be noted that the model only allowed to assess regional deposition of the aerosol. The absorption of the ^{99m}Tc -DTPA and its diffusion in the different cell types composing parenchyma and mesenchyme of the respiratory tract could not be assessed. The development of a more complex model with perfusion and ventilation is currently under development and could further answer to this limitation.

In a comparative manner, the study from Diaz *et al.*²⁹ focused on the delivery and the safety of inhaled interferon- γ . These experiments conducted on human were performed with a different nebulization technology (vibrating mesh nebulizer associated to inhalation-triggered nebulization), which generated an aerosol with larger particles while inhalations were performed with a deep and slow pattern. Therefore, comparison to this study should be carefully made. As seen in Table 4, values from Diaz *et al.* are similar from those obtained with our model, when values are expressed as percentage of the nebulized dose, meaning that the regional aerosol deposition patterns are relatively close.

Overall, the presented results showed that aerosol deposition was mainly observed in the non-treated zones of the lungs. This feature is comparable to the one observed in patients. While this particular point seemed to be controversial for inhaled therapies in IPF, it could be a compelling point in favor of such therapies because the healthy regions of the parenchyma could already present molecular abnormalities associated with the proliferation of the fibrotic lesions²¹. Thus, even if it is important to develop medical devices that will allow higher depositions into the “fibrotic” regions, it remains important to also treat healthy regions of the lungs.

Reliability of the developed *ex vivo* fibrotic lungs compared to IPF-suffering patients in terms of aerosol regional deposition. Literature of such regional aerosol deposition studies *in vivo* is very scarce and do not allow quantitative comparison to assess deposition patterns. Thus, only qualitative comparisons between present experimental results and data found in literature could be made. However, qualitatively, by comparing our results to *in vivo* human data of IPF-suffering patients using similar nuclear imaging technique and administration procedure, we support the conclusion that the *ex vivo* fibrotic respiratory model is in good accordance with existing *in vivo* inputs of IPF-suffering patients^{14,20,31,44,53,54}.

This model raises some limitations, such as the supine position during nebulization process that decreases penetration of airborne particles such as nebulization. As previously observed on a panel of nebulizers with different size distribution⁴², the largest particles – with a MMAD of $2.8\mu\text{m}$ – are mostly affected by impact while the smallest particles – with a MMAD of $0.23\mu\text{m}$ – are mostly affected by turbulence-driven diffusion and would not be significantly impacted by the supine position. Only intermediate particles – with a MMAD of $0.55\mu\text{m}$ – would be affected by the supine position, as the main mechanism driving their deposition is sedimentation. Hotspots are visible on planar scintigraphies due to parenchymal wound on the lungs, creating areas with less resistances and thus generating leakage of radioaerosol from the lungs toward inside this enclosure. However, a filter is placed in between the depression generator and the enclosure allowing to pick up aerosol.

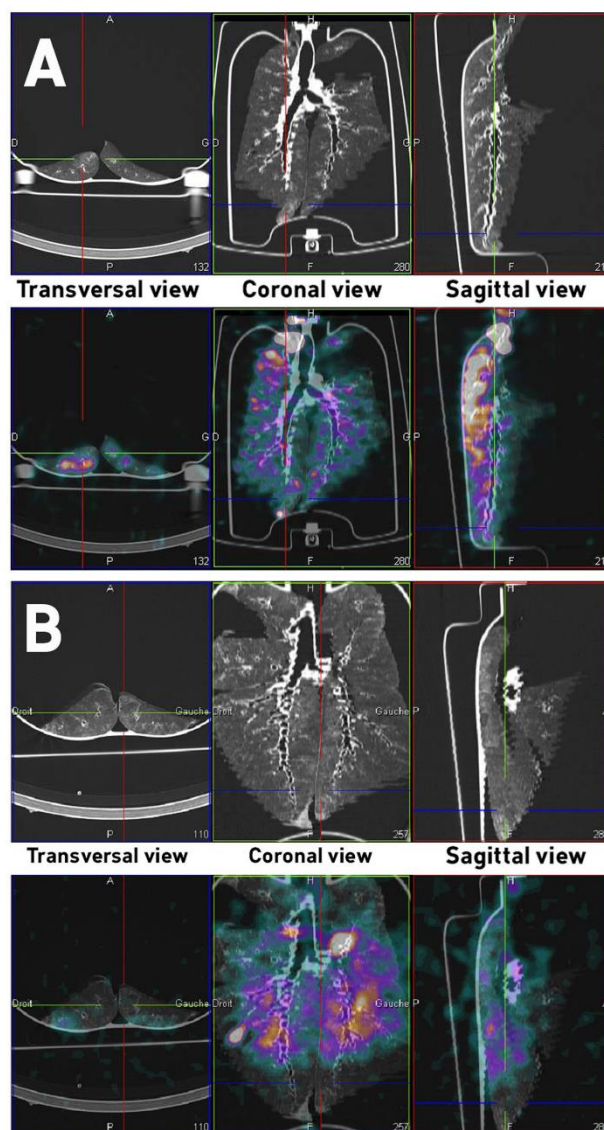


Figure 4. ^{99m}Tc -diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) images after three-dimensional reconstruction of the *ex vivo* model developed in this study. (A) Images from healthy model. (B) Images from IPF-mimicking lungs. Upper panels: tomography images. Lower panels: fusion of tomography and scintigraphic images.

Conclusion

Despite the release of new treatments, idiopathic pulmonary fibrosis is a devastating pulmonary disease with a poor survival rate. Thus, new therapies are needed to manage this disease and improve patients' quality of life. Inhaled therapies could be promising treatments for IPF. Indeed, pulmonary delivery could lead to less adverse events for equal or better efficiency. However, due to ethical considerations, *in vivo* aerosol regional deposition studies with IPF-suffering patients are scarce. Since the pulmonary route remains challenging due to the

Model	MMAD	Extra-thoracic regions	Inspiratory part	Expiratory part	Lungs
Diaz <i>et al.</i> ⁴⁹	1.7 μ m	12.6 \pm 3.0%	22%*	N/A	65.4 \pm 4.8%
Montigaud <i>et al.</i>	0.86 μ m	15 \pm 5%	19 \pm 15%	N/A	66 \pm 18%

Table 4. Deposited fractions in each components of the developed models. Data are expressed as mean \pm standard deviation of the nebulized dose of radioactivity. N/A: not applicable. Extra thoracic regions: 3D-printed replica or endotracheal tube. Inspiratory part: naso-buccal mask. Expiratory part: expiratory filter. MMAD: median mass aerodynamic diameter. *value calculated from available data.

decreased lung compliance, there is need for a useful tool for practical and inexpensive preclinical studies devoted to the local delivery of drugs to fibrotic lungs.

In this study, an *ex vivo* respiratory model of lung fibrosis was developed to assess aerosol regional deposition. This model consists in a 3D-printed adult upper airways replica connected to a porcine respiratory tract placed in a sealed enclosure. This experimental set-up allow to induce passive ventilation of lungs by inducing negative pressures within the enclosure (applying the same physical principle as intrapleural negative pressures observed in human breathing). Breathing pattern are easily and reproducibly controllable. Two RR were tested (*i.e.* 15 and 25 cycles/min) to experimentally assess 5 respiratory physiological measurements: MIF, TV, MV, R and C. Results obtained demonstrated that the breathing pattern of the IPF *ex vivo* model was varying in the same magnitude compared to *in vivo* data of IPF-suffering patients. Then, ^{81m}Kr planar scintigraphies were used to assess homogeneity of gas-ventilation of the developed IPF *ex vivo* model. It proved to be qualitatively comparable to gas-ventilation observed in patients^{15,16,20,44,53}. Besides, the homogeneity of the gas-ventilation leads to confirm the absence of any ventilation defect due to procedure used to decrease the pulmonary compliance of the IPF *ex vivo* model. Finally, the assessment of regional aerosol deposition was performed with ^{99m}Tc-DTPA planar and 3D SPECT-CT images. Results obtained showed similar qualitative regional aerosol deposition compared to those found for *in vivo* human studies. Thus, we successfully developed an *ex vivo* respiratory model to simulate the alterations of pulmonary mechanics seen in lung fibrosis. However, the developed fibrotic lung model suffers from some limitations, such as the supine position, the lack of lung surfactant and the lack of blood perfusion. Moreover, patients suffering from IPF could overcome their failing pulmonary mechanical properties by increasing respiratory workload, while we only applied fixed negative pressures. These limitations are outweighed by advantages of this *ex vivo* model. First of all, this pathological respiratory model seems to be a good and relevant surrogate model to animal experiments for aerosol regional deposition studies, particularly compared to rodent models^{55,56}. Moreover, the *ex vivo* respiratory model is fitting the 3R guidelines (Refine, Reduce and Replace). Secondly, this model is relatively cost-saving. Indeed, it does not need any animal husbandry nor sacrifice of research animals since we used porcine respiratory tracts, considered as waste, obtained from slaughterhouse which are considered as waste. Finally, the *ex vivo* model is easy to use and could be tuned as wanted. Hence, this work demonstrated that this original *ex vivo* respiratory model could reliably simulate IPF for aerosol regional deposition studies. Indeed, by proposing a model with low ethical restrictions and allowing alternative to animal and *in vitro* experiments, we hope that our work would support the preclinical development of inhaled therapies by providing more relevant and reliable data before clinical trials.

Materials and Methods

Materials. A stereolithographed adult replica of upper airways, including larynx, was made by three-dimensional printing technology. This Ear-Nose-Throat (ENT) replica was obtained by reconstruction from CT scan images of a healthy subject. Data were obtained from Saint-Etienne teaching hospital. At arrival each patient received an information note explicitly stating that their data could be used for research purposes. Furthermore, written consent from patient is obtained in the Radiology ward. Lastly, use of such data was supervised by the Ethic Committee of Saint-Etienne hospital. It integrated laryngeal structures to mimic vocal folds resistance. This 3D-printed replica was anatomically, geometrically and aerodynamically validated using several techniques (endoscopy and CT scans) and was previously used for several nasal and pulmonary aerosol deposition studies^{41,42,49,57}. Porcine respiratory tracts were obtained just after slaughter (DespiViandes, La Talaudière France), satisfying all French sanitary controls, and were used within 24 hours or frozen at -20°C depending on availability. At slaughtering time, swine were 6 months old, with 44% of female and 56% of male from three different species: large white, pietrain and landrace (with mainly large white). After removal of viscera, carcasses weighted 90 to 93 kg. Visual controls of wounds and sutures were achieved, and a bronchoscopy was performed to ensure the absence of significant obstruction of proximal bronchi. Lungs were placed in a sealed enclosure and ventilated using a depression generator (SuperDimension[®], Covidien, Dusseldorf, Germany). Figure S1 shows the set-up and is available in Supplementary information. The amplitude of depression during a respiratory cycle was -11 ± 2 kPa (equivalent -112 ± 20 cmH₂O) with a mean depression inside the enclosure of -9 kPa (-92 cmH₂O). These relatively high negative pressures were two time the expected values, according to West⁵⁰. This is probably due to the lack of perfusion and the unknown status of lung surfactant. Thirty tracts were used for measurements of respiratory mechanics. *Ex vivo* lungs were not used during more than 8 hours. For all experiments, the model was set in supine position.

Development of physical methods to reduce lung compliance mimicking the mechanical behavior of a fibrotic lung.

To develop a method to mimic the reduced compliance of fibrotic lungs, 3 physical procedures were tested. For the first method, depending of the size of lungs, 3 to 5 g of ethyl cyanoacrylate glue (G) were applied on chosen areas of lungs and let out to polymerize at least 5 minutes to rigidify the external surface of the lung. The second method used hot steam jets (S), delivered by a steam cleaner, applied for 2 to 3 minutes on the surface of the

lungs to induce heat denaturation of lung proteins. The third procedure was the combination of both glue and steam (GS), which were applied sequentially starting by S method with few minutes pause before using G method. During the application of the method, lungs were not inflated. For each method, 5 different incrementing stages were tested ($n = 4$): 0: Healthy stage (without treatment); and 4 stages where the physical methods were applied on 1: apices of upper lobes; 2: entire upper lobes; 3: entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: whole lungs. For each stage, respiratory mechanics measurements described below were performed (see the section below). Endpoint of this development was to determine the best physical method (among glue, steam or glue + steam) inducing the highest decrease in lung compliance with the lowest modification of pulmonary resistances. Values were expressed as relative value of the healthy stage of the corresponding method (*i.e.* lungs without changes of compliance), for each physical method tested (*i.e.* glue, steam, or glue + steam). This expression of results allowed to compare only the impact of the physical methods on pulmonary compliance without potential biases due to the intrinsic variability of replicates.

Assessment of respiratory mechanics. The enclosure was instrumented thanks to Biopac[®] system (Biopac, Goleta, CA, USA). Airflow at the ENT replica was followed with a pneumotachograph (TSD 117) while pressures in the enclosure were determined with a differential pressure transducer (TSD160D). Each component was connected to an amplifier (DA100C), connected to the acquisition hardware (MP160). Data were recorded for 4 minutes with AcqKnowledge[®] 5.0 software. Then, eight experimental values were calculated from airflow and pressure: tidal volume (TV), minute ventilation (MV), respiratory rate (RR), inspiratory time (IT), expiratory time (ET), total time (TT), resistances (R) and compliance (C). Mean inspiratory flow (MIF) was manually calculated using Microsoft Office Excel 365 (Microsoft, Redmond, USA). Breathing cycles were identified using the software, tidal volume was obtained by integrating the airflow, resistances were calculated by the difference between pressure inside and outside the enclosure divided by the airflow, and finally the lung compliance was calculated by dividing the volume variation by the pressure variation. IT was fixed at 1.3 s, while ET was fixed at 2.6 s to obtain a RR of 15 cycles per minute, or IT at 0.8 s and ET at 1.6 s to reach a RR of 25 cycles per minute. These breathing times led to a I:E ratio of 1:2. For each experiment, at least 40 breathing cycles were analyzed to calculate above-mentioned respiratory features and to determine mean \pm standard deviation and confidence interval.

We calculated the coefficient of TV, MV, R and C for each replicate to assess the reliability, with a threshold value was set at 15%. The coefficient of variation of TV, MV, R and C were calculated for the whole replication to assess the reproducibility, with a threshold value set at 30%.

Ventilation and regional aerosol deposition. The evaluation of regional ventilation was performed on 12 respiratory tracts using ^{81m}krypton (^{81m}Kr) scintigraphies³⁵. At each RR, an acquisition was realized with a naso-buccal mask (Ambu[®], Bordeaux, France) as interface. For the assessment of regional ventilation, two regions of interest (ROI) were drawn on each ventilation scintigraphy to identify left and right lung as well as central area and peripheral area³⁹. The aim of these experiments was to assess the homogeneity of the regional gas-ventilation of the *ex vivo* fibrotic lung model and thus, to confirm the absence of any ventilation defect due to a too strong application of physical methods used to decrease the pulmonary compliance.

Deposition experiments were performed ^{99m}technetium complexed with diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc-DTPA) as scintigraphic tracer. A 100MBq solution (3 mL) was placed in the Venticis II[®] jet nebulizer (Curium, Paris, France). Generated aerosol (MMAD of 0.86) reached the adult replica of upper airways through the mean of a naso-buccal mask (Ambu[®], Bordeaux, France). Here, we aimed to quantitatively assess the aerosol regional deposition in the different components of the *ex vivo* model of pulmonary fibrosis (naso-buccal mask, head replica and lungs) to compare our results to: i) the previously developed healthy *ex vivo* respiratory model^{41,42} (to determine the impact of the alteration of lung compliance on the aerosol regional deposition) and ii) to *in vivo* human data from IPF-suffering patients^{20,31,44} using similar nuclear imaging technique and administration procedure (to determine the reliability of the developed *ex vivo* fibrotic lung model compared to IPF patients in terms of aerosol regional deposition).

Two-dimensional scintigraphies were conducted on six respiratory tracts. Experiments were performed with a variable angle dual detector Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT/CT, SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, TN) with a matrix of 256 \times 256. Low-energy, high-resolution collimator (FWHM 8.3 mm at 10 cm) – tested weekly for uniformity (UFOV 533 mm \times 387 mm, CFOV 400 mm \times 290 mm) – were used. The inhalation experiments needed to assess the initial radioactive dose in the nebulizer. The dose was calculated from the difference of activity between the full and empty syringe with 1-min anterior/posterior scintigraphic images. After inhalation of the aerosol (until atomization of the nebulizer), each component of the system was imaged with 3-min anterior/posterior exposition: nebulize (with dead volume), expiratory filter, ENT replica and respiratory tract. For each image, a ROI was drawn while 3 external ROIs were delimited to assess background. The count of each part was determined with corrections for background radiation, radioactivity decay and tissue attenuation (correction factor calculated for each component). Results were expressed in terms of the nominal dose of radioactivity loaded in the nebulizer.

After 2D acquisition, a SPECT and CT acquisitions could be carried out on the respiratory tract to cartography the anatomical deposition of the aerosol. This 3D SPECT acquisition the respiratory tract consisting of 64 (2 \times 32) 30-sec images was coupled with a CT. Imaging parameters for this tomography were: 130 kV; 90mAs; 1.25 mm slice thickness; 0.9 mm increment; 1.6 mm pitch; rotation time of 1.5 s according to a previously developed protocol⁴². The associated hardware platform (Symbia net, Siemens) was used to review and to reconstruct the obtained images with the 3D Ordered-Subset Expectation Maximization (OSEM) algorithm. Default settings (8 subsets, 5 iterations) were used. Before reconstruction, the 3D Butterworth smoothing filter was applied with following parameters: cutoff: 0.45 cycles/cm; order: 5. The final images consisted of a 128 \times 128 image matrix, with a 1.23 zoom and a pixel size of 3.9 mm. During reconstruction, scatter correction was used for SPECT images. It was also used to correct the attenuation for CT images. CT and SPECT images were associated into sagittal, coronal and transverse views. There, one respiratory tract was used for these 3D images.

Statistical analyses. Results are expressed as mean \pm standard deviation (95% confidence interval). For development of the physical methods mimicking fibrosis, a non-Gaussian distribution was assumed due to the number of replicates, Kruskal–Wallis' test was performed. For respiratory mechanics measurements, Gaussian distribution was assessed with a Shapiro–Wilk and d'Agostino normality tests. If Gaussian distribution was validated, a repeated-measure one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons *post hoc* test was used. If distribution was not Gaussian, Friedman's test with Dunn's multiple comparisons *post hoc* test was performed.

For gas-ventilation studies, after assessing normality as described above, a paired *t*-test was used to compare left and right lung fraction of total counted radioactivity and central-to-peripheral ratio for each lung. Data were compared to those from the previously developed healthy *ex vivo* model⁴¹ with an unpaired *t*-test. The tested hypothesis was the existence of significant difference of regional ventilation repartition between healthy and IPF *ex vivo* models. All tests were two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Received: 31 July 2019; Accepted: 12 November 2019;

Published online: 29 November 2019

References

- Raghu, G. *et al.* An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 788–824 (2011).
- Duchemann, B. *et al.* Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur. Respir. J.* **50**, 1602419 (2017).
- Barratt, S. L., Creamer, A., Hayton, C. & Chaudhuri, N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview. *J. Clin. Med.*, **7**, (2018).
- Perez, E. R. F. *et al.* Incidence, Prevalence, and Clinical Course of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* **137**, 129–137 (2010).
- Poletti, V. *et al.* Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Prognostic Evaluation. *Respiration* **86**, 5–12 (2013).
- Collard, H. R. *et al.* Changes in Clinical and Physiologic Variables Predict Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 538–542 (2003).
- Zapletal, A., Houštěk, J., Samánek, M., Čopová, M. & Paul, T. Lung function in children and adolescents with idiopathic interstitial pulmonary fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **1**, 154–166 (1985).
- Javaheri, S. & Sicilian, L. Lung function, breathing pattern, and gas exchange in interstitial lung disease. *Thorax* **47**, 93–97 (1992).
- Renzi, G., Milic-Emili, J. & Grassino, A. E. The pattern of breathing in diffuse lung fibrosis. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **18**, 461–472 (1982).
- Renzi, G., Milic-Emili, J. & Grassino, A. E. Breathing Pattern in Sarcoidosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **465**, 482–490 (1986).
- Sansores, R. H. *et al.* Correlation between pulmonary fibrosis and the lung pressure–volume curve. *Lung* **174**, 315–323 (1996).
- Nava, S. & Rubini, F. Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **54**, 390–395 (1999).
- Davies, D., Crowther, J. S. & MacFarlane, A. Idiopathic progressive pulmonary fibrosis. *Thorax* **30**, 316–325 (1975).
- Crystal, R. G. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical, Histologic, Radiographic, Physiologic, Scintigraphic, Cytologic, and Biochemical Aspects. *Ann. Intern. Med.* **85**, 769 (1976).
- Eary, J. F., Fisher, M. C. & Cerqueira, M. D. Idiopathic pulmonary fibrosis. Another cause of ventilation/perfusion mismatch. *Clin. Nucl. Med.* **11**, 396–399 (1986).
- Pochis, W. T. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. A rare cause of scintigraphic ventilation-perfusion mismatch. *Clin. Nucl. Med.* **15**, 321–323 (1990).
- Agusti, A. G. N. *et al.* Mechanisms of Gas-exchange Impairment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 219–225 (1991).
- King, T. E. Diagnostic Advances in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *CHEST* **100**, 238–241 (1991).
- Fulmer, J. D., Roberts, W. C., von Gal, E. R. & Crystal, R. G. Small Airways in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Clin. Invest.* **60**, 595–610 (1977).
- Strickland, N. H., Hughes, J. M., Hart, D. A., Myers, M. J. & Lavender, J. P. Cause of regional ventilation-perfusion mismatching in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a combined CT and scintigraphic study. *Am. J. Roentgenol.* **161**, 719–725 (1993).
- Plantier, L. *et al.* Physiology of the lung in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* **27**, 170062 (2018).
- Baddini-Martinez, J. *et al.* Update on diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Bras. Pneumol.* **41**, 454–466 (2015).
- Elmufdi, F., Henke, C. A., Perlman, D. M., Tomic, R. & Kim, H. J. Novel Mechanisms and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Discov. Med.* **20**, 145–153 (2015).
- Collard, H. R. Improving Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The Race Has Just Begun. *CHEST* **151**, 527–528 (2017).
- Mogulkoc, N. *et al.* Pulmonary Function in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Referral for Lung Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 103–108 (2001).
- Martinez, F. *et al.* The Clinical Course of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **142**, (2005).
- Fernandez, I. E., Heinzlmann, K., Verleden, S. & Eickelberg, O. Characteristic Patterns in the Fibrotic Lung. Comparing Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, S34–S41 (2015).
- Antoniu, K. M., Wuyts, W., Wijsenbeek, M. & Wells, A. U. Medical Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 368–377 (2016).
- Diaz, K. T. *et al.* Delivery and Safety of Inhaled Interferon- γ in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **25**, 79–87 (2012).
- Maden, C. H. *et al.* Safety, tolerability and pharmacokinetics of GSK3008348, a novel integrin $\alpha v \beta 6$ inhibitor, in healthy participants. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **74**, 701–709 (2018).
- Kanazawa, M. *et al.* Assessment of pulmonary aerosol deposition and epithelial permeability in 99mTc-DTPA inhalation scintigram. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* **31**, 593–600 (1993).
- Schüpp, K. G. *et al.* In Vitro Determination of the Optimal Particle Size for Nebulized Aerosol Delivery to Infants. *J. Aerosol Med.* **18**, 225–235 (2005).
- Geiser, M. & Kreyling, W. G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 2 (2010).
- Baskin, M. I. Regional Deposition of Aerosolized Pentamidine. Effects of Body Position and Breathing Pattern. *Ann. Intern. Med.* **113**, 677 (1990).
- Oosthuizen, M. A., Oberholzer, H. M., Scriba, M. R., van der Spuy, W. J. & Pretorius, E. Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles. *Micron* **43**, 863–869 (2012).
- McKinney, W. *et al.* Pulmonary and cardiovascular responses of rats to inhalation of a commercial antimicrobial spray containing titanium dioxide nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* **24**, 447–457 (2012).

37. *Comparative Biology of the Normal Lung*. (Elsevier, 2015). doi:10.1016/C2012-0-01154-4
38. Köbrich, R., Rudolf, G. & Stahlhofen, W. A Mathematical Model of Mass Deposition in Man. *Ann. Occup. Hyg.* **38**, 15–23 (1994).
39. Kelly, J. T., Kimbell, J. S. & Asgharian, B. Deposition of fine and coarse aerosols in a rat nasal mold. *Inhal. Toxicol.* **13**, 577–588 (2001).
40. Phalen, R. F. & Oldham, M. J. Methods for modeling particle deposition as a function of age. *Respir. Physiol.* **128**, 119–130 (2001).
41. Perinel, S. *et al.* Development of an *ex vivo* human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
42. Perinel, S. *et al.* Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new *ex vivo* preclinical model. *Respir. Res.* **17**, (2016).
43. Olukogbon, K. L., Thomas, P., Colasanti, R., Hope-Gill, B. & Williams, E. M. Breathing pattern and breathlessness in idiopathic pulmonary fibrosis: An observational study. *Respirology*, **21**, 344–349
44. Watanabe, N., Inoue, T., Tomioka, S., Yamaji, T. & Endo, K. Discordant findings between krypton-81m gas and Tc-99m labeled ultrafine aerosol lung ventilation SPECT in two patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Clin. Nucl. Med.* **20**, 315–317 (1995).
45. Yeh, S. H., Liu, R. S., Wu, L. C., Peng, N. I. & Lu, J. Y. 99Tcm-HMPAO and 99Tcm-DTPA radioaerosol clearance measurements in idiopathic pulmonary fibrosis. *Nucl. Med. Commun.* **16**, 140–144 (1995).
46. Viidik, A. Connective tissues — possible implications of the temporal changes for the aging process. *Mech. Ageing Dev.* **9**, 267–285 (1979).
47. Lacin, T. *et al.* Safety of a thermal vessel sealer on main pulmonary vessels. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **31**, 482–485 (2007).
48. Aldous, I. G., Veres, S. P., Jahangir, A. & Lee, J. M. Differences in collagen cross-linking between the four valves of the bovine heart: a possible role in adaptation to mechanical fatigue. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **296**, H1898–H1906 (2009).
49. Raley, S. P. *et al.* A human-like *ex vivo* preclinical model for aerosol deposition studies. *Eur. Respir. J.* **46**, PA3581 (2015).
50. West, J. B. & West, J. B. *Pulmonary pathophysiology: the essentials*. (Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2012).
51. Bajc, M. *et al.* EANM guidelines for ventilation/perfusion scintigraphy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **36**, 1356–1370 (2009).
52. James, J. M. *et al.* 99TcmTechnegas and krypton-81m ventilation scintigraphy: a comparison in known respiratory disease. *Br. J. Radiol.* **65**, 1075–1082 (1992).
53. Agusti, C. *et al.* Clinical and functional assessment of patients with idiopathic pulmonary fibrosis: results of a 3 year follow-up. *Eur. Respir. J.* **7**, 643–650 (1994).
54. Mura, M. *et al.* Does technetium-99m diethylenetriaminepentaacetate clearance predict the clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis? *Curr. Respir. J.* **11**, 477–479 (2004).
55. Srour, N. & Thébaud, B. Mesenchymal Stromal Cells in Animal Bleomycin Pulmonary Fibrosis Models: A Systematic Review. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 1500–1510 (2015).
56. Jenkins, R. G. *et al.* An Official American Thoracic Society Workshop Report: Use of Animal Models for the Preclinical Assessment of Potential Therapies for Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 667–679 (2017).
57. Perinel, S. *et al.* Deposition pattern of aerosolized Legionella using an *ex vivo* human-porcine respiratory model. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **221**, 252–259 (2018).
58. Fazio, E. & Jones, T. Assessment of regional ventilation by continuous inhalation of radioactive krypton-81m. *Br. Med. J.* **3**, 673–676 (1975).
59. Newman, S. *et al.* Standardization of Techniques for Using Planar (2D) Imaging for Aerosol Deposition Assessment of Orally Inhaled Products. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **25**, S–10 (2012).
60. Rissler, J. *et al.* Deposition efficiency of inhaled particles (1.5–5000 nm) related to breathing pattern and lung function: an experimental study in healthy children and adults. *Part. Fibre Toxicol.* **14**, (2017).
61. Gobbi, A. *et al.* Short-term variability in respiratory impedance and effect of deep breath in asthmatic and healthy subjects with airway smooth muscle activation and unloading. *J. Appl. Physiol.* **115**, 708–715 (2013).
62. Spahija, J. A. & Grassino, A. Effects of pursed-lips breathing and expiratory resistive loading in healthy subjects. *J. Appl. Physiol.* **80**, 1772–1784 (1996).

Acknowledgements

We acknowledge DespiViandes for graciously giving access to porcine respiratory tracts. This work was funded by the French National Research Agency [ANR-17-CE19-0002-01].

Author contributions

Y.M., S.P.-R., L.P., N.P. and J.P. designed experiments. Y.M., S.P.-R., L.L., C.G., A.C., N.P. and J.P. conducted the experiments. Y.M. analyzed the data and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.


Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54479-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Moreover, human *in vivo* data lacks of precise mapping and quantification of aerosol deposition patterns in IPF. Thus, there is an urgent need for inexpensive preclinical studies devoted to the quantitative assessment of aerosol regional deposition in fibrotic lungs. Such studies would help to improve nebulization technologies for local administration to fulfill the unmet need for better treatments.

Airborne particles properties (e.g. aerodynamic size, hygroscopic properties, electrical surface charge, etc.) are some of the main parameters affecting regional deposition of aerosolized drugs within the respiratory tract. However, anatomical and physiological features (e.g. diameter and branching of airways, breathing frequency, tidal volume, etc.)^{32,33} also represent key factors in regional deposition. Although they allow to accurately study these parameters, *in vivo* human studies are scarce due to ethical considerations and costs involved, as radiolabeled aerosols are the gold standard method to assess regional deposition of inhaled particles within lungs³⁴. Consequently, animals (particularly rodents) are common surrogate models even if animal use also suffers from ethical restrictions^{35,36}. Animal models are also time-consuming and expensive due to costs involved in breeding and housing. Moreover, such models are different from humans in terms of anatomy of upper airways, bronchial divisions and lung segmentation³⁷. Ventilation patterns are also very different in rodents. As an example, breathing frequency at rest for rats is about 80 cycles per minute while it is 15 per minute for adult humans. Additionally, no model sufficiently reproduces the pathophysiological features of IPF lungs that it may be used for relevant aerosol deposition studies. These discrepancies are commonly recognized as biases in aerosol deposition patterns. Thus, extrapolation from these models to humans should be carefully performed. To overcome these limitations, mathematical and computational deposition models for inhaled particles were developed but were mainly based on extrapolation from healthy young adults^{38–40}. Moreover, these models are confronted to a data gap for some parameters, such as submicron sized particles or specific anatomical features. This lack of database is challenging for these models and lead to issues to validate obtained predictions. Consequently, inhalation studies require relevant and reliable respiratory models.

Therefore, based on previous works of our laboratory^{41,42}, this study aimed to develop an adult *ex vivo* respiratory model, which could be a useful tool for practical and less expensive preclinical studies devoted to the local delivery of drugs to fibrotic lungs. This respiratory model is composed of a 3D-printed Ear-Nose-Throat (ENT) replica connected to an *ex vivo* porcine respiratory tract placed in a sealed instrumented enclosure. To mimic some of the alterations associated with fibrosis, lungs were modified to reduce the lung compliance and to create restrictive abnormalities at lung bases and upper lobes representing fibrotic lesions. Then, lungs were ventilated by applying negative pressure in the enclosure to simulate pleural depression and, thus, passive ventilation. Aims of this work were to validate the reliability of this innovative *ex vivo* model of pulmonary fibrosis and to compare it, in terms of respiratory mechanics and features of aerosol regional deposition, to the previously developed healthy *ex vivo* respiratory model^{41,42} (i.e. before the modification performed to depict the physiological alterations associated with IPF) and to IPF-suffering patients^{7,8,10,12,19,20,31,43–45}. Consequently, this study is divided into 4 main parts: (i) development and comparison of various physical procedures to reduce the pulmonary compliance (ii) measurements of respiratory mechanics before and after modifications of lung tissue, (iii) assessment of regional gas-ventilation and (iv) regional aerosol deposition within fibrotic lungs.

Results and Discussion

Performance analysis of physical methods to reduce lung compliance mimicking the mechanical behavior of a fibrotic lung. These experiments aimed to find a reliable and reproducible method to simulate lung fibrosis on *ex vivo* porcine respiratory tracts (Fig. 1 and Tables S1 and S2 the Supplementary Information). Figure 1 presents the resistances and the dynamic compliance of the respiratory tract expressed as mean \pm standard deviation of the relative value of the “healthy” stage of the lungs (i.e. lungs with no modification). Resistances (R) with glue (G) method appeared to be uneven with important dispersion of data. Inversely, steam (S) method showed a much narrower dispersion and a slight modification of R when compared to the healthy stage. However, when reaching stage 4 (i.e. methods applied to whole lungs) with S method we observed an important increase of the standard deviation showing a lack of reproducibility for this specific stage (see Supplementary Information). Glue + steam (GS) method suffered from a wide dispersion of data as G method (Fig. 1A). Dynamic compliance of lung decreased with the incrementing stages of the three methods. The strongest variations of compliance were seen with G and GS method. S method induced a less important reduction of compliance (Fig. 1B).

Considering the presented results, G and GS methods were generating barely reproducible data, while S method was more reproducible and repeatable. One hypothesis explaining the differences between G and S methods is that G method is more likely to simulate a pleural disease while the thermal treatment of the S method is more likely to simulate “fibrotic lung pattern” by denaturing extracellular matrix proteins^{46–48}. Moreover, applying the S method on lung parenchyma induced a visual shrinking of the treated regions. However, we did not assess that this thermal treatment had any significant impact of the small airways, which exert a relative widening in parenchymal regions suffering from IPF^{19,21}. Thus, careful extrapolation should be made for this point, which should not impact the validity of aerosol deposition pattern. Therefore, we decided to select the S method as the more relevant method to generate modifications of lung parenchyma leading to impaired mechanical properties of the lung needed to simulate the decreased lung compliance observed in IPF. Lastly, as the aim of this study was to simulate a moderate IPF, it was decided to focus on stage 3 (i.e. physical method applied to entire upper lobes + bases of lower lobes). Indeed, this stage induces a slight modification of resistances for an important modification of compliance (Figs. S2–S4 in Supplementary Information). The selected method did not include mucus accumulation in the airways, which is an uncommon feature of IPF. Moreover, even if we were unable to precisely assess the mucus status in the broncho-alveolar regions, we could assume that mucus is present and could be accumulated in these regions as observed in IPF-suffering patients³.

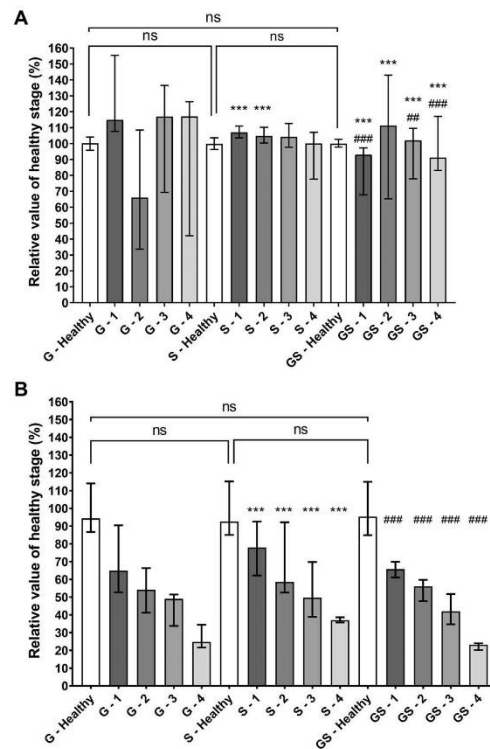


Figure 1. Variability of resistances (A) and compliance (B) with different fibrosis methods and stages (n = 4). G: Glue method; S: Steam method; GS: Glue + Steam method. 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. “G healthy” (respectively the “S healthy” and the “GS healthy”) corresponds to the lungs before modifications which will be induced at different stages by the G method (respectively the S method and the GS method). Data are presented as median and inter-quartile range of the relative value of the healthy stage of the corresponding method. ***Corresponds to $p < 0.0001$ when compared to glue method. ## and ### corresponds to $p < 0.001$ and $p < 0.0001$ respectively when compared to steam method. ns corresponds to non-significant.

Assessment of respiratory mechanics. *Overall results.* Table 1 reports mean \pm standard deviation values and 95% confidence interval of experimental data collected for the 30 *ex vivo* respiratory models. As expected, inspiratory time (IT), expiratory time (ET) and respiratory rates (RR) are very close from aimed values meaning that the developed respiratory model is tunable at will and reliable for these RR. Reliability and reproducibility data are presented in Tables S3 and S4 in the Supplementary Information. For “healthy” lungs, two RR were tested: 15 and 25 cycles/min. For “fibrotic” lungs, only 25 cycles/min was used. Fifteen cycles per minute was used as RR for healthy lungs in accordance with our previous data used to validate the “healthy” *ex vivo* respiratory model^{41,49}. The RR of 25 cycles per minute was chosen to mimic IPF. These RR are similar to those found for healthy adult subjects and IPF-suffering adult patients^{8,10,12}. According to experimental data and predefined thresholds –i.e. inter-individual variations about 30% and intra-individual variations about 15%– we assumed the reliability and the reproducibility of our model.

The healthy ex vivo respiratory model. Before application of S, tidal volume (TV) was 515.2 ± 77.0 mL and minute-ventilation (MV) was 7.86 ± 1.11 L/min. Mean inspiratory flow (MIF) was 361.4 ± 39.3 mL/s. Lastly, R values were 13.23 ± 3.41 cmH₂O/(L/s), while dynamic compliance (C) values were 90.44 ± 27.97 mL/cmH₂O. Observed results are consistent with previously published data concerning the healthy *ex vivo* respiratory model^{41,49} and in good accordance with data available in the literature from *in vivo* studies on healthy subjects¹⁰. MIF values appear to be similar to values obtained of healthy subjects as showed Renzi *et al.*¹⁰. Lastly, experimental C values, 90.44 ± 27.97 mL/cmH₂O, are almost 2 times lower than commonly considered as normal for healthy

	Healthy <i>ex vivo</i> model RR set as 15	Healthy <i>ex vivo</i> model RR set as 25	Healthy <i>in vivo</i> data	IPF <i>ex vivo</i> model RR set as 25	IPF <i>in vivo</i> data
Aimed RR (cycles/min)	15	25	15 ^{*10}	25	25 ^{*10}
Measured RR (cycles/min)	15.25 ± 0.49 [15.07; 15.43]	25.23 ± 0.82 [24.93; 25.53]	N/A	25.31 ± 0.89 [24.98; 25.64]	N/A
IT (s)	1.42 ± 0.09 [1.39; 1.46]	0.90 ± 0.07 [0.88; 0.93]	1.6 ^{*10}	0.85 ± 0.06 [0.83; 0.87]	0.9 ^{*10}
ET (s)	2.52 ± 0.11 [2.47; 2.56]	1.48 ± 0.07 [1.45; 1.51]	2.4 ^{*10}	1.52 ± 0.08 [1.50; 1.55]	around 1.5 ^{*10}
TV (mL)	513.8 ± 76.8 [485.2; 542.5]	297.1 ± 41.5 [281.6; 312.6]	500 ¹⁰	261.1 ± 44.3 [244.5; 277.6]	400 ^{*10}
MV (L/min)	7.84 ± 1.12 [7.42; 8.26]	7.49 ± 1.01 [7.11; 7.86]	7.5 ^{*10}	6.59 ± 1.10 [6.18; 7.00]	10 ^{*10}
MIF (mL/s)	360.6 ± 39.46 [345.9; 375.3]	328.8 ± 30.3 [317.5; 340.1]	400 ¹⁰ 440 ⁶⁰	305.8 ± 39.4 [291.1; 320.5]	400 ¹⁰ 440 ⁶⁰
R (cmH ₂ O/(L/s))	13.254 ± 3.29 [12.31; 14.76]	11.68 ± 1.52 [11.11; 12.25]	3.23 ± 0.29 ⁶⁰ 2.25 ± 0.28 ⁶¹	10.71 ± 1.07 [10.31; 11.11]	N/A
C (mL/cmH ₂ O)	90.16 ± 27.72 [79.81; 100.50]	96.28 ± 28.69 [85.57; 107.00]	167.22 ⁶²	69.39 ± 20.52 [61.73; 77.05]	50 ^{*710}

Table 1. Comparison of respiratory parameters and breathing pattern for each respiratory rate ($n = 30$; data are presented as mean \pm standard deviation [confidence interval 95%]). Respiratory rate (RR), inspiratory time (IT), expiratory time (ET), tidal volume (TV), minute ventilation (MV), mean inspiratory flow (MIF), resistances (R) and compliance (C). N/A: not applicable. *corresponds to value extracted from a plot. #corresponds to data recalculated from correspondent literature.

subjects. The relatively low values obtained with our model were most probably due to the lack of perfusion and the unknown status of surfactant.

The fibrotic *ex vivo* respiratory model. We applied the S method to the lungs to reduce lung compliance by modifying the mechanical properties of lungs parenchyma. We also modified the RR, which was set at 25, to better simulate the breathing pattern of an IPF-suffering patient. TV was 259.4 \pm 48.8 mL while MV was 6.62 \pm 1.10 L/min. Results found in literature showed that TV of IPF-suffering patient is around 400 mL^{8,10,12}, which is higher than the developed model. R and C values were respectively 10.54 \pm 1.39 cmH₂O/(L/s) and 70.27 \pm 21.65 mL/cmH₂O. C values appeared to be relatively close to human *in vivo* data. Indeed, Renzi¹⁰ *et al.* found values about 43,3 mL/cmH₂O and Zapletal⁷ *et al.* found a mean value of 50 mL/cmH₂O.

Physiological reliability of the respiratory *ex vivo* model. To sum up, all the 5 respiratory features assessed were found to be in the same order of magnitude as *in vivo* data for adult suffering of IPF and with previously obtained results on "healthy" *ex vivo* model. However, features by features, we observed that some results were different than expected values. Nevertheless, differences observed between our experimental data - particularly the low TV for the IPF model - and those obtained from literature could be due to patients' ability to increase muscle workload during inspiration and expiration to compensate lung stiffness, while we only applied fixed negative pressures. To compensate this phenomenon, we are currently developing a new depression generator allowing to tune the applied negative pressure in the enclosure. Moreover, some limitations of the *ex vivo* model could impact these respiratory physiological features as the lack of lung surfactant and the absence of blood perfusion. Indeed, surfactant is responsible for approximately 50% of compliance of the system⁵⁰. Perfusion of lungs is also an important parameter related to resistances.

Assessment of regional gas-ventilation by ^{81m}Kr scintigraphies. Figure 2 presents scintigraphic images of ^{81m}Kr gas-ventilation. Scintigraphic measurements of ventilation using ^{81m}Kr were made on 12 lungs whose compliance was modified with the S method at stage 3 (*i.e.* physical method applied to entire upper lobes + bases of lower lobes). Due to the very short half-life of ^{81m}Kr, repartition of this gas within lungs is widely considered to allow imaging of regional gas-ventilation⁵¹. Experiments showed a symmetry in left/right regional gas-ventilation with 50.10% \pm 3.60% in the left lung and 49.91% \pm 3.60 in the right lung. When compared to the previously developed healthy *ex vivo* model^{41,49}, there was no significant differences in terms of left/right regional gas-ventilation (Table 2, Fig. 2 and Figs. S5 and S6 in Supplementary Information). However, when taking into account the central-to-peripheral ratio, we observed that the penetration index of ^{81m}Kr gas in our IPF model, 53.10 \pm 1.98%, is lower compared to the data observed on the previous healthy *ex vivo* model, which exerted a central-to-peripheral ratio about 62.56%⁴¹ ($p < 0.0001$). However, literature lacks of quantitative data because ^{81m}Kr ventilation scintigraphies are usually coupled with ^{99m}Tc-albumin scintigraphy, to assess the qualitative ventilation/perfusion mismatch. Hence, comparison with available *in vivo* data was only qualitative. This gas-ventilation homogeneity is in good accordance with *in vivo* data obtained from patients suffering of IPF^{14-16,20,44,52}.

Regional aerosol deposition. *Healthy versus fibrotic ex vivo respiratory model: impact of the alteration of lung compliance on the aerosol regional deposition.* The regional aerosol deposition was recorded by planar scintigraphies using gamma-camera imaging (using 6 different respiratory tracts) and 3D scintigraphic images using

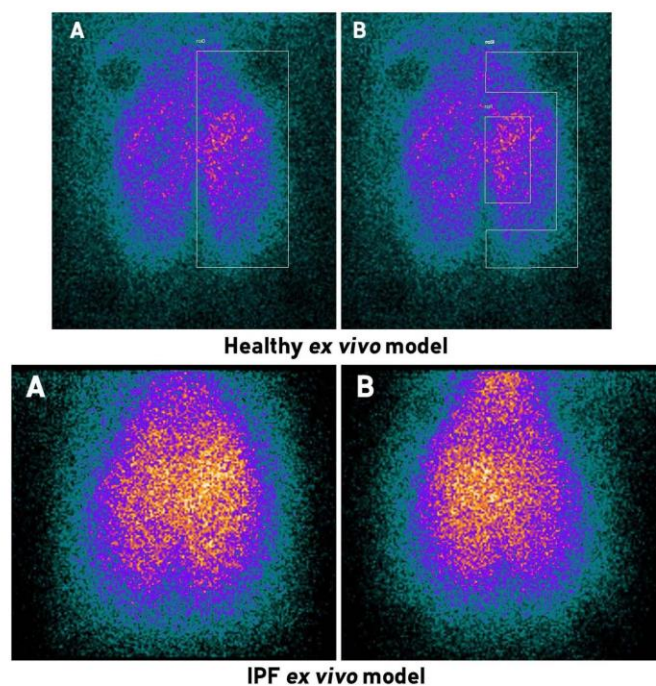


Figure 2. 81mKrypton (^{81m}Kr) scintigraphic images of IPF simulating lungs. A: anterior view. B: posterior view.

	IPF <i>ex vivo</i> model		Healthy <i>ex vivo</i> model ^{41,49}	
	Left lung	Right lung	Left lung	Right lung
^{81m}Kr repartition (% of total radioactivity)	50.10 ± 3.60 [47.81; 52.38]	49.91 ± 3.60 [47.62; 52.19]	50.31 ± 3.57 [48.33; 52.29]	49.69 ± 3.57 [47.71; 51.67]
Central/peripheral ratio (% of radioactivity in lung)	53.10 ± 1.98 [51.84; 54.36]		62.56 ± 6.24 [58.96; 66.16]	

Table 2. Left/right ventilation distribution and central/peripheral repartition within lung assessed with $^{81m}\text{Krypton}$ (^{81m}Kr). Data are presented as mean ± standard deviation [95% confidence interval] (n = 12).

Nebulized fraction	Interface	ENT	Lungs	Filters
10.60 ± 6.15%	1.34 ± 0.86%	1.26% ± 0.61%	5.60% ± 3.27%	2.39% ± 1.81%

Table 3. Deposited fractions along nebulization system as a proportion of nominal dose of radioactivity (mean ± standard deviation, n = 6). Nebulized fraction corresponds to the dose of ^{99m}Tc -DTPA that was efficiently nebulized. Interface: naso-buccal mask. ENT: 3D-printed Ears-Nose-Throat replica with connecting tube. Filters: filters connected between depression generator and the enclosure to receive aerosol leaking from the lungs.

SPECT-CT (n = 1). Deposited fractions along nebulization system and within respiratory tracts were quantified and results are shown in Table 3. The nebulized fraction corresponds to the proportion of the nominal dose that was efficiently nebulized (i.e. the initial activity injected into the nebulizer tank minus the remaining activity that remains after the nebulization process in the device). We observed on 2D scintigraphies (Fig. 3) that radiolabeled aerosol was deposited within lungs with a more intense signal in the central regions of the lungs.

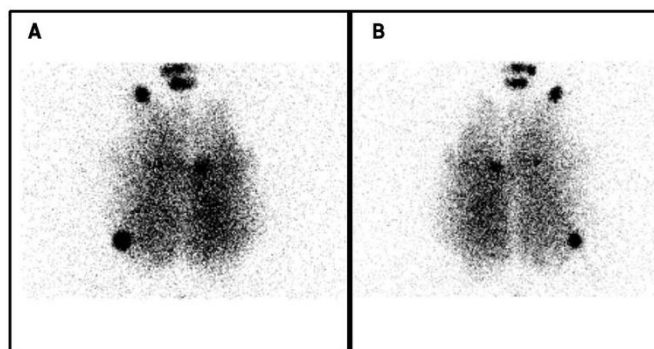


Figure 3. ^{99m}Tc -diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) planar images of the *ex vivo* model developed in this study ($n = 6$). (A) anterior view. (B) posterior view.

Finally, Fig. 4A illustrates the SPECT-CT aerosol deposition imaging within the healthy *ex vivo* model. As easily seen, the deposition pattern is quite homogeneous and the aerosol had a deep penetration in the healthy lung, to reach peripheral regions. At the contrary, Fig. 4B depicts a SPECT-CT image of a fibrotic lung after thermal treatment of the parenchyma with the S method at stage 3. It shows very poor deposition pattern in the bases of lower lobes.

Compared to data generated on the “healthy” *ex vivo* model⁴¹, aerosol penetration within the fibrotic lung was not as deep. Indeed, lung bases did not show the deposition of the radiolabeled aerosol. These two images showed that despite its limitations, this model presented regional aerosol deposition features associated with reduced lung compliance in regions treated to modify the mechanical properties of the parenchyma. However, it should be noted that the model only allowed to assess regional deposition of the aerosol. The absorption of the ^{99m}Tc -DTPA and its diffusion in the different cell types composing parenchyma and mesenchyme of the respiratory tract could not be assessed. The development of a more complex model with perfusion and ventilation is currently under development and could further answer to this limitation.

In a comparative manner, the study from Diaz *et al.*²⁹ focused on the delivery and the safety of inhaled interferon- γ . These experiments conducted on human were performed with a different nebulization technology (vibrating mesh nebulizer associated to inhalation-triggered nebulization), which generated an aerosol with larger particles while inhalations were performed with a deep and slow pattern. Therefore, comparison to this study should be carefully made. As seen in Table 4, values from Diaz *et al.* are similar from those obtained with our model, when values are expressed as percentage of the nebulized dose, meaning that the regional aerosol deposition patterns are relatively close.

Overall, the presented results showed that aerosol deposition was mainly observed in the non-treated zones of the lungs. This feature is comparable to the one observed in patients. While this particular point seemed to be controversial for inhaled therapies in IPF, it could be a compelling point in favor of such therapies because the healthy regions of the parenchyma could already present molecular abnormalities associated with the proliferation of the fibrotic lesions²¹. Thus, even if it is important to develop medical devices that will allow higher depositions into the “fibrotic” regions, it remains important to also treat healthy regions of the lungs.

Reliability of the developed *ex vivo* fibrotic lungs compared to IPF-suffering patients in terms of aerosol regional deposition. Literature of such regional aerosol deposition studies *in vivo* is very scarce and do not allow quantitative comparison to assess deposition patterns. Thus, only qualitative comparisons between present experimental results and data found in literature could be made. However, qualitatively, by comparing our results to *in vivo* human data of IPF-suffering patients using similar nuclear imaging technique and administration procedure, we support the conclusion that the *ex vivo* fibrotic respiratory model is in good accordance with existing *in vivo* inputs of IPF-suffering patients^{14,20,31,44,53,54}.

This model raises some limitations, such as the supine position during nebulization process that decreases penetration of airborne particles such as nebulization. As previously observed on a panel of nebulizers with different size distribution⁴², the largest particles – with a MMAD of $2.8\mu\text{m}$ – are mostly affected by impact while the smallest particles – with a MMAD of $0.23\mu\text{m}$ – are mostly affected by turbulence-driven diffusion and would not be significantly impacted by the supine position. Only intermediate particles – with a MMAD of $0.55\mu\text{m}$ – would be affected by the supine position, as the main mechanism driving their deposition is sedimentation. Hotspots are visible on planar scintigraphies due to parenchymal wound on the lungs, creating areas with less resistances and thus generating leakage of radioaerosol from the lungs toward inside this enclosure. However, a filter is placed in between the depression generator and the enclosure allowing to pick up aerosol.

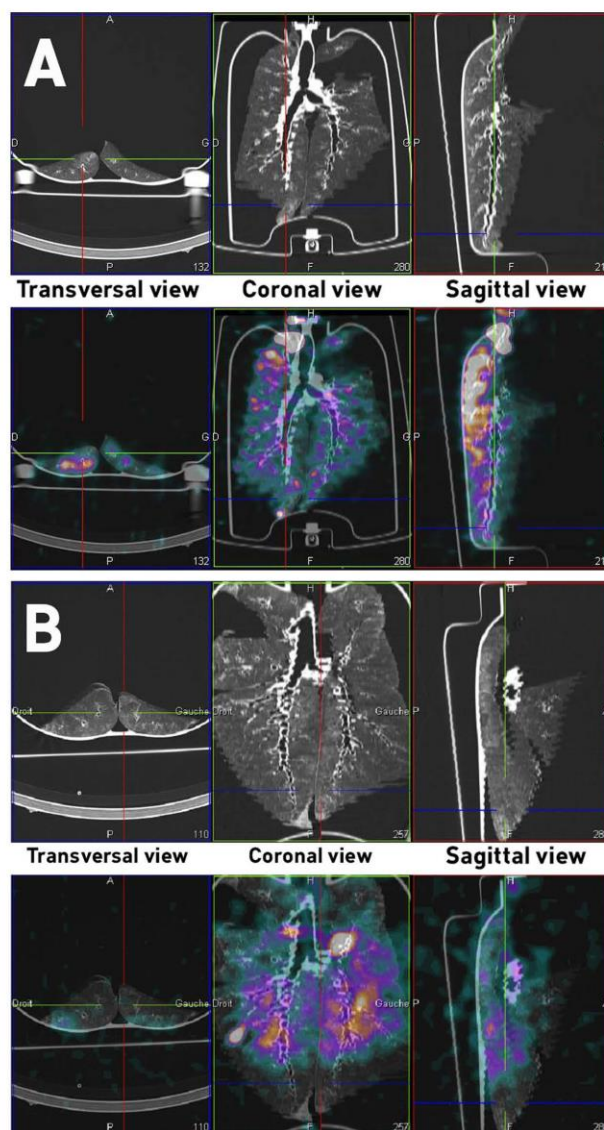


Figure 4. ^{99m}Tc -diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA) images after three-dimensional reconstruction of the *ex vivo* model developed in this study. (A) Images from healthy model. (B) Images from IPF-mimicking lungs. Upper panels: tomography images. Lower panels: fusion of tomography and scintigraphic images.

Conclusion

Despite the release of new treatments, idiopathic pulmonary fibrosis is a devastating pulmonary disease with a poor survival rate. Thus, new therapies are needed to manage this disease and improve patients' quality of life. Inhaled therapies could be promising treatments for IPF. Indeed, pulmonary delivery could lead to less adverse events for equal or better efficiency. However, due to ethical considerations, *in vivo* aerosol regional deposition studies with IPF-suffering patients are scarce. Since the pulmonary route remains challenging due to the

Model	MMAD	Extra-thoracic regions	Inspiratory part	Expiratory part	Lungs
Diaz <i>et al.</i> ⁴⁹	1.7 μ m	12.6 \pm 3.0%	22%*	N/A	65.4 \pm 4.8%
Montigaud <i>et al.</i>	0.86 μ m	15 \pm 5%	19 \pm 15%	N/A	66 \pm 18%

Table 4. Deposited fractions in each components of the developed models. Data are expressed as mean \pm standard deviation of the nebulized dose of radioactivity. N/A: not applicable. Extra thoracic regions: 3D-printed replica or endotracheal tube. Inspiratory part: naso-buccal mask. Expiratory part: expiratory filter. MMAD: median mass aerodynamic diameter. *value calculated from available data.

decreased lung compliance, there is need for a useful tool for practical and inexpensive preclinical studies devoted to the local delivery of drugs to fibrotic lungs.

In this study, an *ex vivo* respiratory model of lung fibrosis was developed to assess aerosol regional deposition. This model consists in a 3D-printed adult upper airways replica connected to a porcine respiratory tract placed in a sealed enclosure. This experimental set-up allow to induce passive ventilation of lungs by inducing negative pressures within the enclosure (applying the same physical principle as intrapleural negative pressures observed in human breathing). Breathing pattern are easily and reproducibly controllable. Two RR were tested (*i.e.* 15 and 25 cycles/min) to experimentally assess 5 respiratory physiological measurements: MIR, TV, MV, R and C. Results obtained demonstrated that the breathing pattern of the IPF *ex vivo* model was varying in the same magnitude compared to *in vivo* data of IPF-suffering patients. Then, ^{81m}Kr planar scintigraphies were used to assess homogeneity of gas-ventilation of the developed IPF *ex vivo* model. It proved to be qualitatively comparable to gas-ventilation observed in patients^{15,16,20,44,52}. Besides, the homogeneity of the gas-ventilation leads to confirm the absence of any ventilation defect due to procedure used to decrease the pulmonary compliance of the IPF *ex vivo* model. Finally, the assessment of regional aerosol deposition was performed with ^{99m}Tc-DTPA planar and 3D SPECT-CT images. Results obtained showed similar qualitative regional aerosol deposition compared to those found for *in vivo* human studies. Thus, we successfully developed an *ex vivo* respiratory model to simulate the alterations of pulmonary mechanics seen in lung fibrosis. However, the developed fibrotic lung model suffers from some limitations, such as the supine position, the lack of lung surfactant and the lack of blood perfusion. Moreover, patients suffering from IPF could overcome their failing pulmonary mechanical properties by increasing respiratory workload, while we only applied fixed negative pressures. These limitations are outweighed by advantages of this *ex vivo* model. First of all, this pathological respiratory model seems to be a good and relevant surrogate model to animal experiments for aerosol regional deposition studies, particularly compared to rodent models^{55,56}. Moreover, the *ex vivo* respiratory model is fitting the 3R guidelines (Refine, Reduce and Replace). Secondly, this model is relatively cost-saving. Indeed, it does not need any animal husbandry nor sacrifice of research animals since we used porcine respiratory tracts, considered as waste, obtained from slaughterhouse which are considered as waste. Finally, the *ex vivo* model is easy to use and could be tuned as wanted. Hence, this work demonstrated that this original *ex vivo* respiratory model could reliably simulate IPF for aerosol regional deposition studies. Indeed, by proposing a model with low ethical restrictions and allowing alternative to animal and *in vitro* experiments, we hope that our work would support the preclinical development of inhaled therapies by providing more relevant and reliable data before clinical trials.

Materials and Methods

Materials. A stereolithographed adult replica of upper airways, including larynx, was made by three-dimensional printing technology. This Ear-Nose-Throat (ENT) replica was obtained by reconstruction from CT scan images of a healthy subject. Data were obtained from Saint-Etienne teaching hospital. At arrival each patient received an information note explicitly stating that their data could be used for research purposes. Furthermore, written consent from patient is obtained in the Radiology ward. Lastly, use of such data was supervised by the Ethic Committee of Saint-Etienne hospital. It integrated laryngeal structures to mimic vocal folds resistance. This 3D-printed replica was anatomically, geometrically and aerodynamically validated using several techniques (endoscopy and CT scans) and was previously used for several nasal and pulmonary aerosol deposition studies^{41,42,49,57}. Porcine respiratory tracts were obtained just after slaughter (DespiViandes, La Talaudière France), satisfying all French sanitary controls, and were used within 24 hours or frozen at -20°C depending on availability. At slaughtering time, swine were 6 months old, with 44% of female and 56% of male from three different species: large white, pietrain and landrace (with mainly large white). After removal of viscera, carcasses weighted 90 to 93 kg. Visual controls of wounds and sutures were achieved, and a bronchoscopy was performed to ensure the absence of significant obstruction of proximal bronchi. Lungs were placed in a sealed enclosure and ventilated using a depression generator (SuperDimension[®], Covidien, Dusseldorf, Germany). Figure S1 shows the set-up and is available in Supplementary information. The amplitude of depression during a respiratory cycle was -11 ± 2 kPa (equivalent -112 ± 20 cmH₂O) with a mean depression inside the enclosure of -9 kPa (-92 cmH₂O). These relatively high negative pressures were two time the expected values, according to West⁵⁰. This is probably due to the lack of perfusion and the unknown status of lung surfactant. Thirty tracts were used for measurements of respiratory mechanics. *Ex vivo* lungs were not used during more than 8 hours. For all experiments, the model was set in supine position.

Development of physical methods to reduce lung compliance mimicking the mechanical behavior of a fibrotic lung.

To develop a method to mimic the reduced compliance of fibrotic lungs, 3 physical procedures were tested. For the first method, depending of the size of lungs, 3 to 5 g of ethyl cyanoacrylate glue (G) were applied on chosen areas of lungs and let out to polymerize at least 5 minutes to rigidify the external surface of the lung. The second method used hot steam jets (S), delivered by a steam cleaner, applied for 2 to 3 minutes on the surface of the

lungs to induce heat denaturation of lung proteins. The third procedure was the combination of both glue and steam (GS), which were applied sequentially starting by S method with few minutes pause before using G method. During the application of the method, lungs were not inflated. For each method, 5 different incrementing stages were tested ($n = 4$): 0: Healthy stage (without treatment); and 4 stages where the physical methods were applied on 1: apices of upper lobes; 2: entire upper lobes; 3: entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: whole lungs. For each stage, respiratory mechanics measurements described below were performed (see the section below). Endpoint of this development was to determine the best physical method (among glue, steam or glue + steam) inducing the highest decrease in lung compliance with the lowest modification of pulmonary resistances. Values were expressed as relative value of the healthy stage of the corresponding method (*i.e.* lungs without changes of compliance), for each physical method tested (*i.e.* glue, steam, or glue + steam). This expression of results allowed to compare only the impact of the physical methods on pulmonary compliance without potential biases due to the intrinsic variability of replicates.

Assessment of respiratory mechanics. The enclosure was instrumented thanks to Biopac[®] system (Biopac, Goleta, CA, USA). Airflow at the ENT replica was followed with a pneumotachograph (TSD 117) while pressures in the enclosure were determined with a differential pressure transducer (TSD160D). Each component was connected to an amplifier (DA100C), connected to the acquisition hardware (MP160). Data were recorded for 4 minutes with AcqKnowledge[®] 5.0 software. Then, eight experimental values were calculated from airflow and pressure: tidal volume (TV), minute ventilation (MV), respiratory rate (RR), inspiratory time (IT), expiratory time (ET), total time (TT), resistances (R) and compliance (C). Mean inspiratory flow (MIF) was manually calculated using Microsoft Office Excel 365 (Microsoft, Redmond, USA). Breathing cycles were identified using the software, tidal volume was obtained by integrating the airflow, resistances were calculated by the difference between pressure inside and outside the enclosure divided by the airflow, and finally the lung compliance was calculated by dividing the volume variation by the pressure variation. IT was fixed at 1.3 s, while ET was fixed at 2.6 s to obtain a RR of 15 cycles per minute, or IT at 0.8 s and ET at 1.6 s to reach a RR of 25 cycles per minute. These breathing times led to a I:E ratio of 1:2. For each experiment, at least 40 breathing cycles were analyzed to calculate above-mentioned respiratory features and to determine mean \pm standard deviation and confidence interval.

We calculated the coefficient of TV, MV, R and C for each replicate to assess the reliability, with a threshold value was set at 15%. The coefficient of variation of TV, MV, R and C were calculated for the whole replication to assess the reproducibility, with a threshold value set at 30%.

Ventilation and regional aerosol deposition. The evaluation of regional ventilation was performed on 12 respiratory tracts using ^{81m}krypton (^{81m}Kr) scintigraphies⁵⁵. At each RR, an acquisition was realized with a naso-buccal mask (Ambu[®], Bordeaux, France) as interface. For the assessment of regional ventilation, two regions of interest (ROI) were drawn on each ventilation scintigraphy to identify left and right lung as well as central area and peripheral area⁵⁹. The aim of these experiments was to assess the homogeneity of the regional gas-ventilation of the *ex vivo* fibrotic lung model and thus, to confirm the absence of any ventilation defect due to a too strong application of physical methods used to decrease the pulmonary compliance.

Deposition experiments were performed ^{99m}technetium complexed with diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc-DTPA) as scintigraphic tracer. A 100MBq solution (3 mL) was placed in the Venticis II[®] jet nebulizer (Curium, Paris, France). Generated aerosol (MMAD of 0.86) reached the adult replica of upper airways through the mean of a naso-buccal mask (Ambu[®], Bordeaux, France). Here, we aimed to quantitatively assess the aerosol regional deposition in the different components of the *ex vivo* model of pulmonary fibrosis (naso-buccal mask, head replica and lungs) to compare our results to: i) the previously developed healthy *ex vivo* respiratory model^{41,42} (to determine the impact of the alteration of lung compliance on the aerosol regional deposition) and ii) to *in vivo* human data from IPF-suffering patients^{20,31,44} using similar nuclear imaging technique and administration procedure (to determine the reliability of the developed *ex vivo* fibrotic lung model compared to IPF patients in terms of aerosol regional deposition).

Two-dimensional scintigraphies were conducted on six respiratory tracts. Experiments were performed with a variable angle dual detector Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT/CT, SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, TN) with a matrix of 256 \times 256. Low-energy, high-resolution collimator (FWHM 8.3 mm at 10 cm) – tested weekly for uniformity (UFOV 533 mm \times 387 mm, CFOV 400 mm \times 290 mm) – were used. The inhalation experiments needed to assess the initial radioactive dose in the nebulizer. The dose was calculated from the difference of activity between the full and empty syringe with 1-min anterior/posterior scintigraphic images. After inhalation of the aerosol (until atomization of the nebulizer), each component of the system was imaged with 3-min anterior/posterior exposition: nebulize (with dead volume), expiratory filter, ENT replica and respiratory tract. For each image, a ROI was drawn while 3 external ROIs were delimited to assess background. The count of each part was determined with corrections for background radiation, radioactivity decay and tissue attenuation (correction factor calculated for each component). Results were expressed in terms of the nominal dose of radioactivity loaded in the nebulizer.

After 2D acquisition, a SPECT and CT acquisitions could be carried out on the respiratory tract to cartography the anatomical deposition of the aerosol. This 3D SPECT acquisition the respiratory tract consisting of 64 (2 \times 32) 30-sec images was coupled with a CT. Imaging parameters for this tomography were: 130 kV; 90mAs; 1.25 mm slice thickness; 0.9 mm increment; 1.6 mm pitch; rotation time of 1.5 s according to a previously developed protocol⁴². The associated hardware platform (Symbia net, Siemens) was used to review and to reconstruct the obtained images with the 3D Ordered-Subset Expectation Maximization (OSEM) algorithm. Default settings (8 subsets, 5 iterations) were used. Before reconstruction, the 3D Butterworth smoothing filter was applied with following parameters: cutoff: 0.45 cycles/cm; order: 5. The final images consisted of a 128 \times 128 image matrix, with a 1.23 zoom and a pixel size of 3.9 mm. During reconstruction, scatter correction was used for SPECT images. It was also used to correct the attenuation for CT images. CT and SPECT images were associated into sagittal, coronal and transverse views. There, one respiratory tract was used for these 3D images.

Statistical analyses. Results are expressed as mean \pm standard deviation (95% confidence interval). For development of the physical methods mimicking fibrosis, a non-Gaussian distribution was assumed due to the number of replicates, Kruskal–Wallis' test was performed. For respiratory mechanics measurements, Gaussian distribution was assessed with a Shapiro–Wilk and d'Agostino normality tests. If Gaussian distribution was validated, a repeated-measure one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons *post hoc* test was used. If distribution was not Gaussian, Friedman's test with Dunn's multiple comparisons *post hoc* test was performed.

For gas-ventilation studies, after assessing normality as described above, a paired *t*-test was used to compare left and right lung fraction of total counted radioactivity and central-to-peripheral ratio for each lung. Data were compared to those from the previously developed healthy *ex vivo* model⁴¹ with an unpaired *t*-test. The tested hypothesis was the existence of significant difference of regional ventilation repartition between healthy and IPF *ex vivo* models. All tests were two-sided and $p < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Received: 31 July 2019; Accepted: 12 November 2019;

Published online: 29 November 2019

References

- Raghu, G. *et al.* An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Statement: Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Evidence-based Guidelines for Diagnosis and Management. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 788–824 (2011).
- Duchemann, B. *et al.* Prevalence and incidence of interstitial lung diseases in a multi-ethnic county of Greater Paris. *Eur. Respir. J.* **50**, 1602419 (2017).
- Barratt, S. L., Creamer, A., Hayton, C. & Chaudhuri, N. Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF): An Overview. *J. Clin. Med.*, **7**, (2018).
- Perez, E. R. *et al.* Incidence, Prevalence, and Clinical Course of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Chest* **137**, 129–137 (2010).
- Poletti, V. *et al.* Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Prognostic Evaluation. *Respiration* **86**, 5–12 (2013).
- Collard, H. R. *et al.* Changes in Clinical and Physiologic Variables Predict Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 538–542 (2003).
- Zapletal, A., Houštěk, J., Samánek, M., Čopová, M. & Paul, T. Lung function in children and adolescents with idiopathic interstitial pulmonary fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **1**, 154–166 (1985).
- Javaheri, S. & Sicilian, L. Lung function, breathing pattern, and gas exchange in interstitial lung disease. *Thorax* **47**, 93–97 (1992).
- Renzi, G., Milic-Emili, J. & Grassino, A. E. The pattern of breathing in diffuse lung fibrosis. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **18**, 461–472 (1982).
- Renzi, G., Milic-Emili, J. & Grassino, A. E. Breathing Pattern in Sarcoidosis and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **465**, 482–490 (1986).
- Sansores, R. H. *et al.* Correlation between pulmonary fibrosis and the lung pressure–volume curve. *Lung* **174**, 315–323 (1996).
- Nava, S. & Rubini, E. Lung and chest wall mechanics in ventilated patients with end stage idiopathic pulmonary fibrosis. *Thorax* **54**, 390–395 (1999).
- Davies, D., Crowther, J. S. & MacFarlane, A. Idiopathic progressive pulmonary fibrosis. *Thorax* **30**, 316–325 (1975).
- Crystal, R. G. Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical, Histologic, Radiographic, Physiologic, Scintigraphic, Cytologic, and Biochemical Aspects. *Ann. Intern. Med.* **85**, 769 (1976).
- Eary, J. F., Fisher, M. C. & Cerqueira, M. D. Idiopathic pulmonary fibrosis. Another cause of ventilation/perfusion mismatch. *Clin. Nucl. Med.* **11**, 396–399 (1986).
- Pochis, W. T. *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis. A rare cause of scintigraphic ventilation-perfusion mismatch. *Clin. Nucl. Med.* **15**, 321–323 (1990).
- Agusti, A. G. N. *et al.* Mechanisms of Gas-exchange Impairment in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **143**, 219–225 (1991).
- King, T. E. Diagnostic Advances in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *CHEST* **100**, 238–241 (1991).
- Fulmer, J. D., Roberts, W. C., von Gal, E. R. & Crystal, R. G. Small Airways in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Clin. Invest.* **60**, 595–610 (1977).
- Strickland, N. H., Hughes, J. M., Hart, D. A., Myers, M. J. & Lavender, J. P. Cause of regional ventilation-perfusion mismatching in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a combined CT and scintigraphic study. *Am. J. Roentgenol.* **161**, 719–725 (1993).
- Plantier, L. *et al.* Physiology of the lung in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. Rev.* **27**, 170062 (2018).
- Baddini-Martinez, J. *et al.* Update on diagnosis and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Bras. Pneumol.* **41**, 454–466 (2015).
- Elmufdi, F., Henke, C. A., Perlman, D. M., Tomic, R. & Kim, H. J. Novel Mechanisms and Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Discov. Med.* **20**, 145–153 (2015).
- Collard, H. R. Improving Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: The Race Has Just Begun. *CHEST* **151**, 527–528 (2017).
- Mogulkoc, N. *et al.* Pulmonary Function in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Referral for Lung Transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 103–108 (2001).
- Martinez, F. *et al.* The Clinical Course of Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. **142**, (2005).
- Fernandez, I. E., Heinzlmann, K., Verleden, S. & Eickelberg, O. Characteristic Patterns in the Fibrotic Lung. Comparing Idiopathic Pulmonary Fibrosis with Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, S34–S41 (2015).
- Antoniu, K. M., Wuyts, W., Wijsenbeek, M. & Wells, A. U. Medical Therapy in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **37**, 368–377 (2016).
- Diaz, K. T. *et al.* Delivery and Safety of Inhaled Interferon- γ in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **25**, 79–87 (2012).
- Maden, C. H. *et al.* Safety, tolerability and pharmacokinetics of GSK3008348, a novel integrin $\alpha v \beta 6$ inhibitor, in healthy participants. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **74**, 701–709 (2018).
- Kanazawa, M. *et al.* Assessment of pulmonary aerosol deposition and epithelial permeability in 99mTc-DTPA inhalation scintigram. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* **31**, 593–600 (1993).
- Schüpp, K. G. *et al.* In Vitro Determination of the Optimal Particle Size for Nebulized Aerosol Delivery to Infants. *J. Aerosol Med.* **18**, 225–235 (2005).
- Geiser, M. & Kreyling, W. G. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **7**, 2 (2010).
- Baskin, M. I. Regional Deposition of Aerosolized Pentamidine. Effects of Body Position and Breathing Pattern. *Ann. Intern. Med.* **113**, 677 (1990).
- Oosthuizen, M. A., Oberholzer, H. M., Scriba, M. R., van der Spuy, W. J. & Pretorius, E. Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles. *Micron* **43**, 863–869 (2012).
- McKinney, W. *et al.* Pulmonary and cardiovascular responses of rats to inhalation of a commercial antimicrobial spray containing titanium dioxide nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* **24**, 447–457 (2012).

3. Informations supplémentaires

Development of an *ex vivo* preclinical respiratory model of idiopathic pulmonary fibrosis for aerosol regional studies

Yoann Montigaud¹, Sophie Périnel-Ragey^{2,3}, Laurent Plantier⁴, Lara Leclerc¹, Clémence Goy^{2,3}, Anthony Clotagatide^{2,3}, Nathalie Prévôt^{2,3}, Jérémie Pourchez¹

¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F - 42023 Saint-Etienne France.

²INSERM U 1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, F-42023, France.

³CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France.

⁴CEPR/INSERM UMR I 100, LabexMabImprove & Service de Pneumologie et Explorations Fonctionnelles Respiratoires, Hôpital Bretonneau, Université François Rabelais, Tours, France.

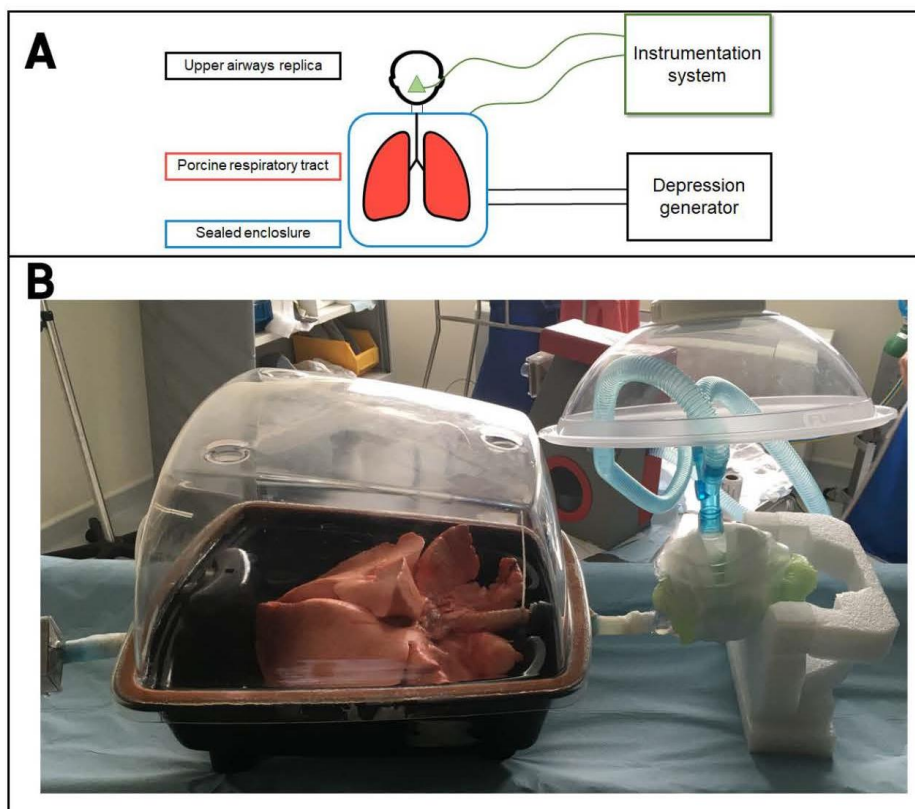


Figure S1 – A: Scheme of the preclinical respiratory model of idiopathic pulmonary fibrosis. B: Photography of the setup in the Nuclear Medicine ward for aerosol deposition study

Results and discussion

Analysis of physical methods to reduce lung compliance mimicking the mechanical behavior of IPF lung

Reliability:

Replicate	Respiratory features	Method	Healthy	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4
1	TV	G	0,70%	0,72%	0,60%	0,74%	0,97%
		S	1,57%	0,90%	0,69%	0,73%	1,12%
		GS	0,68%	0,64%	1,58%	0,66%	1,13%
	MV	G	0,71%	0,70%	0,62%	0,76%	4,35%
		S	1,56%	0,90%	0,72%	0,71%	1,10%
		GS	0,68%	0,64%	1,58%	0,63%	1,14%
	R	G	4,38%	4,19%	82,90%	3,62%	88,29%
		S	6,09%	4,85%	4,19%	4,74%	4,60%
		GS	3,91%	4,09%	8,24%	4,45%	6,05%
	C	G	7,53%	5,46%	3,95%	3,92%	3,53%
		S	10,87%	8,50%	8,71%	7,67%	5,02%
		GS	8,11%	6,50%	6,25%	5,18%	4,10%
2	TV	G	1,51%	0,79%	1,37%	1,10%	2,34%
		S	0,65%	0,98%	0,84%	1,14%	0,86%
		GS	0,72%	0,50%	0,92%	7,25%	4,36%
	MV	G	1,52%	0,79%	1,39%	1,10%	2,33%
		S	0,66%	0,97%	0,85%	1,14%	0,86%
		GS	0,71%	0,56%	0,91%	7,80%	14,92%
	R	G	5,20%	3,63%	93,04%	97,36%	71,39%
		S	4,43%	4,25%	4,77%	4,79%	74,33%
		GS	3,86%	87,13%	71,78%	84,63%	59,73%
	C	G	7,20%	6,60%	6,12%	5,81%	5,04%
		S	8,19%	8,15%	5,53%	5,69%	4,14%
		GS	8,65%	6,64%	7,03%	9,06%	13,29%
3	TV	G	0,95%	0,78%	0,90%	0,76%	1,05%
		S	0,64%	0,77%	0,47%	0,30%	0,40%
		GS	0,79%	21,26%	4,30%	0,65%	0,70%
	MV	G	0,97%	0,79%	0,91%	0,78%	1,05%
		S	0,65%	0,78%	0,48%	0,32%	0,42%
		GS	0,80%	21,26%	4,18%	0,66%	0,71%
	R	G	4,26%	4,72%	4,39%	3,64%	3,40%
		S	4,43%	4,66%	4,08%	3,71%	4,07%
		GS	5,00%	22,66%	15,62%	3,45%	5,75%
	C	G	8,43%	5,66%	5,08%	4,86%	4,74%
		S	8,37%	6,30%	5,30%	5,00%	4,87%
		GS	11,38%	24,82%	6,11%	5,24%	3,58%

Table S1 - Coefficient of variation of tidal volume (TV), minute-ventilation (MV), resistances (R) and compliance (C) for each method and each replicate at each stage. 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. "healthy" corresponds to the lungs before modifications, which will be induced at different stages by the corresponding method. Reliability threshold was set at 15%.

Reproducibility:

Method	Respiratory Features	Stages				
		Healthy	I	2	3	4
S	TV	5,26%	8,22%	8,16%	7,99%	7,24%
	MV	4,58%	11,83%	13,38%	13,07%	7,71%
	R	5,75%	5,19%	6,39%	8,24%	38,75%
	C	20,68%	21,60%	31,03%	28,19%	8,88%
G	TV	5,55%	13,15%	12,83%	11,52%	14,36%
	MV	2,57%	9,69%	9,78%	6,86%	22,97%
	R	5,79%	19,12%	68,90%	47,14%	63,98%
	C	16,39%	26,80%	23,29%	19,79%	24,35%
GS	TV	6,80%	4,11%	5,14%	12,60%	7,22%
	MV	7,41%	11,86%	6,91%	7,61%	9,05%
	R	4,41%	43,13%	48,12%	40,77%	42,04%
	C	23,64%	21,28%	17,64%	25,26%	15,74%

Table S2 - Coefficient of variation of tidal volume (TV), minute-ventilation (MV), resistances (R) and compliance (C) of all replicates for each method at each stage. 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. "healthy" corresponds to the lungs before modifications, which will be induced at different stages by the corresponding method. Reproducibility threshold was set at 30%.

Statistical analyses

Glue (G) method:

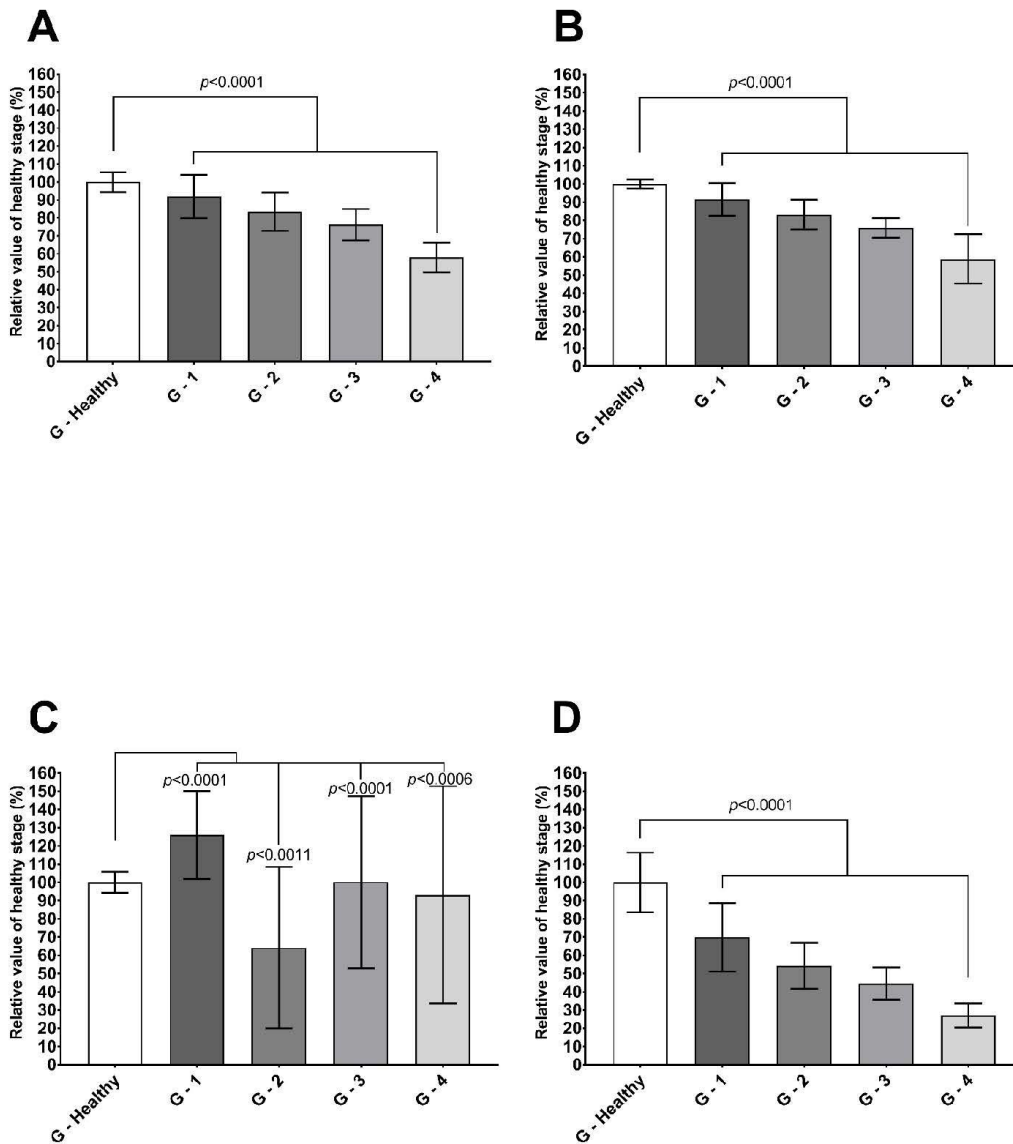


Figure S2 - Variability of tidal volume (A), minute-ventilation (B), resistances (C) and compliance (D) for different stages (n = 4). 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. "G healthy" corresponds to the lungs before modifications, which will be induced at different stages by the G method. Data are presented as mean \pm SD of the relative value of the healthy stage of the corresponding method

Steam (S) method:

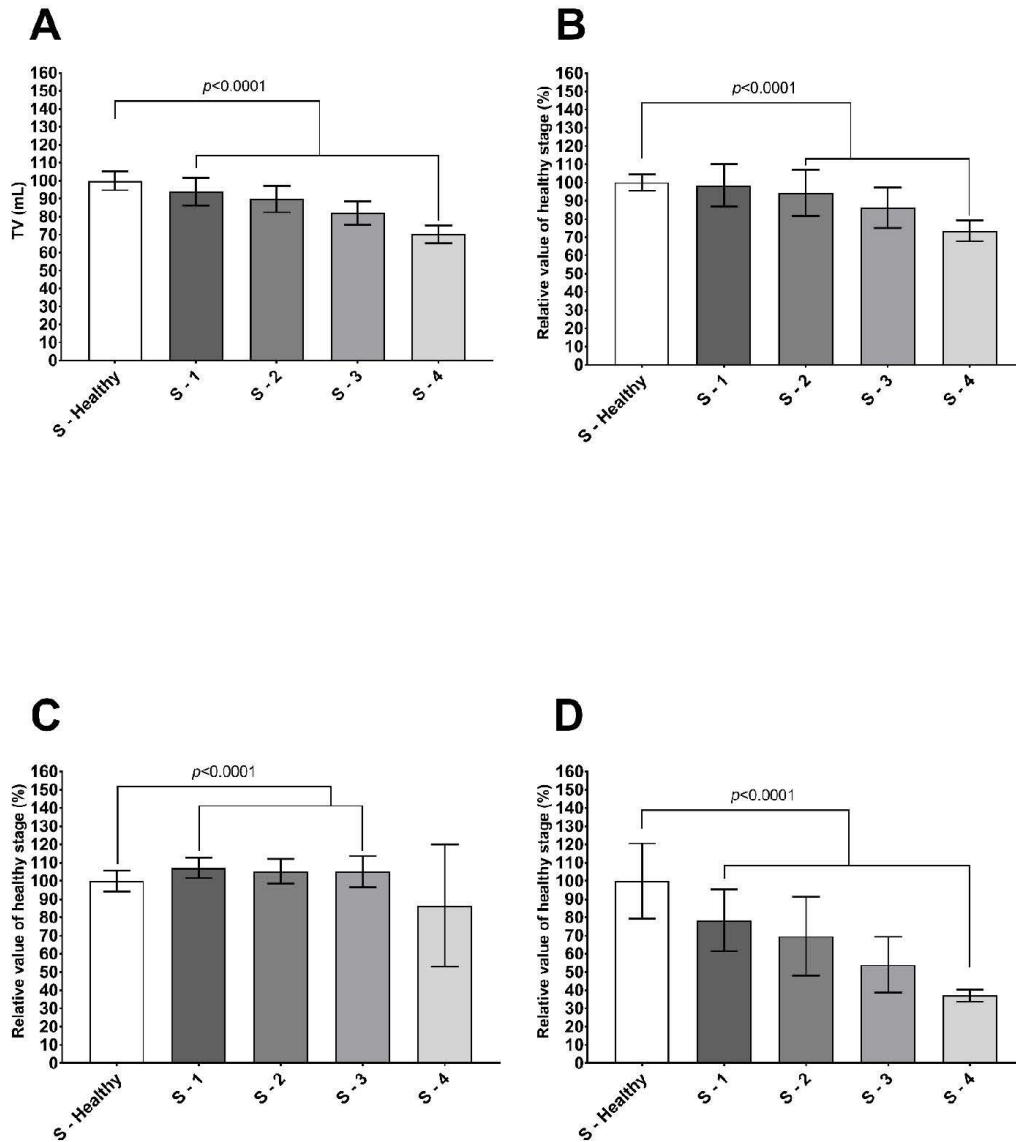


Figure S3 - Variability of tidal volume (A), minute-ventilation (B), resistances (C) and compliance (D) for different stages ($n = 4$). 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. "S healthy" corresponds to the lungs before modifications, which will be induced at different stages by the S method. Data are presented as mean \pm SD of the relative value of the healthy stage of the corresponding method

Glue and steam (GS) method:

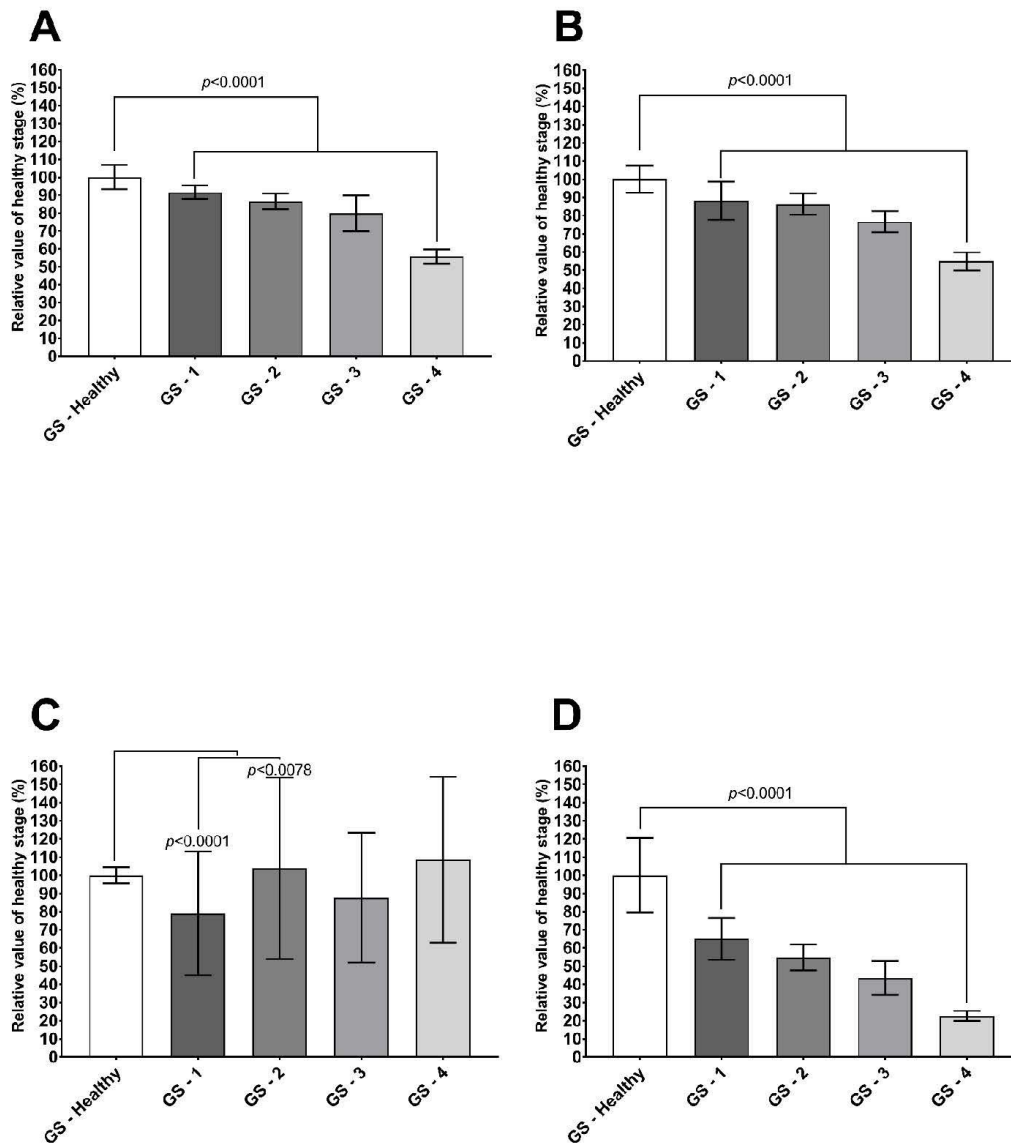


Figure S4 - Variability of tidal volume (A), minute-ventilation (B), resistances (C) and compliance (D) for different stages ($n = 4$). 1: fibrosis of apices of upper lobe; 2: fibrosis of entire upper lobes; 3: fibrosis of entire upper lobes + bases of lower lobes; 4: fibrosis of entire upper lobes + entire lower lobes. "GS healthy" corresponds to the lungs before modifications, which will be induced at different stages by the GS method. Data are presented as mean \pm SD of the relative value of the healthy stage of the corresponding method.

Assessment of respiratory mechanics

Reliability:

Replicate	TV			MV			R			C		
	I5	25	F	I5	25	F	I5	25	F	I5	25	F
1	3,73%	2,02%	1,89%	3,74%	2,04%	1,90%	3,41%	4,10%	4,12%	5,90%	9,08%	12,27%
2	1,75%	4,16%	3,98%	1,75%	4,17%	3,98%	3,85%	4,00%	4,07%	6,34%	13,39%	10,01%
3	2,35%	2,50%	4,01%	2,35%	2,50%	4,03%	4,32%	4,04%	6,90%	4,92%	10,29%	5,48%
4	3,57%	2,43%	3,23%	3,57%	2,45%	3,23%	6,62%	5,93%	6,99%	7,47%	7,75%	5,34%
5	2,51%	3,16%	2,04%	2,51%	3,17%	2,05%	5,21%	5,04%	3,98%	4,61%	7,91%	6,81%
6	3,66%	1,35%	3,13%	3,65%	1,35%	3,13%	3,02%	4,08%	4,38%	6,64%	5,73%	7,36%
7	5,02%	0,89%	1,85%	5,04%	0,91%	1,85%	4,29%	3,75%	3,96%	14,82%	8,71%	6,15%
8	1,04%	1,77%	1,47%	1,05%	1,78%	1,46%	2,64%	2,82%	3,76%	6,06%	10,27%	9,66%
9	0,73%	1,34%	2,00%	0,73%	1,34%	1,99%	3,33%	3,27%	3,52%	4,33%	11,21%	7,72%
10	3,51%	2,72%	9,36%	3,51%	2,73%	9,37%	3,55%	3,76%	6,10%	10,22%	13,84%	13,31%
11	7,97%	3,84%	4,44%	7,97%	3,84%	4,43%	3,21%	3,83%	4,72%	10,01%	8,71%	12,04%
12	3,79%	2,41%	3,04%	3,81%	2,40%	3,05%	4,75%	3,89%	4,80%	6,77%	6,20%	7,22%
13	3,20%	2,48%	7,21%	3,21%	2,49%	7,21%	4,86%	3,65%	5,95%	6,62%	9,47%	9,89%
14	2,03%	2,90%	8,42%	2,04%	2,89%	9,52%	3,14%	3,82%	8,43%	5,62%	10,93%	12,89%
15	2,84%	5,26%	4,53%	2,82%	5,26%	4,55%	3,92%	4,86%	4,10%	5,32%	10,11%	9,50%
16	2,56%	4,67%	6,52%	2,56%	4,67%	6,52%	4,27%	5,78%	5,88%	7,29%	9,99%	10,65%
17	10,72%	3,42%	6,39%	10,73%	3,42%	6,40%	5,78%	4,53%	7,16%	13,93%	7,50%	10,42%
18	6,82%	3,44%	2,56%	6,83%	3,45%	2,56%	5,22%	5,99%	5,28%	11,42%	12,97%	8,63%
19	2,29%	3,28%	10,36%	2,26%	3,30%	10,36%	5,38%	3,65%	5,77%	14,46%	10,74%	14,59%
20	0,71%	1,96%	7,90%	0,71%	1,96%	7,91%	3,22%	4,02%	5,37%	6,14%	10,76%	14,36%
21	14,65%	8,32%	6,36%	14,65%	8,36%	6,36%	7,46%	6,67%	5,82%	14,20%	14,63%	10,89%
22	1,87%	0,78%	1,49%	1,87%	0,77%	1,51%	3,06%	3,35%	4,56%	5,40%	5,92%	7,03%
23	1,27%	1,12%	1,01%	1,27%	1,10%	0,99%	2,61%	3,36%	3,64%	7,09%	8,47%	7,17%
24	3,02%	0,47%	0,78%	3,02%	0,47%	0,77%	5,68%	3,41%	3,35%	4,61%	5,19%	5,92%
25	1,29%	1,19%	1,93%	1,29%	1,20%	1,93%	2,54%	2,81%	3,40%	3,66%	6,84%	5,18%
26	1,15%	0,88%	1,06%	1,14%	0,88%	1,05%	2,41%	2,89%	3,40%	6,26%	8,29%	6,82%
27	0,94%	3,23%	2,85%	0,93%	3,24%	2,88%	2,91%	3,51%	3,38%	4,26%	8,15%	8,11%
28	0,65%	0,67%	0,61%	0,65%	0,64%	0,60%	3,30%	3,35%	3,45%	2,64%	7,40%	5,95%
29	0,73%	0,59%	0,52%	0,74%	0,60%	0,50%	3,65%	3,30%	4,13%	4,38%	7,08%	6,89%
30	1,52%	0,75%	1,12%	1,52%	0,74%	1,09%	2,74%	3,44%	5,02%	3,02%	5,42%	4,93%
Mean	3,26%	2,47%	3,74%	3,26%	2,47%	3,77%	4,01%	4,03%	4,85%	7,15%	9,10%	8,77%
SD	2,05%	1,26%	2,31%	2,06%	1,26%	2,36%	1,05%	0,72%	1,10%	2,63%	2,02%	2,43%

Table S3 - Coefficient of variation of tidal volume (TV), minute-ventilation (MV), resistances (R) and compliance (C) and each replicate Reliability threshold was set at 15%.

Reproducibility:

TV			MV			R			C		
I5	25	F	I5	25	F	I5	25	F	I5	25	F
14,94%	13,97%	16,97%	14,25%	13,49%	16,61%	24,30%	12,99%	9,99%	30,74%	29,80%	29,58%

Table S4 - Coefficient of variation of tidal volume (TV), minute-ventilation (MV), resistances (R) and compliance (C) of all replicates. Reproducibility threshold was set at 30%.

Assessment of regional gas-ventilation by ^{81m}Kr scintigraphies

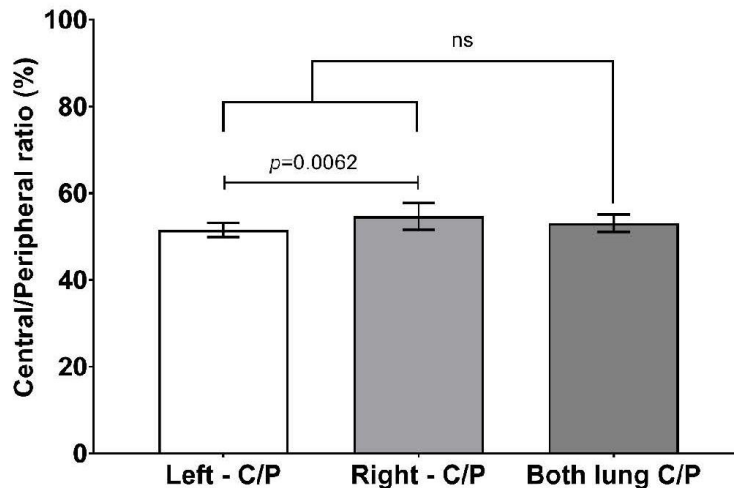


Figure S5 - Central-to-peripheral ratio of each lung and for the whole respiratory tract expressed as mean \pm SD of the percentage of nominal dose of radioactivity. C/P: Central-to-peripheral ratio.

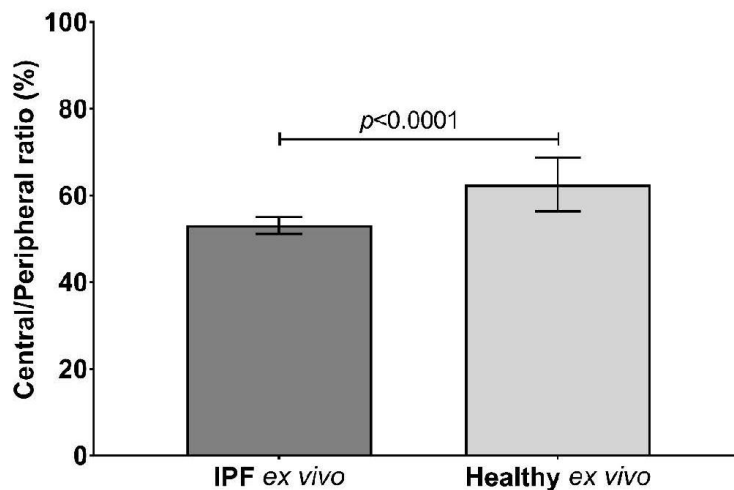


Figure S6 - Central-to-peripheral ratio of healthy and IPF-mimicking ex vivo model. Data are expressed as mean \pm SD of the percentage of nominal dose of radioactivity.

4. Conclusions et perspectives

Le développement de ce modèle *ex vivo* a suscité quelques défis. Dans un premier temps, il a fallu trouver différentes méthodes à même de créer un syndrome restrictif similaire à celui des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Différentes approches ont été envisagées, comme il est présenté dans l'article. Outre, la comparabilité des données obtenues avec celles des patients, un des points majeurs de choix de la méthode a été la praticité de l'application. En effet, le modèle *ex vivo* doit être aisément transportable pour faciliter son utilisation.

Enfin, outre les limitations inhérentes aux modèles *ex vivo* telles que la position du modèle ou le réchauffement et l'humidification des voies aériennes, ce modèle présente des limitations propres. En effet, le profil de fibrose est, chez les patients, hétérogène alors qu'il est homogène et symétrique dans notre cas. De plus, les modifications apportées par le traitement thermique

ne sont similaires à la fibrose qu'en surface du parenchyme pulmonaire (épaississement pleural et modifications subpleurales des protéines élastiques). Aussi, ce modèle n'est pas à même de simuler les atteintes alvéolaires et interstitielles observées chez les patients.

Cependant, malgré ces limites, les résultats générés lors de la présente étude semblent en accord avec les données *in vivo* obtenues, tant animales qu'humaines. En conséquence, ce modèle est un outil d'intérêt pour l'étude de la régionalisation des dépôts pour permettre le criblage des nouvelles techniques d'aérosolthérapie pour le traitement de la fibrose pulmonaire idiopathique par voie inhalée.

Chapitre 3

Modèle adulte de bronchopneumopathie chronique obstructive en ventilation passive

1. Introduction

Le développement de ce modèle était, initialement, le cœur de l'ANR AMADEUS qui a financé ces travaux de thèse. En effet, la BPCO est une pathologie pulmonaire d'incidence croissante et dont les conséquences sont désastreuses pour les patients, qui, malgré les traitements, voient leur pathologie progresser. En outre, la BPCO induit un délabrement de l'état général des patients, en association avec de nombreuses comorbidités. De plus, actuellement, les traitements disponibles sont symptomatiques et non curatifs. Enfin, les patients subissent de manière périodique, principalement l'hiver, des exacerbations leur pathologie nécessitant leur hospitalisation (**Inserm 2020**).

Ainsi, la BPCO représente un fardeau pour les patients et engendre de nombreux coûts sociétaux, qui sont amplifiés par le mésusage des traitements et la grandes variabilités des dépôts d'aérosols dans le tractus respiratoire des patients. En outre, de nombreux DM d'aérosolthérapie ne sont pas adaptés aux profils respiratoires de ces patients.

Le développement d'un nouveau modèle préclinique présente l'intérêt de pouvoir réaliser un potentiel criblage des DM d'aérosolthérapie pertinent dans le traitement de la BPCO ou pour le développement de nouveaux DM, dans le cadre d'une potentiel transition vers des phases de recherche clinique.

2. Développement du modèle

Le développement du modèle *ex vivo* de BPCO passe par la mise en place de deux paramètres pulmonaires d'importance : un syndrome d'hyperinflation pulmonaire et une obstruction des voies aériennes par un liquide épais similaire au mucus.

Le premier point correspond à l'augmentation du volume résiduel qui est observé chez les patients. Pour réaliser cette modification du modèle, il nous a fallu modifier les paramètres de la pompe ventilatoire utilisée. Ainsi, pour simuler ce point, nous avons accru la dépression moyenne dans l'enceinte tout en gardant la même amplitude. Ce faisant, nous avons été à même d'augmenter le volume résiduel, créant ainsi un phénomène d'hyperinflation généralisé à l'ensemble du tractus pulmonaire. Le critère de jugement principal utilisé est l'augmentation des résistances des voies aériennes, à des niveaux similaires à ceux obtenus chez les patients. Les données obtenues semblent en accord avec les données de patients atteints de BPCO modérée à moyenne.

Le second point correspond à l'hypersecretion muqueuse rencontrées chez les patients. L'utilisation d'un mucus synthétique, sans composante protéique ni cellulaire, a été préféré pour la faciliter de préparation et d'utilisation. En outre, notre modèle ne constituant qu'un modèle de mécanique ventilatoire, l'utilisation d'un mucus complexe ne semble pas pertinente. Ainsi, l'utilisation d'un mucus artificiel composé d'une solution de polyoxyde d'éthylène a été choisi, sur la source d'un article présentant différentes alternatives artificielles au mucus (**Shah et al. 2005**). Différentes quantités de mucus artificiel ont, ensuite, été injectées dans une zone spécifique du tractus pulmonaire, afin de rechercher un volume optimal de mucus.

Une fois ces deux paramètres appliqués de manières concomitantes au modèle, l'évaluation des paramètres physiologiques respiratoires a été réalisées sur 30 tractus respiratoires différents pour deux modalités de résistances des voies aériennes. Ensuite, l'homogénéité de la ventilation a été évaluée sur 6 tractus respiratoires par utilisation d'un gaz au ^{81m}krypton, tandis que l'étude de la régionalisation des dépôts a été réalisée sur 6 tractus respiratoires avec un aérosol de ^{99m}Tc-DTPA.

3. Conclusions

Les données obtenues sont, actuellement, en cours de formalisation pour être intégrées dans une publication en cours de rédaction. Cependant, les observations qualitatives sur la cartographie des dépôts mettent en avant un inhomogénéité des dépôts, avec des quantités relatives plus faibles dans les zones ayant reçues du mucus artificiel. En outre, les paramètres ventilatoires semblent en accord avec les données patients disponibles dans la littérature.

Modèle adulte de ventilation mécanique invasive

1. Introduction

Ce modèle doit sa genèse à Sophie Perinel, médecin réanimateur. Son développement a fait l'objet du travail de thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en médecine de Quentin Georges.

L'objectif de ce modèle était d'étudier la faisabilité de la ventilation mécanique invasive sur le modèle *ex vivo*, afin de s'assurer qu'il puisse servir de support à des futures études sur la régionalisation des dépôts d'aérosols chez le patient sous ventilation en pression positive. En effet, bien que des études existent sur l'aérosolthérapie chez les patients en soins intensifs et en réanimation médicale, très peu d'études de cartographie des dépôts pulmonaires existent. Parmi celles-ci, la grande variabilité des pratiques cliniques rend difficile les comparaisons entre les centres. Ainsi, il est difficile d'obtenir des données robustes et fiables sur les effets des différentes pratiques d'aérosolthérapie chez le patient intubé.

OPEN Aerosol delivery during invasive mechanical ventilation: development of a preclinical *ex vivo* respiratory model for aerosol regional depositionYoann Montigaud^{1,4}, Quentin Georges^{2,4}, Jérémie Pourchez¹, Lara Leclerc¹, Clémence Goy^{1b}, Anthony Clotagatide², Nathalie Prevot^{2,3} & Sophie Perinel-Ragey^{2,3*}

In intensive care units, nebulization is a usual route for drug administration to patients under mechanical ventilation (MV). The effectiveness of inhalation devices as well as depositions sites of aerosols for ventilated patients remain poorly documented. *In vivo* human inhalation studies are scarce due to ethical restrictions because imaging techniques require radioaerosols to assess regional aerosol deposition. Thus, we developed an *ex vivo* respiratory model under invasive MV for preclinical aerosol deposition studies. The model was composed of *ex vivo* porcine respiratory tracts. MV was achieved thanks to a tracheal intubation and a medical ventilator under controlled conditions. Respiratory features were studied using analogical sensors. Then regional homogeneity of gas-ventilation was assessed with ^{81m}Krypton scintigraphies. Finally, a proof of concept study for aerosol deposition was performed. Obtained respiratory features as well as gamma-imaging techniques, which demonstrated a homogenous regional ventilation and about 18% ± 4% of the nebulized dose deposited the respiratory tract, were in good agreement with human data available in the literature. This original *ex vivo* respiratory model provides a feasible, reproducible and cost-effective preclinical tool to achieve aerosol deposition studies under MV.

In intensive care units (ICU), nebulization is a usual route to deliver drugs in the respiratory tract of patients under mechanical ventilation (MV). Aerosol therapy is used by up to 99% of intensivists according to a recent international survey¹. Inhaled drug administration to mechanically ventilated patients is an attractive pathway for a large amount of therapeutics (such as bronchodilator treatments, antibiotics and systemic medications). However, therapeutic index of many aerosolized treatments, defined as the quantitative comparison of doses causing toxicity and therapeutic effect, is largely variable¹. Inhaled therapeutics often lack of robust scientific evidence proving their clinical efficacy². As an example, the guidelines of the European Respiratory Society³ underlined that even if metered-dose inhalers (MDI) and nebulizers are usually used in ICU to deliver bronchodilators to mechanically ventilated patients², it is not yet known which modality of treatment is more effective. This is related to the complexity to perform studies with an important level of evidence and allowing the measurement of meaningful outcomes such as morbidity, mortality and duration of mechanical ventilation⁷. Moreover, for ICU conditions - e.g. for patients suffering of acute respiratory failure (ARF) - the accurate dose and anatomic targets of inhalation therapy are quite poorly documented. Indeed, ICU patients frequently suffers of ARF: a prevalence study in 81 ICU claimed that ARF represented 24% of main admission diagnosis and aerosolized drug administration was frequently considered in this situation⁴ (49% of these patients received inhaled therapies). According to severity and etiology, it is an usual indication for invasive MV⁵. This MV, requiring nowadays a positive airway pressure ventilation is very different from physiological ventilation (negative pressure ventilation thanks to

¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U1059 Sainbiose, Centre CIS, F-42023, Saint-Etienne, France. ²CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France. ³INSERM U1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, F-42023, France. ⁴These authors contributed equally: Yoann Montigaud and Quentin Georges. *email: sophie.perinel.ragey@univ-st-etienne.fr

the pleural cavities). Consequently, nebulization efficiency and deposition pattern within the respiratory tract is largely impacted by MV⁶.

Regarding the variety of therapeutic agents and diseases, the implementation of optimal nebulization conditions for patients under MV are ongoing challenges in ICU. In addition to the variety of medicines, pharmacokinetics and therapeutic index, many factors have been shown to affect the efficiency of nebulized treatments by modifying the aerosol regional deposition for mechanically ventilated patients⁴: angulation of tracheal intubation⁷, artificial airways⁷, respiratory pattern⁸, design of nebulizers⁹, presence of heated humidification¹⁰, position of the nebulization device in the ventilation circuit¹¹, etc. For example, clinical trials studying bacterial eradication following administration of nebulized antibiotics struggled to demonstrate a significant difference compared to intravenous therapeutics only^{12,13}. Moreover, some drugs such as bronchodilators showed a wide therapeutic index and thus, no influence of the different conditions of nebulization (type of nebulizer, position in the ventilator circuit, humidification condition and ventilation mode) could be observed in clinical studies⁴.

A recent systematic review¹⁴ aimed to assess inhaled drug delivery on mechanically ventilated patients and existing animal models. This review supports the conclusion that lung deposition of nebulized treatments in mechanically ventilated patients is lower than 20% of nominal dose delivered by nebulizers and mostly occurs in proximal airways. However, a limited number of *in vivo* studies assess lung deposition of inhaled drugs during MV. As a matter of fact, quantitative nuclear medicine imaging is the gold standard to assess regional aerosol deposition and consequently *in vivo* human inhalation studies are scarce due to ethical restrictions related to radioactivity and arduousness of nuclear medicine procedures on MV patients. Besides, results generated using *in vitro* experiments or various animal models remain controversial due to wide differences between these models and human airways in size and bronchial divisions but, also, in ventilation physiology^{15,16}.

To sum up, in patients receiving MV, it is a challenge to ensure that nebulizers deliver aerosol to distal airways because currently, the proportion of the drug that effectively reaches the lung is always quite low. Thus, nebulization devices and administration procedures have to be improved for patients under MV. All these considerations explain the need to achieve preclinical aerosol studies using a robust respiratory model, practicable, cost-effective, without restrictive ethical issues, well adapted to MV and showing a suitable comparability to human anatomy and physiology. These experimental preclinical studies would aim to assess the impact of several parameters on the deposited lung dose as well as regional aerosol deposition. First, the performance of aerosol devices has to be studied: aerosol size distribution and aerosol output depending of the technology (vibrating mesh or jet nebulizers, MDI etc.). Then, the different components of aerosol administration procedure: continuous vs. breath-synchronized mode, the presence of heating humidifier, the nebulizer position in the ventilator circuit. This multiplicity of parameters implies the necessity of modeling.

Our research group previously developed a preclinical respiratory model to assess the aerosol deposition in spontaneous ventilation^{7,18}. Thus, based on this original know-how, this work aimed to develop and then validate a reproducible and relevant *ex vivo* respiratory model dedicated to preclinical aerosol studies under MV. At first, a physiological study was conducted using a pneumotachograph and a differential pressure sensor to determine whether the developed respiratory model satisfactorily fitted human ventilation data available in literature^{19,20}. Then, ^{81m}Krypton (^{81m}Kr) scintigraphic study was performed by gamma-imaging in order to assess the homogeneity of regional gas-ventilation. As a proof of concept, the relevance of the developed model for preclinical inhalation studies was assessed by the quantitative imaging of regional aerosol deposition using a radiolabeled aerosol (^{99m}Tc-technetium-labeled diethylene-triamine-pentaacetic acid, ^{99m}Tc DTPA) generated by a mesh nebulizer.

Results

Anatomical features. Overall, 37 anatomical models were set up for the whole study:

- (i) Concerning the 21 respiratory tracts used for the physiological study, the weight ranged from 659 to 1099 g (mean ± standard deviation [SD]: 852 ± 112 g). A median of 2 cuts (range 0–4) and a median of 6 sutures (range 0–22) per respiratory tract were performed.
- (ii) Concerning the 10 respiratory tracts used for ^{81m}Kr ventilation scintigraphies, the weight ranged from 741 to 930 g (mean ± SD: 853 ± 74 g). A median of 2 cuts (range 0–4) and a median of 1 suture (range 0–8) per respiratory tract were performed.
- (iii) Concerning the 6 respiratory tracts used for ^{99m}Tc DTPA scintigraphies, the weight of the IT tract ranged from 749 to 1165 g (mean ± SD: 875 ± 216 g). A median of 1 cuts (range 0–2) and a median of 0 sutures (range 0–6) per respiratory tract were performed.

Concerning the mass of the respiratory tracts, distribution for each type of experiment followed Gaussian distribution. One-way ANOVA showed no significant difference. Concerning the number of wounds of the respiratory tracts, distribution for each type of experiment did not follow Gaussian distribution. Kruskal-Wallis test showed no significant difference. Concerning the number of sutures of the respiratory tracts, distribution for each type of experiment did not follow Gaussian distribution. Kruskal-Wallis test showed a significant difference (approximate $p = 0,0146$).

Physiological features. Physiological measurements were performed using 21 different *ex vivo* porcine respiratory tracts which were connected to the same ventilation circuit and ventilator. On this series of 21 lung models, no significant correlation between the leaks and the number of cuts or the number of suture could be found, with correlation coefficient of 0.2081 and 0.4056, respectively. Physiological values obtained from pneumotachograph and differential pressure sensor over a 3 minutes ventilation (59 respiratory cycles) for the 21 respiratory tracts are shown in the table below (Table 1).

	Tidal volume (mL)	Minute ventilation (L/min)	Leaks (%)	Resistance (cmH ₂ O, L ⁻¹ .sec ⁻¹)	Compliance (mL, cmH ₂ O ⁻¹)
Mean	365	7.26	15.74	6	30
SD	30	0.60	7.02	1	3
Range	[282; 417]	[5.64; 8.33]	[3.63; 33.70]	[5; 8]	[22; 34]

Table 1. Physiological data for the 21 porcine respiratory tracts over a 3 minutes controlled mechanical ventilation. SD: standard deviation.

	Left/total ratio	Right/total ratio	Right/Left ratio	Right/left ratio from Dugernier <i>et al.</i> ²	PI
Mean	48%	52%	1.11	1.09	52%
SD	4%	4%	0.18	0.32	4%
Range	[39%; 52%]	[49%; 61%]	[0.91; 1.56]	NA	[45%; 59%]

Table 2. Relative uptake measurements based on ^{81m}Krypton planar scintigraphies and literature comparisons. SD: standard deviation; PI: penetration index; NA: data non available.

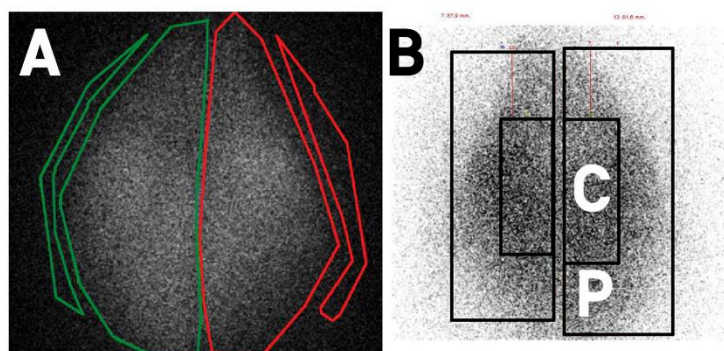


Figure 1. ^{81m}Krypton planar scintigraphic images showing homogenous ventilation of porcine respiratory tracts. (A) ROIs of each lung and respective background are materialized in green for the right lung and in red for the left lung; (B) peripheral (P) and central (C) ROIs for each lung.

^{81m}Kr ventilation scintigraphies. The ^{81m}Kr ventilation scintigraphies (Fig. 1A,B) were performed on 10 different *ex vivo* models. Different regions of interests (ROIs) were used for calculation and are visible on Fig. 1. The Fig. 1A displays left and right lungs with 2 background noises ROI; the Fig. 1B displays central and peripheral lung regions. Ratios of the count rates between peripheral to central regions and of left lung to total count were calculated to compare with human study using these original markers (Table 2).

First, the ratio of the left lung-to-total count was $48 \pm 4\%$. The ratio of the right lung-to-total count was $52 \pm 4\%$. Between right and left lungs, no significant differences were observed in terms of ratio to total count. Second, the penetration index (PI), defined as the ratio of the count between peripheral and central regions, was calculated for each lung and showed values of 52 ± 4 . Data are presented in Table 2.

^{99m}Tc-DTPA radioaerosol regional deposition. The ROIs determined after planar scintigraphies allowed to precisely quantify the deposited fractions in each part of the set-up after the nebulization of the radioactive aerosol (Fig. 2 & Table 3). Results in Table 3 are adjusted to 100%.

Nebulized dose, *i.e.* the mean percentage of the nominal dose that was effectively emitted during the nebulization was $94 \pm 7\%$. Most part of the nebulized dose was deposited in the ventilation circuit but especially in the inspiratory line, which collected $45 \pm 10\%$ of the nebulized dose. Expiratory line, expiratory filter and sealed enclosure filter deposited fractions represented $34 \pm 9\%$ of nebulized dose. Lastly, respiratory tract fraction accumulated $18 \pm 4\%$ of nebulized dose. Experimental data and data obtained from literature are presented in Table 3.

SPECT/CT imaging of the lung (Fig. 3) visually showed good penetration as well as a homogeneous anterior and posterior distribution of the aerosol in the lungs.

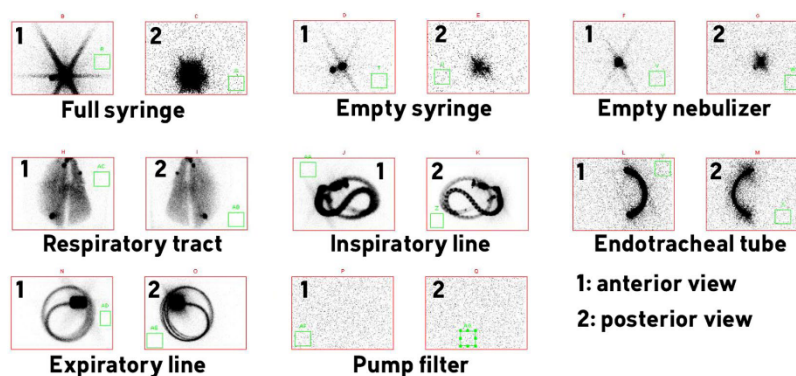


Figure 2. Scintigraphic images of ^{99m}Tc -DTPA aerosol deposition obtained after one experiment. The green square in each field of view corresponds to the region of interest used to determine the corresponding background noise.

		Inspiratory	Expiratory	ETT	RT	Total
Experimental data on the <i>ex vivo</i> model	Mean	45%	34%	4%	18%	100%
	SD	10%	9%	2%	4%	N/A
	Range	[30; 64]	[21; 45]	[2; 7]	[12; 23]	N/A
<i>In vitro</i> data from Ari <i>et al.</i>	Mean	—	—	—	24.2%	—
	SD	—	—	—	1.2%	N/A
<i>In vivo</i> data from Dugernier <i>et al.</i>	Mean	—	84.9%	—	15.1%	100%
	SD	—	5%	—	5%	N/A

Table 3. Deposition fractions in the different parts of the ventilation circuit and in the model. Results expressed as fractions of the nebulized dose (relative percentage of the nominal dose that was effectively nebulized). Inspiratory: Inspiratory line. Expiratory: expiratory line + expiratory filter + sealed enclosure filter. ETT: endotracheal tube. RT: respiratory tract or filter at the end of ETT. SD: standard deviation. N/A: not applicable. —: data not available.

Discussion

This work demonstrated that the previously developed *ex vivo* porcine respiratory model for spontaneous ventilation could be successfully adapted for invasive MV. Our results showed a good coherence with human respiratory physiological data of an ICU patient in terms of V_T compliance and resistances. Moreover, homogeneity of ventilation, as assessed by ^{81m}Kr scintigraphy, was comparable to previous studies ran in spontaneous and mechanical ventilation on human population⁸. Finally, the assessment of radioaerosol regional deposition showed that the extra-pulmonary (mainly the ventilation circuit and the expiratory filter) and lung deposited fractions were in good agreement with previous *in vitro* and *in vivo* studies^{8,10}. Consequently, the developed *ex vivo* respiratory model appeared relevant to perform preclinical studies devoted to aerosol administration for ICU patients under MV.

The anatomical qualities of the porcine respiratory tracts used for the study were fulfilling, as shown by macroscopic qualitative data collected during the dissections, considering that cuts during slaughter were unavoidable. However, despite meticulous suturing, we observed the existence of leaks during physiological measurements and found some extent on the scintigraphies. Leakages were emphasized in positive airway pressure with high levels of positive end expiratory pressure during MV and were assessed as $15.74\% \pm 7.02$ (ratio of inspiratory tidal volume to expiratory tidal volume).

Considering most recent guidelines²¹, the choice of V_T of a 8 mL/kg of ideal body weight and other respiratory parameters could be questionable but were based on the recent LUNGSAFE study²², which provided detailed information about clinical practices in the management of acute respiratory distress syndrome, a very severe respiratory condition, among ICUs over the world.

Physiological measurements showed good coherence with human data²³. Respiratory tract resistances remained under $10 \text{ cmH}_2\text{O.L}^{-1}.\text{sec}^{-1}$ as expected with a 7 mm inner diameter endotracheal tube and an inspiratory flow of 35 L/min²⁴. Respiratory tract compliance was also consistent with human physiological data of patients suffering ARF²⁴. Indeed, the compliance was far from a healthy adult given that the *ex vivo* model is not able to reproduce the human thoracic cage and its mechanical properties. To be precise, the compliance of the

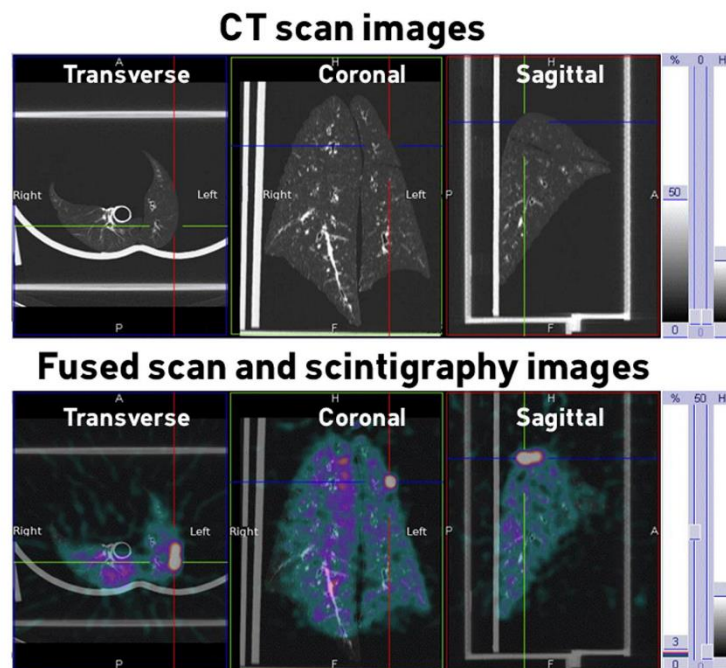


Figure 3. SPECT/CT imaging of one respiratory tract after ^{99m}Tc -DTPA nebulization. Upper panels: tomography images. Lower panels: fusion of tomography and scintigraphic images.

model was also modified by the lack of lung perfusion, the *post mortem* lesions to the parenchyma and by the unknown status and quantity of surfactant present into the lungs. Indeed, with a very short half-life, it could be assumed that the surfactant was not functional nor present 24 hours after slaughter. As a result, the proposed respiratory model, with a reduced compliance and under controlled MV, is closed to ARF conditions, explaining the choice of a protective ventilation used for these patients. However, as inhaled drugs are administered to disparate patient populations under various conditions, further studies under assisted ventilation, with different respiratory features or with non-invasive ventilation have to be complementary performed to investigate several nebulization uses.

Despite potential slaughtering concerns (retention of bronchial secretions, minor atelectasis), homogeneity of the ventilation in the right and left lungs depicted by the ^{81m}Kr ventilation scans was clearly shown by planar scintigraphies and right/left ratio and PI were close to the repartition in healthy human^{8,25}. However, the left/right asymmetry observed both in spontaneous ventilation²⁵ and under MV⁸ in humans, wasn't significantly found on this model. The central position of the middle lobe in our model (due to the absence of rib cage) could be an explanation to this difference.

A large amount of nebulized dose was found both in inspiratory and expiratory line. As recommended by the manufacturer and also confirmed by independent studies²⁶, nebulizer was placed as far as possible from the Y piece. The rationale is to decrease deposition lost over expiratory line during inspiration. On the other hand it could have led to a larger quantity of aerosol deposition over inspiratory line. Further studies have to be performed with different nebulizer positions on the circuit.

In literature, lung deposition of aerosol generated by vibrating-mesh nebulizers in mechanically ventilated patients was lower than 20% of nominal dose and showed a regional deposition focusing mainly in proximal airways¹⁴. Values obtained in our study were quite similar, from 12% to 22% (mean \pm SD: $18 \pm 4\%$). These results also showed the good concordance of the *ex vivo* respiratory model compared to a previous *in vivo* study⁸ using the same nebulization device and similar administration procedure and ventilation parameters (respiratory tract deposition of $15.1 \pm 5\%$). Similar results were equally available in an *in vitro* study¹⁰ calculating a respirable dose delivered *via* endotracheal tube, with similar ventilation procedure (filter mimicking lung deposition, mean \pm SD: $24 \pm 1.2\%$).

Moreover, this study demonstrated an important nebulized dose compared to the dose initially introduced into the nebulizer tank. Indeed, the Aerogen[®] Solo vibrating mesh device showed in our work a nebulized dose of 94% (SD 7%) in perfect accordance with literature data reporting a nebulized dose of $96.7 \pm 0.7\%$ of the nominal dose¹⁰. However, one nebulization experiment showed an issue during the nebulization leading to an early stop of

the device inducing the presence of a quantitatively important residual volume in the tank at the end of the procedure. Later readings²⁷ confirmed that this nebulizer can be randomly interrupted with various retained volumes.

Regarding the humidification of the inhaled gases, no moisture exchange filter was placed between the Y-piece and the endotracheal tube. Indeed, the aerosol particles were likely to obstruct it and it is not recommended to use them during the nebulization^{28,29}. Moreover, the use of a heated humidifier would change the particle size distribution of the airborne droplets. Indeed, water contained in the aerosolized particles equilibrates with the surrounding humidity, thus increasing the volume of particles in a water-saturated environment. This has the effect of increasing the particle impaction at the level of the upper airways and thereby decreasing aerosol delivery into the lungs^{26,30}. Consequently, despite the possibility allowed by manufacturer, no heated humidifier was used and no gas humidification was performed during this study. This is debatable for several reasons. The punctual interruption of humidification during the nebulization time *in vivo* does not often leave enough time to obtain drought conditions comparable to the *in vitro* manipulations³¹. Nebulization of certain drugs (particularly antibiotics) continuously over long periods does not leave the possibility of a prolonged interruption of humidification. As a result, our findings are probably overstated in relation to clinical practice where the decrease in humidification does not seem to be achievable.

In addition to being physiologically relevant, this new *ex vivo* invasive ventilation model showed several strengths. As porcine respiratory tracts were obtained from porcine slaughterhouses, this model complied with the requirements of the 3R (replace, reduce, refine) guidelines³² for more ethical use of animals in testing. One did not have to sacrifice more animals for the need of these experiments. By their nature, these animal wastes were also cost-effective. When considering the overall models ventilated during this study, data showed a good inter-individual reproducibility with a V_T standard deviation of 30 mL. Yet, this model had some limitations. The most important one was the existence of leaks arising directly from the lungs. However, these leaks did not have any form of impact on ventilation homogeneity as assessed by the ^{81m}Kr scintigraphy and some technical improvements are under consideration to reach a better management of these leaks.

This model opens the road to many further preclinical studies running aerosol therapies under various conditions for mechanically ventilated patients. Consequently, it could be the first step to improve efficiency and to power-up the development of aerosol therapy devices for ICU use.

Material and Methods

Respiratory tracts. The porcine respiratory tracts were obtained at the release from slaughterhouse, satisfying all the sanitary controls in accordance with French sanitary regulations. All the respiratory tracts were used within 24 hours for sanitary reasons. Otherwise, they were frozen and slowly thawed at ambient temperature 12 hours before the experiment. If any cut was observed on lungs, stitches were realized and data were collected as potentially leading to abnormal leaks with positive pressure ventilation. A bronchoscopy was systematically performed to ensure the absence of significant airway obstruction and all the observations were recorded (obstructions, secretions, need for instillation, bronchial divisions etc.). For each experiment, the porcine respiratory tract was placed in an instrumented sealed enclosure. The tracheal length was standardized to at least 15 cm in order to avoid selective intubation.

Model set-up and ventilation parameters. The porcine respiratory tracts were mechanically ventilated by means of a tracheal intubation and an ICU Evita 4 ventilator (Dräger, Germany). A self-test procedure followed by a device check was performed before each experiment. The intra-thoracic part was connected to the ventilator using a tracheal tube (Smiths Medical, Portex® SACET™ Suction Above Cuff Endotracheal Tube, 7.5 mm inner diameter). Tracheal tube was set respecting physiological angulation of 90 degrees (based on mechanically ventilated patients' tomodesimetry analysis). The ventilation mode was controlled volumetric. Currently, this technique is still mainly used for invasive ventilation in ICUs over the world as it is observed in an international study³³. Therefore, the ventilation parameters were chosen based on the results of a recent epidemiological study of clinical practice for patients under MV²². In this study, patients were ventilated with 8 mL/kg of ideal body weight. As reported by an anthropometric survey published in 2015 by French National Institute of Statistics and Economical Studies, French average height is 175 cm tall leading to a 540 mL tidal volume (V_T). Positive end expiratory pressure (PEEP) was set to 9 cmH₂O, inspiratory/expiratory ratio (I/E) to 1/2, and respiratory rate to 20 cycles per minute leading to a predicted minute ventilation of 11 L/min.

As a recent review about aerosoltherapy under MV²⁴ recommend it, inspiratory flow was set as low as possible for chosen I/E ratio and respiratory rate leading to 35 L/min.

Physiological measurements. The first part of the study consisted in recording respiratory physiological features using a Biopac® system (Biopac, Goleta, USA) composed of a pneumotachograph (Pneumotach, TSD 117, Biopac, Goleta, USA) and a differential pressure sensor (TSD160D, Biopac, Goleta, USA). The real-time airflow was recorded between the Y-piece and the tracheal tube using the pneumotachograph (Fig. 4).

These data allowed calculation of the air input and output in the tracheal tube representing the measured minute ventilation. The V_T has been obtained by integration of outputs for each respiratory cycle. A median of V_T and minute ventilation was then calculated. The differential pressure sensor allowed to calculate median respiratory tract resistance and compliance by following depressions in the enclosure. All data were processed through AcqKnowledge® 5.0 software (Biopac, Goleta, USA).

^{81m}Krypton ventilation scintigraphy. The second part of the study consisted in performing ^{81m}Kr nuclear imaging to assess the homogeneity of ventilation. The ^{81m}Kr ventilation scintigraphies were performed on 10 *ex vivo* models. Due to the short half-life of this radioactive gas (13 seconds) ^{81m}Kr ventilation are considered representative of air ventilation³⁴. Right and left ratio of total relative uptake corrected for background signal

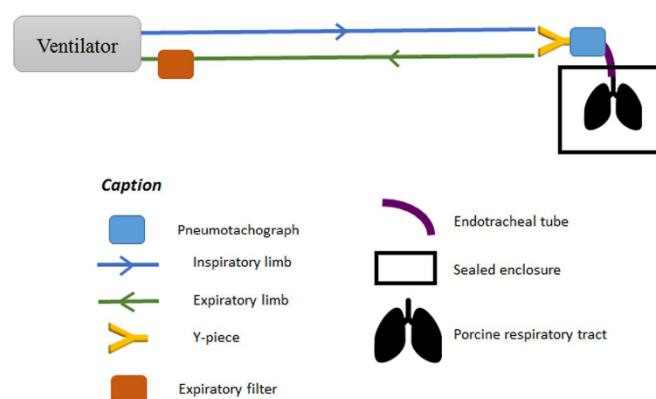


Figure 4. Experiment setup during physiological acquisitions

attenuation were calculated for each respiratory tract. Two different regions of interest (ROIs) were identified on ventilation scintigraphies within each lung following Newman *et al.*³⁵ recommended method to divide lungs into central and peripheral zones. A central ROI with dimensions equal to half of the width of a whole lung region and one-half of its height was positioned on the interior boundary of the lung, centered by height. The central and peripheral regions represented respectively 25% and 75% of the whole lung region. This allowed to calculate the relative uptake of central and peripheral regions for both left and right lung.

Aerosol regional deposition using scintigraphy and radiolabeled ^{99m}Tc -DTPA aerosol. The third part of the study consisted in a proof of concept for preclinical radioaerosol studies under MV over 6 *ex vivo* models.

The respiratory tract was set to be mechanically ventilated in a 30-degree proclive position, to mimic the widely used position of patients in ICU.

Radioactive aerosols were generated continuously by a vibrating mesh nebulizer (Aerogen Solo[®], Aerogen Ltd, Galway, Ireland) until the cessation of the nebulizer. The nebulizer was filled with ^{99m}Tc -labeled diethylene-triaminepentaacetic acid (^{99m}Tc -DTPA, 100 MBq/3 mL). Among all nebulization devices, vibrating mesh are those leading to the best percentage of nominal dose nebulized^{6,9}. This type of nebulizing devices usually showed a Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) ranging from 1 to 5 μm as well as a calculated respirable dose delivered *via* endotracheal tube ranging from 13% to 17%¹⁰. As recommended by manufacturer to avoid aerosol loss during expiration cycle, the vibrating mesh nebulizer should be placed upstream of the Y-piece. Thus, the nebulizer was placed between the inspiratory inlet and the inspiratory line (Fig. 5) making use of this later one as an aerosol tank as explained by Erhmann *et al.*²⁶ when performing continuous nebulization.

Since the aerosol particles generated may damage the flow sensor, it is recommended to place a filter before the expiratory valve²⁶. This condition was respected for this study.

Duration of nebulization was set to 15 min based on preliminary test run, in good accordance with previous study from Dugernier *et al.*⁸ showing a 9 minutes nebulization.

Acquisition of planar gamma-camera images and analysis procedure. The planar scintigraphic images (matrix 256 \times 256) were recorded with a variable angle dual detector SPECT/CT (SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, USA) equipped with a low-energy, high-resolution collimator (FWHM 8.3 mm at 10 cm); tested weekly for uniformity (UFOV 533 mm \times 387 mm, CFOV 400 mm \times 290 mm). Before conducting the inhalation experiments, the initial radioactive dose filled in the nebulizer was quantified (scintigraphic images, 60-sec anterior/posterior, were acquired corresponding to the full and empty syringe). Once the inhalation experiments were performed, 180-sec anterior/posterior images of the experimental setup were acquired for each element: empty nebulizer, inspiratory line, endotracheal tube, Y-piece associated to expiratory line and lungs.

ROIs were delimited on the images with a correction of the background. Calculations took into account the background radiation, physical decay of radioactivity and tissue attenuation correction factors. Consequently to these corrections, as stated by Newman *et al.*³⁵⁻³⁷, some limitations of data quantification in planar imaging are inherent to its 2D nature. It is accepted that errors of no more than 10% in the quantification of whole-lung deposition are tolerated and that mass balance close to 100% validate the method used for attenuation and scatter correction. Hence, the results were expressed as a percentage of activity in relation to the total dose and the nebulized dose, adjusted to 100%. Nominal dose stand for the total amount of radioactivity introduced into the nebulizer.

Acquisition of 3D gamma-camera images and analysis procedure. A tomography was performed for one respiratory tract. After acquiring 2D images with the same gamma camera (SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, USA), SPECT and CT acquisitions were performed immediately with a 2-slice spiral CT for a more rapid and accurate

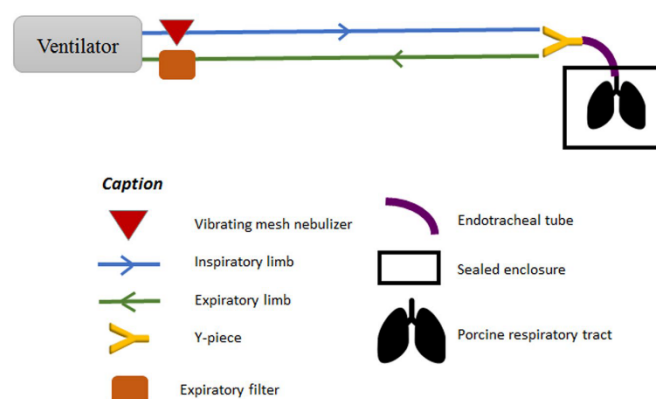


Figure 5. Experimental setup during ^{99m}Tc -DTPA nebulization and place of nebulizer on the inspiratory valve

attenuation correction and anatomical mapping. 3D SPECT acquisition of the respiratory tract was performed with 64 (2×32) projection images, each of 30 s. Finally, the CT was performed with the following parameters: 130 kV, 90 mAs, 1.25 mm slice thickness, 0.9 mm increment, 1.6 mm pitch, and rotation time of 1.5 s. A multimodality computer platform (Symbia net, Siemens, Germany) was used for image reviews and manipulations. Both the transmission and emission scans were reconstructed using 3D OSEM by default (8 subsets, 5 iterations), with pre-reconstruction smoothing using a 3D Butterworth filter (cutoff: 0.45 cycles/cm; order 5), a 128×128 image matrix, a 1.23 zoom, and a pixel size of 3.9 mm. SPECT images were reconstructed using scatter correction (scatter energy window) and CT attenuation correction. CT and SPECT images were matched and fused into trans-axial images. Images obtained were visually compared to 2D imaging, assessing the homogeneous distribution of the aerosol over pulmonary parenchyma.

Statistical analysis. Results are reported as numbers (%), means with SD. The physiological data were analysed with AcqKnowledge[®] 5 software (BIOPAC Systems, Inc., of Goleta, California, USA). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism[®] v8.0.2. Briefly, for each type of experiment (*i.e.* physiological study, ^{81m}Kr ventilation and ^{99m}Tc -DTPA) mass, number of wounds and number of sutures of each respiratory were computed to obtain descriptive statistics. Normality of the distribution was assessed through Shapiro-Wilk test. If Gaussian distribution was shown, one-way ANOVA with Tukey's *post-hoc* test was used to compare each experiment. If Gaussian distribution was not shown, Kruskal-Wallis' test with Dunn's *post-hoc* test to compare each experiment. To study the potential correlation between leaks and wounds and between leaks and sutures, normality was assessed with Shapiro-Wilk normality test, then Spearman correlation tests were performed to determine the significance of the association of each couple of values (*i.e.* leaks-wounds and leaks-sutures).

Received: 31 July 2019; Accepted: 12 November 2019;
Published online: 29 November 2019

References

- Dhand, R. *et al.* Dose-response to bronchodilator delivered by metered-dose inhaler in ventilator-supported patients. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **154**, 388–393 (1996).
- Force, C.-C. of the T. *et al.* European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers: Guidelines prepared by a European Respiratory Society Task Force on the use of nebulizers. *Eur. Respir. J.*, **18**, 228–242 (2001).
- Laube, B. L. *et al.* What the pulmonary specialist should know about the new inhalation therapies. *Eur. Respir. J.* **37**, 1308–1417 (2011).
- Ehrmann, S. *et al.* Aerosol therapy in intensive and intermediate care units: prospective observation of 2808 critically ill patients. *Intensive Care Med.* **42**, 192–201 (2016).
- Fan, E., Needham, D. M. & Stewart, T. E. Ventilatory Management of Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA* **294**, 2889–2896 (2005).
- Dhand, R. How Should Aerosols Be Delivered During Invasive Mechanical Ventilation? *Respir. Care* **62**, 1343–1367 (2017).
- Fink, J. & Ari, A. Aerosol delivery to intubated patients. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 1077–1093 (2013).
- Dugernier, J. *et al.* Aerosol delivery with two ventilation modes during mechanical ventilation: a randomized study. *Ann. Intensive Care* **6**, 73 (2016).
- ElHansy, M. H. E. *et al.* Inhaled salbutamol dose delivered by jet nebulizer, vibrating mesh nebulizer and metered dose inhaler with spacer during invasive mechanical ventilation. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **45**, 159–163 (2017).
- Ari, A., Areabi, H. & Fink, J. B. Evaluation of Aerosol Generator Devices at 3 Locations in Humidified and Non-humidified Circuits During Adult Mechanical Ventilation. *Respir. Care* **55**, 837–844 (2010).
- Berlinski, A. & Willis, J. R. Albuterol Delivery by 4 Different Nebulizers Placed in 4 Different Positions in a Pediatric Ventilator *In-Vitro* Model. *Respir. Care* <https://doi.org/10.1187/respcare.02074> (2012).
- Kolferidis, D. P. *et al.* Aerosolized plus Intravenous Colistin versus Intravenous Colistin Alone for the Treatment of Ventilator-Associated Pneumonia: A Matched Case-Control Study. *Clin. Infect. Dis.* **51**, 1238–1244 (2010).

13. Korbila, I. P. *et al.* Inhaled colistin as adjunctive therapy to intravenous colistin for the treatment of microbiologically documented ventilator-associated pneumonia: a comparative cohort study. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 1230–1236 (2010).
14. Dugernier, J. *et al.* Aerosol delivery during invasive mechanical ventilation: a systematic review. *Crit. Care* **21**, 264 (2017).
15. Mizén, L. Chapter 11 - Methods for Obtaining Human-like Pharmacokinetic Patterns in Experimental Animals. in *Handbook of Animal Models of Infection* (eds. Zak, O. & Sande, M. A.) 93–103 (Academic Press, 1999). doi:10.1016/B978-012775390-4/50150-0
16. Phalen, R. E., Oldham, M. J. & Wolff, R. K. The relevance of animal models for aerosol studies. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **21**, 113–124 (2008).
17. Perinel, S. *et al.* Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new *ex vivo* preclinical model. *Respir. Res.*, **17**, (2016).
18. Perinel, S. *et al.* Development of an *ex vivo* human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Sci. Rep.*, **7**, (2017).
19. Quanjer, P. H. *et al.* Lung volumes and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the European Respiratory Society. *Eur. Respir. J. Suppl.* **16**, 5–40 (1993).
20. Culver, B. H. *et al.* Recommendations for a Standardized Pulmonary Function Report. An Official American Thoracic Society Technical Statement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 1463–1472 (2017).
21. Pan, E. *et al.* An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 1253–1263 (2017).
22. Bellani, G. *et al.* Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA* **315**, 788 (2016).
23. West, J. B. *Pulmonary Pathophysiology - The Essentials*. (Baltimore: Williams & Wilkins, 2000).
24. Albrecht, E., Haberer, J. P. & Buchser, E. *Manuel Pratique d'Anesthésie*. (Masson, 2006).
25. Möller, W., Meyer, G., Scheuch, G., Kreyling, W. G. & Bennett, W. D. Left-to-right asymmetry of aerosol deposition after shallow bolus inhalation depends on lung ventilation. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **22**, 333–339 (2009).
26. Ehrmann, S., Guillon, A., Mercier, E., Vecellio, L. & Dequin, P.-F. Administration d'aérosols médicamenteux au cours de la ventilation mécanique. *Réanimation* **21**, 42–54 (2012).
27. Gowda, A. A., Cuccia, A. D. & Smaldone, G. C. Reliability of Vibrating Mesh Technology. *Respir. Care* **62**, 65–69 (2017).
28. Lu, Q. *et al.* Nebulized Ceftazidime and Amikacin in Ventilator-associated Pneumonia Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 106–115 (2011).
29. Davies, J. B. S. & Bromilow, J. Bacterial filter obstruction with the use of ultrasonic nebulisation. *Anaesthesia* **66**, 394–395 (2011).
30. Miller, D. D., Amin, M. M., Palmer, L. B., Shah, A. R. & Smaldone, G. C. Aerosol Delivery and Modern Mechanical Ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 1205–1209 (2003).
31. Lin, H.-L., Fink, J. B., Zhou, Y. & Cheng, Y.-S. Influence of Moisture Accumulation in Inline Spacer on Delivery of Aerosol Using Metered-Dose Inhaler During Mechanical Ventilation. *Respir. Care* **54**, 1336–1341 (2009).
32. Fenwick, N., Griffin, G. & Gauthier, C. The welfare of animals used in science: How the “Three Rs” ethic guides improvements. *Can. Vet. J.* **50**, 523–530 (2009).
33. Esteban, A. *et al.* Evolution of Mortality over Time in Patients Receiving Mechanical Ventilation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 220–230 (2013).
34. Fazio, F. & Jones, T. Assessment of regional ventilation by continuous inhalation of radioactive krypton-81m. *Br. Med. J.* **3**, 673–676 (1975).
35. Newman, S. *et al.* Standardization of techniques for using planar (2D) imaging for aerosol deposition assessment of orally inhaled products. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **25**(Suppl 1), S10–28 (2012).
36. Gonda, I. Scintigraphic Techniques for Measuring *In Vivo* Deposition. *J. Aerosol Med.* **9**, S–59 (1996).
37. Lee, Z., Berridge, M. S., Nelson, A. D. & Heald, D. L. The Effect of Scatter and Attenuation on Aerosol Deposition as Determined by Gamma Scintigraphy. *J. Aerosol Med.* **14**, 167–183 (2001).

Acknowledgements

Three companies are thanked for their help in this work: Dräger company as graciously lending the ICU ventilator, Despinasse Viande SA company as the supplier for porcine respiratory tracts and Aerogen Ltd for graciously providing the vibrating mesh nebulizer Aerogen® Solo. This work was funded by the French National Research Agency [ANR-17-CE19-0002-01].

Author contributions

Q.G., Y.M., S.P.-R., N.P. and J.P. designed experiments. Y.M., Q.G., S.P.-R., L.L., C.G., A.C., N.P. and J.P. conducted the experiments. Q.G. and Y.M. analyzed the data. Q.G., S.P.-R., J.P. and Y.M. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests


The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to S.P.-R.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

3. Conclusions et perspectives

La faisabilité de ce modèle a été validé au cours de l'étude réalisée lors de son développement. Les données obtenues sont comparables à celles des enregistrées chez les patients. Cependant, ce modèle n'est qu'une preuve de concept, il n'est pas représentatif de la réalité clinique

rencontrée dans les services de réanimation. Du fait de la sécheresse et de la température des gaz médicaux, il est contre-indiqué de ventiler les patients sans l'adjonction d'un dispositif ayant pour rôle de réchauffer et d'humidifier les gaz ventilant le patient.

L'existence de fuites, c'est-à-dire de différences entre les volumes inspirés et expirés, est une autre limite de ce modèle. Cependant, celle-ci est inévitable du fait de la présence de lésions pulmonaires liées à la dissection des animaux dans les abattoirs. Toutefois, cette limite a été monitorée et les fuites ont été réduites à leurs minimums par un scellage de l'enceinte et l'application de colle à base de cyanoacrylate, similaire aux colles chirurgicales, sur les plaies pulmonaires. Enfin, ces fuites n'impactent pas l'homogénéité de la ventilation, ce qui limite leur impact sur la modification des dépôts pulmonaires.

La faisabilité de la ventilation mécanique sur le modèle *ex vivo* étant validée, différentes applications de ce modèle ont été envisagées et réalisées. L'une d'elles est présentée dans la partie suivante.

Partie 4

Applications précliniques des différents modèles *ex vivo*

Cette partie présente des applications concrètes et directes des modèles *ex vivo* développés. Au cours des prochains chapitres, l'utilité de l'outil que sont les modèles *ex vivo* pour l'étude des dépôts d'aérosols au sein du tractus respiratoires est observée à travers 3 champs d'application différents : la ventilation mécanique en réanimation, la délivrance pulmonaire de nanoparticule thérapeutique et l'étude des expositions à la cigarette électronique.

Chapitre 5

Recherche d'une position optimale pour les nébuliseurs sur un circuit respiratoire en ventilation mécanique

1. Introduction

Cette étude fait directement suite à l'étude de faisabilité du modèle *ex vivo* en ventilation mécanique. Comme précédemment explicité, peu d'études existent sur l'effet de l'humidification et du réchauffement des gaz inhalés sur la régionalisation des dépôts d'aérosols d'un patient en ventilation mécanique invasive. En outre, la majorité de ces études sont des études *in vitro* sur banc. Leur transposabilité à la clinique est donc relativement limitée.

Ainsi, le modèle *ex vivo* a, ici, été utilisé pour déterminer l'emplacement optimal d'un nébuliseur à tamis vibrant sur le circuit de ventilation. L'effet des phénomènes de croissance hygroscopique est également évalué au cours de cette étude par comparaison des dépôts pulmonaires d'aérosol entre circuit humidifié et non humidifié.

Cet article est, actuellement, en cours de formalisation et de révision.

2. Article

Impact of humidification and nebulizer position for aerosoltherapy under mechanical ventilation: comparative study of aerosol deposition cartography in the respiratory tract.

Yoann Montigaud¹, Quentin Georges², Lara Leclerc¹, Emmanuel Odouard³, Anthony Clotagatide³, Aurore Louf-Durier², Jérémie Pourchez¹, Nathalie Prévôt^{3,4}, Sophie Périnel^{2,4}

¹Intensive care unit G, CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France.

²Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, F - 42023 Saint-Etienne France.

³ Nuclear medicine unit, CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F-42055, France.

⁴INSERM U1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, F-42023, France.

Contributorship:

YM, LL, JP, NP, and SP contributed to the conception and the design of the work

ALD, YM, QG, AC and NP mainly contributed to the acquisition and analysis of data

YM and SP mainly contributed in drafting the work

All the authors reviewed the draft and gave a final approval before submission.

Aerogen Ltd graciously provided the nebulizers but was not implicated in the study.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.org

INTRODUCTION

Since more than 30 years, intensive care allowed to increase the survival rate of patients in critical state. Despite this tremendous success, some of the clinical practices in intensive care units (ICU) are still led by empirical choices instead of evidence-based decisions. Among these, nebulization practices in ICU rest on main data from old *in vitro* studies (réf) while it could be depicted as essential interest considering that 25% of ICU patients receive nebulization of various drugs (1, 2).

Different parameters impact the deposition of an aerosol in the respiratory tract (RT). First they are related to the patient (disease, anatomy of the tracheobronchial tree, pulmonary mechanics etc.), then to the couple drug-nebulizer (physicochemical properties of the drug and of the aerosol, position of the nebulizer in the circuit, etc.) and finally to the ventilator and its circuit (artificial airways, tuning and triggering, heat and humidification, ...) (3–5). The impacts of these parameters are mainly assessed by *in vitro* studies, which could lack of relevance because the widely performed measure of the aerosol impaction on a filter at the end of the circuit is different from an administration in the desired location in the RT (réfs). Besides, clinical studies are mainly focused on the patients' outcomes, such as the therapeutic efficacy of the treatment (6–11). Indeed, the literature is scarce concerning the cartography of aerosol deposition as well as nebulisation parameters in patients under mechanical ventilation (12, 13). Moreover, these rare published data lack of systematic assessment and should be cautiously extrapolated due to the wide range of clinical practices in ICU, for both ventilator tuning, nebulization techniques and aerosol delivery (1, 13–15).

Therefore, a data gap needs to be bridged concerning the precise cartography of the deposition pattern of an aerosol in a patient under mechanical ventilation (). However, despite the need of clinical studies, technical constraints, and ethical restrictions limit research on ICU patients. Moreover, existing *in vivo* models sometimes lack relevance (for example ventilation physiology of rats is very different from humans (réf)) or are difficult to compare with *in vivo* human data.

To overcome these limitations, our team developed an *ex vivo* model of porcine RT to assess the deposition of an aerosol within the respiratory tract (16, 17) with standardized parameters. The feasibility to mechanically ventilate this model with a clinical ventilator was, latter, assessed and validated (18). To move forward, the present study aims to assess the impact of humidification and of the nebulizer position in the circuit on the precise cartography of the aerosol deposition within the RT as well as in the different elements composing the ventilation set up.

METHODS

Preclinical respiratory model

The aerosol delivery during invasive mechanical ventilation using a preclinical *ex vivo* respiratory model was previously validated (1). Briefly, it was composed of a porcine RT placed in a sealed enclosure. An endotracheal tube (ETT, Smiths Medical, Portex® SACETT™, Plymouth Minnesota USA) was connected to the trachea with a standardized length. The model was set in a 30° proclive position and mechanically ventilated with positive airway pressure.

Ventilation settings and circuits

The *ex vivo* model was used under controlled volumetric ventilation thanks to a medical ventilator (SERVO-I v2-01-00, Maquet, Solna, Sweden) with systematic security tests before experiments. The ventilation parameters were identical for each condition with a tidal volume of 540 mL, respiratory rate of 20/min, inspiratory flow of 35 L/min, inspiratory to expiratory ratio of 1/2, and positive end expiratory pressure of 9 cmH₂O. For this work, no spontaneous breathing was used.

The ventilator was connected to the ETT with a medical 2 limbs circuit (Evaqua 2™, Fischer&Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand) with or without heated humidifier (HH, MR410, Fischer&Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand) in the inspiratory limb (IL) according to each experimental condition studied. The first part of this study (Part A) corresponds to dried and cool conditions i.e. any humidification or heating of gases. Part B corresponds to humidified and heated conditions thanks to the HH placed on the circuit as recommended by manufacturer. An expiratory filter (DAR™ HME Filter, ref. 354/5876, Covidien™, Dublin, Ireland) was systematically placed on the expiratory limb (EL), closed to the expiratory valve. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** displays schematically the different experimental conditions.

Nebulization procedure

A vibrating mesh nebulizer was used (Aerogen Solo®, Aerogen Ltd, Galway, Ireland). Nebulization was performed until atomization as recommended by the manufacturer. According to each experimental condition, the nebulizer was placed at different positions on the respiratory circuit: as closed as possible to the ventilator, right before HH, 15 centimeters from Y piece adaptor and right after this latest one (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Each experimental condition was tested at least in 3 replicates.

Gamma imaging

The gamma camera acquisition were performed as described in the study of Montigaud et al. (1) Briefly, the nebulizer was filled with 3mL of ^{99m}technetium-labeled diethylene-triamine-penta-acetic acid (^{99m}Tc-DTPA). This allowed 2-dimensional scintigraphic imaging with a SPECT/CT (Symbia T2, Siemens, Knoxville, USA) and a quantitative determination of the deposited fractions in each part of the setting. Furthermore, two different regions of interest (ROIs) were identified – central and peripheral zones – to observe differences in central and peripheral distributions for each experimental condition.

Size distribution assessment

To determine the size distribution of each aerosol according to experimental condition, an analysis by cascade impactor was performed at the origin of ETT. Then, mathematical determination of MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) was performed.

Statistical analysis

Results are reported as numbers (%), means with standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® v8.0.2 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Additional details on the method for making these measurements are provided in an online data supplement.

RESULTS

Nebulization

The model was set up 18 times with different respiratory tracts achieving successful ventilation and nebulization. 6 experiments were realized for Position A-1 and 3 experiments for each other positions. Nebulization ended successfully before acquisitions for all experiments.

The nebulized fraction of nominal dose was 94% (+/-7%) for position A-1, 98% (+/- 1%) for position A-2, 91% (+/- 12%) for position B-1, 97% (+/- 3%) for position B-2, 96% (+/- 4%) for position B-3. Comparisons showed no significant difference in output according to the condition.

Deposited fractions

The scintigraphies realized allowed to calculate the deposited fractions for each component of the setting, leading to comparative results as shown in *Figure 2 and 3* and in supplementary data *Figure S1*. For dry conditions, the deposited fractions varied according to position A-1 and A-2. They reached respectively 45% (+/-10%) and 14% (+/-5%) for IL, 4% (+/-2%) and 10% (+/-1%) for ETT, 18% (+/-4%) and 53% (+/-4%) for the RT, 34% (+/- 9%) and 26% (+/-2%) for EL.

For humidified conditions, i.e. positions B-1, B-2 and B-3, the deposited fractions were respectively 46% (+/-6%), 23% (+/-16%) and 5% (+/-1%) for IL, 2% (+/-0%), 2% (+/-0%) and 3% (+/-1%) for ETT. For the RT they reached respectively 25% (+/-3%) and 57% (+/-8%). Finally, for EL the values were respectively 15% (+/- 1%)? 18% (+/-8%) and 49% (+/-10%).

As presented in *Table 1* and on *Figure 3 panel A*, the RT fraction of nebulized dose varied significantly according to the condition. The impact of nebulizer position showed significant differences for quantitative RT deposition between the positions proximal (Conditions A-1 and B-1) and distal (Conditions A-2, B-2 and B-3) on IL. No significant difference arises for RT deposition fraction between the two conditions next to Y piece (Conditions B-2 and B-3) and between dry and humidified conditions for a same position. All p values for these comparisons are available as supplementary *table S1*.

Respiratory tract distribution

The regional distribution of aerosol cartography in the RT is displayed in *Table 1* and *Figure 3*, expressed as fraction of nebulized dose. Briefly, for dry conditions A-1 and A-2, the central part of RT fraction were respectively 16% ($\pm 11\%$) and 55% ($\pm 6\%$); For humidified conditions B-1, B-2 and B-3, the central part of RT were respectively 55% ($\pm 6\%$), 68% ($\pm 4\%$) and 62% ($\pm 2\%$). The RT distribution expressed as percentages of RT deposited activity for each

condition are presented on *Panel B Figure 3*. The comparisons performed showed no significant difference between dry and humidified conditions. But the interaction of position and humidification lead to a significant difference in RT distribution for condition A-1 when compared to each other condition ($p < 0,001$). The distribution for condition A-1 was significantly more peripheral than each other condition. All p values for these data are available as supplementary *table S2*.

Size distribution

MMAD for each condition are displayed in *Table 2*. The MMAD measured for the nebulizer used in this work was $1,94\mu\text{m} (\pm 0,34\mu\text{m})$. For dry conditions A-1 and A-2 the MMAD reached respectively $1,69\mu\text{m} (\pm 0,00\mu\text{m})$ and $1,92\mu\text{m} (\pm 0,09\mu\text{m})$. For humidified conditions B-1, B-2 and B-3 the calculated MMAD were respectively $4,12\mu\text{m} (\pm 0,04\mu\text{m})$, $4,79\mu\text{m} (\pm 0,34\mu\text{m})$ and $4,94 (\pm 0,27\mu\text{m})$.

The comparison of MMAD for the nebulizer and both dry conditions (A-1 and A-2) showed no significant differences. In contrast, each humidified condition had a MMAD significantly different from nebulizer and dry conditions. Moreover, the condition B-1 showed a MMAD significantly different from B-2 and B-3, but no significant difference was shown between conditions B-2 and B-3. The supplementary *Table S3* presents all the p value for these results.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study comparing the impact of nebulizer position and gas humidification on the deposition cartography with a model of adult respiratory tract. This work shows that other conditions being similar, these two parameters can modify the deposited fraction in the respiratory tract from 18 to 55%, leading to potential wide differences in nebulization efficiency for the patient. This finding raises a major concern about practices in ICU as some international epidemiological studies highlighted wide differences in clinical practices (réf). Moreover, this study was performed with a new generation vibrating mesh nebulizer, with an output higher than 90%, which is an important data because epidemiological studies show a majority use of jet nebulizers in ICU (). Despite economic considerations, their output is largely lower, ranging from according to different studies (réf). Finally, this data has been suspected to impact ICU patients outcome as a trends to shorter length of stay for asthmatic patients.

Impact of position

The location of the nebulizer on IL is a major determinant for the absolute quantitative dose reaching the RT. Indeed, despite an use validated by manufacturer, a nebulizer position upstream the HH (conditions A-1 and B-1) led to a mean RT deposited fraction ranging from 18% to 25% while a position right before the Y piece adaptor (conditions A-2 and B-2) produced a mean RT deposited fraction ranging from 53 to 57%. Obviously, this difference is largely significant and can lead to wide differences in medication efficacy. Even if the difference is not significative, the nebulizer position beyond the Y piece adaptor tend to a higher loss in EL and lower RT deposited fraction than the position 15cm before Y piece adaptor ($p=0,0508$). These data are in accordance with the in vitro study from Ari et al ()

which compared the three same positions with and without humidification. Nevertheless, due to a design with deposition on a filter instead of a respiratory tract, the expiratory loss and regional cartography could not be known on this model. ...

Impact of humidification

No difference was shown for humidification in terms of absolute RT deposited dose. Nevertheless, a difference arose for the RT distribution when the position upstream the HH and the dry condition interacts. Indeed, these parameters (condition A-1) allowed a more peripheral deposition compared to each other condition. However, this finding must be first balanced with an absolute RT deposited fraction lower than other conditions and then with the risks for patients when interrupting the humidification for nebulization. Indeed, there are two principal ways of humidification for patients under mechanical ventilation: heat and moisture exchangers (HME) needing to be removed for the duration of nebulization to allow the passing of aerosol (1) and HH. The cessation of HH just before nebulization showed an important residual humidity in limbs, being consequently ineffective to obtain “dry conditions” (2) and the removal of HME was reported as dangerous for patients if prolonged (3). This finding is in accordance with a clinical study on asthmatic patients showing no significant difference for clinical endpoints according to humidification or not (4). This point raise questions about the evidences to interrupt humidification during nebulization.

Strength and limitations

Despite its interesting generated data, this model presents some limitations. First, as all models, our *ex vivo* will never be able to mimic the complexity of a whole organism. Therefore, it is only a preclinical model and data have to be confirmed by clinical studies. To date, data from this study seem in good agreement with the clinical study on ICU patients of *Klockare et al* (5) where with an ultrasound nebulizer (MMAD 4,0 μ m) and humidification by HH, the central fraction of RT deposited fraction had a median of 62,8%. Moreover, considering that a vast majority of data for aerosoltherapy provide from *in vitro* studies, this model allowing to determine a RT distribution can be important for aerosoltherapy research. Second, this model is based on porcine respiratory tracts collected from slaughterhouses. This is first a strength because any animal was specifically sacrificed for this study, lungs being a waste for food industry. But this point is equally a limitation because they presented cuts that generated leakage from the pulmonary parenchyma under positive airway pressures of mechanical ventilation. This particular point was discussed on the previously published data and did not influence the homogeneity of the ventilation (citer publi VADOR). Moreover, improvements were realized to minimize the potential leakage using cyanoacrylate glue and stitches and by a better sealing of the enclosure.

Nevertheless, as there is an important data gap on these particular topics – *e.g.* the respective impact of the position of the nebulizer and the humidification – this model presents certain strengths. First, the model is following the 3R guidelines by providing a replacement to animal experiment to study the regional aerosol deposition. Second, as a direct consequence, this model is cost-effective as all the costs induced by animal experimentation are absent. Third this *ex vivo* model showed a good reproducibility and repeatability. This point is

particularly interesting in preclinical research as cellular *in vitro* experiments and *in vivo* models could present a wide dispersion of data. Lastly, as previously stated, there is a lack of published literature concerning the impact of the humidification and the nebulizer position on the deposition pattern of an aerosol when administered during mechanical ventilation. Among the few clinical studies, the endpoints mainly concern patients' outcomes, such as improvement of the general state, weaning of mechanical ventilation, etc. or have difficulties to show differences, probably because of the multiplicity of influencing factors (réf) Moreover, most of the studies were conducted on patients under non-invasive ventilation. Hence, more than 30 years after the development of ICU and aerosoltherapy, the positioning of the nebulizer on the ventilation circuit is mainly driven by empirical practices, as well as the practices concerning the humidification during nebulization. Therefore, despite its limitations, the developed *ex vivo* model represent a tool to manage the cofounding biases and to generate standardized preclinical data, that could be used as a base to build clinical comparative studies to validate the preclinical findings presented in this study and improve efficacy of aerosoltherapy for patients in ICU.

Conclusion

Humidification and nebulizer position in the ventilation circuit are two major determinants to optimize nebulization technics under mechanical ventilation and standardize practices in ICU.

The position 15cm before the Y piece adaptor allows a more than two-fold higher dose in the RT. This result, even needing additional clinical data, is of importance to standardize practices with optimal conditions.

Humidification tends to a deposition more central in the RT but as the interruption can be dangerous for patients and considering the low impact compared to positioning, the removal of HH as to be examined carefully before considering its recommendation. Moreover, taking account the impact of nebulizer choice and optimized positioning, this study leads to think about pursuit of humidification as a security recommendation.

To conclude, these data are preclinical and consequently need clinical data to confirm. Yet, the standardized *ex vivo* method used with comparative data of each parameter i.e. humidification and positioning, leads to consider these results for further works on aerosoltherapy in ICU.

ACKNOWLEDGMENTS

REFERENCES

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of the different experimental conditions according to humidification and nebulizer position.

Part A: dry conditions; Part B: humidified conditions. Cm: centimeters.

Figure 2: Deposited fractions (%) of the nebulized dose in each component of the setting.

Part A: dry conditions; Part B: humidified conditions. Results expressed as mean +/- standard deviation.

Figure 3: Bar graph of deposited activity in respiratory tract (RT), central and peripheral regions of interest.

Panel A: comparison for each condition of RT, central and peripheral fractions of nebulized dose.

Panel B: comparison of central and peripheral activities expressed as percentages of RT deposited activity.

A in red colors: dry conditions; B with blue colors: humidified conditions. Results expressed as mean +/- standard deviation.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. ns: non-significant.

TABLES

Table 1: Fraction of the nebulized dose deposited in the respiratory tract (RT) and its repartition.

Conditions A: dry conditions; Conditions B: humidified conditions. Results are displayed as mean and standard deviation (SD).

All data are expressed as percentages of nebulized dose.

Condition	RT	Central	Peripheral
A-1	18% ($\pm 4\%$)	3% ($\pm 2\%$)	15% ($\pm 4\%$)
A-2	53% ($\pm 4\%$)	29% ($\pm 2\%$)	24% ($\pm 5\%$)
B-1	25% ($\pm 3\%$)	13% ($\pm 0\%$)	11% ($\pm 3\%$)
B-2	57% ($\pm 8\%$)	39% ($\pm 7\%$)	18% ($\pm 3\%$)
B-3	43% ($\pm 11\%$)	26% ($\pm 6\%$)	17% ($\pm 5\%$)

Table 2: Mass median aerodynamic diameter (MMAD) of the nebulizer and for each experimental condition.

Conditions A: dry conditions; Conditions B: humidified conditions. Results are displayed as mean and standard deviation (SD).

Condition	MMAD \pm SD
Nebulizer	1,94 \pm 0,34 μ m
A-1	1,69 \pm 0,00 μ m
A-2	1,92 \pm 0,09 μ m
B-1	4,12 \pm 0,04 μ m
B-2	4,79 \pm 0,34 μ m
B-3	4,94 \pm 0,27 μ m

FIGURES Figure 1

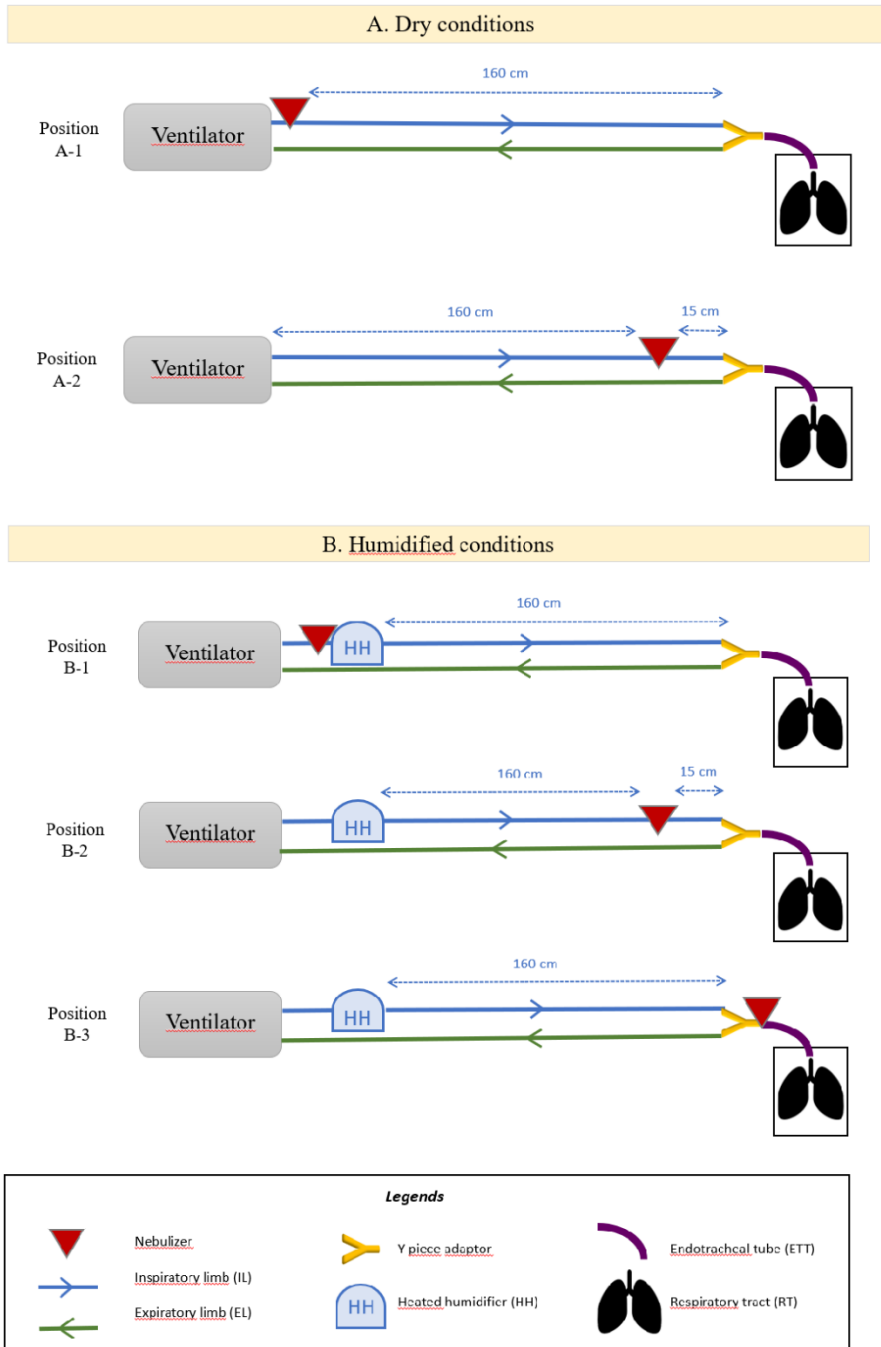


Figure 2

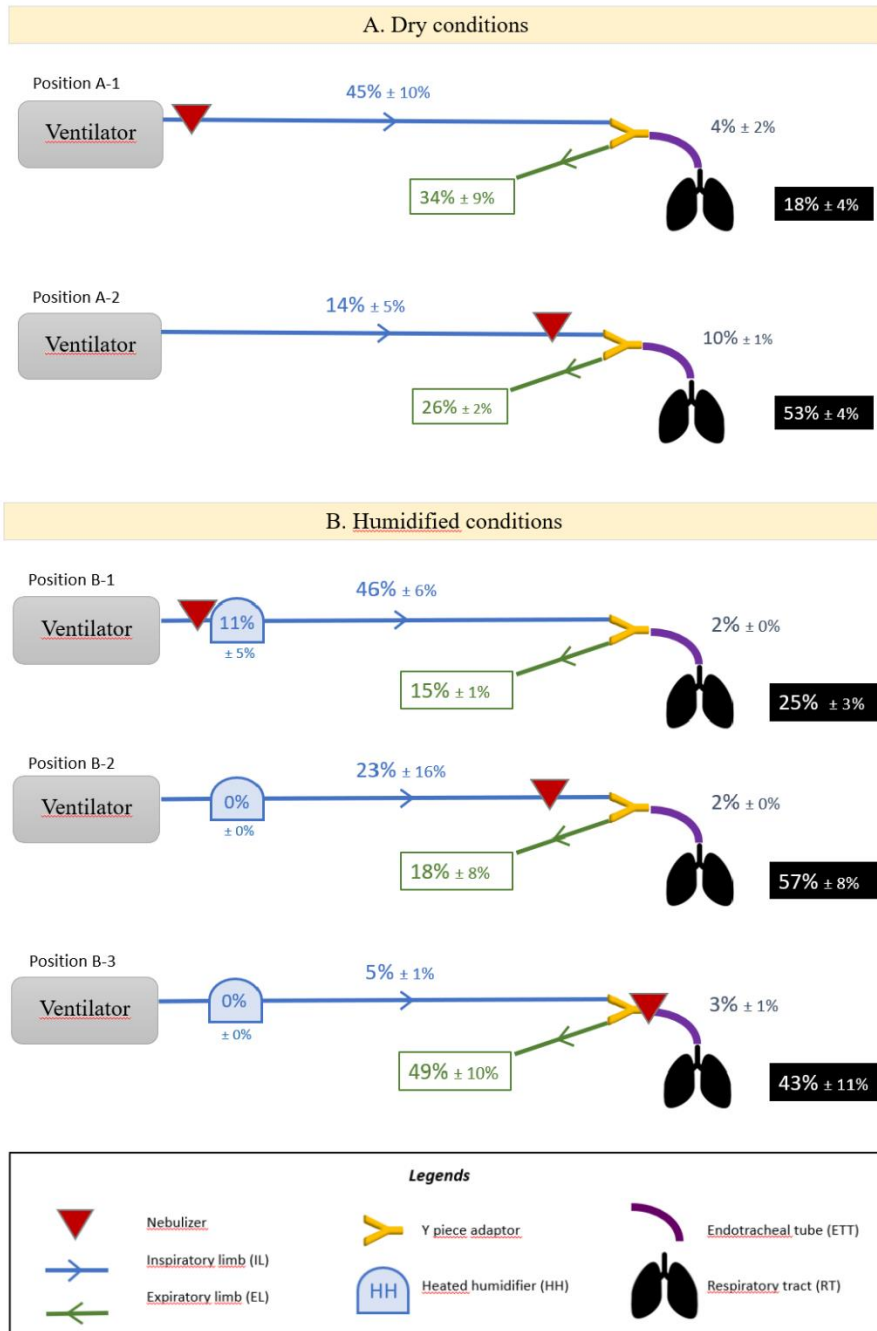
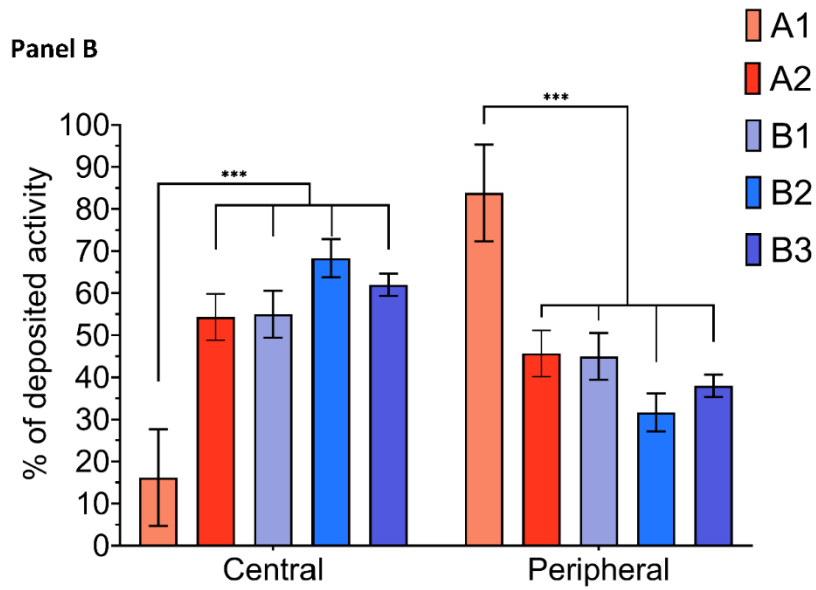
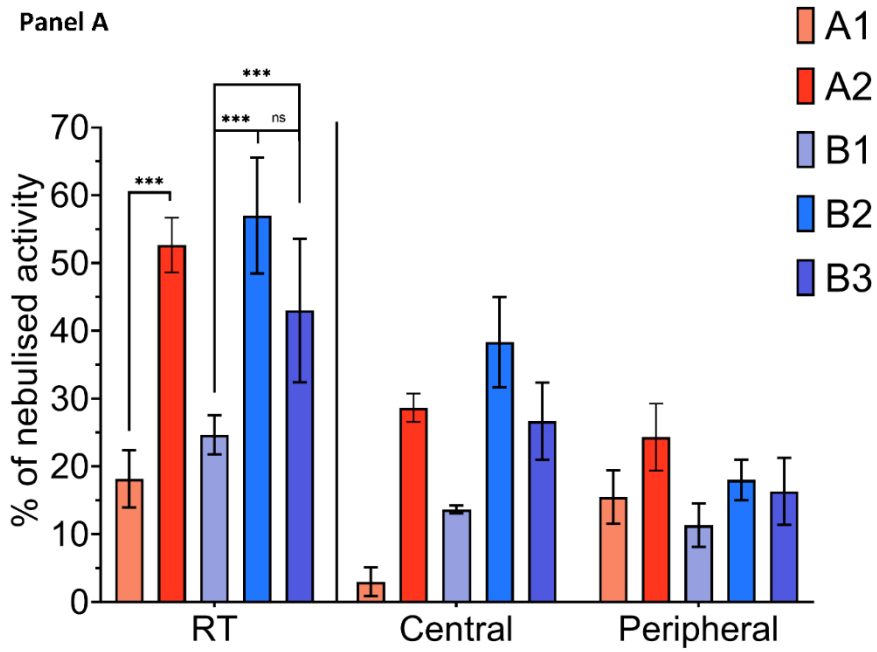


Figure 3



3. Données supplémentaires

Online Data Supplement

Impact of humidification and nebulizer position for aerosoltherapy under mechanical ventilation: comparative study of regional aerosol deposition in the respiratory tract.

Yoann Montigaud¹, Quentin Georges², Lara Leclerc¹, Anthony Clotagatide³, Aurore Louf-Durier²Jérémie Pourchez¹, Nathalie Prévôt^{3,4}, Sophie Périnel^{2,4}

METHODS: supplementary data

Preclinical respiratory model

The aerosol delivery during invasive mechanical ventilation using a preclinical *ex vivo* respiratory model was previously validated (*Montigaud et al.* It was composed of a porcine respiratory tract collected from slaughterhouses as waste of food industry. Hence, they succeed all the sanitary controls in accordance with French regulation with strict veterinarian controls of animal welfare and any animal was specifically sacrificed for this work, in accordance with the 3R guidelines(1). For sanitary reasons, each respiratory tract was used within 24 hours. Otherwise they were frozen and thereafter thawed at ambient temperature few hours before the experiment. Relevant sutures were realized on each significant cut and their number was recorded. A systematic bronchoscopy allowed to ensure the absence of major obstruction in reachable bronchi. Respiratory tracts were placed in a sealed enclosure. This later one allows both positive and negative pressure ventilations. A 7.5mm inner diameter endotracheal tube (ETT, Smiths Medical, Portex® SACETT™ Plymouth Minnesota USA) with a 34cm length was connected to the trachea with a standardized trachea length of 15cm in order to avoid selective intubation. The model was set in a 30° proclive position, as close as possible to the patient position for nebulization in intensive care units (ICU) and mechanically ventilated with positive airway pressure.

Ventilation settings and circuits

The *ex vivo* model was used under controlled volumetric ventilation thanks to a medical ventilator (SERVO-I v2-01-00, Maquet, Solna, Sweden) with systematic security tests before experiments. This ventilation mode was selected because it is currently recommended to optimize RT deposition fraction of nebulization (Dugermier et al., 2017) and is widely used in ICUs (réf Esteban). The ventilation parameters were identical for each condition and adapted to be comparable to __ with a tidal volume of 540mL, respiratory rate of 20/min, inspiratory flow of 35L/min with a constant flow pattern, inspiratory to expiratory ratio of 1/2, positive end expiratory pressure of 9cmH20 and inspired oxygen fraction of 21%. These parameters were chosen in accordance with data from a large cohort study in ICUs over the world (réf Esteban). For the purpose of this work, no spontaneous breathing was used. The ETT was set with an angulation of 90°, determined thanks to data from CT scans of intubated patients.

The ventilator was connected to the ETT with a medical circuit (Evaqua 2™, ref. RT380, Fischer&Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand) with or without heated humidifier (HH, ref. MR410 AFU, Fischer&Paykel Healthcare, Auckland, New Zealand) according to experimental condition studied. This study is composed of two categories of experiments: Part A corresponds to dried and cool conditions i.e. any humidification nor heating of gases in the circuit. Part B corresponds to humidified and heated conditions thanks to a HH placed on the circuit as recommended by manufacturer. An expiratory filter (DAR™ HME Filter, ref. 354/5876, Covidien™, Dublin, Ireland) was placed on the expiratory limb, closed to the expiratory valve to avoid damages and obstructions, as recommended for nebulization (réf Ehrmann 2012).

Nebulization procedure

A vibrating mesh nebulizer was used for this work (Aerogen Solo®, Aerogen Ltd, Galway, Ireland) because among all nebulization devices, vibrating mesh are those leading to the best percentage of nominal dose nebulized^{6,9}. The minimal duration of nebulization was standardized to 15 min based on preliminary test run, in good accordance with previous study from *Dugernier et al.*⁸ showing an average 9 minutes (+/-3) nebulization. The termination of nebulization was checked systematically before acquisitions. Each experimental condition was tested at least in 3 replicates. The condition A-1 corresponds to experiments previously published (réf) and was performed with 6 replicates. All other conditions were tested in three replicates.

Gamma imaging

The nebulizer was filled with 3 mL of ^{99m}technetium-labeled diethylene-triamine-penta-acetic acid (^{99m}Tc-DTPA, 100 MBq) for acquisition of planar scintigraphic images. These later ones (matrix 256*256) were recorded with a variable angle dual detector SPECT/CT (SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, USA) equipped with a low-energy, high-resolution collimator (FWHM 8.3 mm at 10 cm); tested weekly for uniformity (UFOV 533 mm × 387 mm, CFOV 400 mm × 290 mm). First, the initial radioactive dose filled in the nebulizer was quantified (scintigraphic images, 60-sec anterior/posterior, were acquired corresponding to the fully loaded minus the empty syringe). Nominal dose stood for the total amount of radioactivity introduced into the nebulizer, allowing to determine the nebulized fraction of nominal dose, i.e. the output of the nebulizer. Then, the nebulization procedure was performed. Finally 180-sec anterior/posterior images of each part of the experimental setup were acquired for each element: empty nebulizer, inspiratory limb, heated humidifier, endotracheal tube, Y-piece associated to expiratory limb and respiratory tract. For this latest, two different regions of interest (ROIs) were identified on scintigraphies within each lung... to divide lungs into central and peripheral zones. A central ROI with dimensions equal to half of the width of a whole lung region and one-half of its height was positioned on the interior boundary of the lung, centered by height. The central and peripheral regions represented respectively 25% and 75% of the whole lung region. This allowed to calculate the relative uptake of central and peripheral regions for both left and right lung. ROIs were delimited on the images with a correction considering the background radiation, the physical decay of radioactivity and tissue attenuation correction factors. Consequently, as stated by *Newman et al.*^{35–37}, some limitations of data quantification in planar imaging are inherent to its 2D nature. It is accepted that errors of no more than 10% in the quantification of whole-lung deposition are tolerated and that mass balance close to 100% validate the method used for attenuation and scatter

correction. Hence, the results were expressed as a percentage of activity in relation to the nominal dose and the nebulized dose, adjusted to 100%.

Aerosol size distribution

To determine the aerodynamic size distribution of the aerosol, the European Pharmacopoeia indicates to use the ACI (Anderson Cascade Impactor). The ACI holds 8 stages from 0.4 μm to $>9 \mu\text{m}$ and is operated at $28.3\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with a vacuum pump (Low Capacity Pump Model LCP5, Copley Scientific Limited, Nottingham, United Kingdom). 3 mL of NaF solution at 2.5% (m/V) were introduced in the tank of the nebulizer. The nebulization process continues until the volume left in the nebulizer is so low that the nebulizer ceases to function continuously and begins to sputter. For A and B experimental conditions, the ACI was placed after the Y piece, right before ETT.

After nebulization, deposited fraction on each stage of the ACI was collected and re-suspended in 5mL of deionized water, then 250 μL of TISAB IV solution (ref: 34574, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) were added. Concentration of fluoride ions was determined with a ionometer (SevenGo Pro apparatus and Perfection probe, Mettler Toledo, Columbus, USA). Calibration of the apparatus was performed before each experiment. Mathematical determination of MMAD (Mass Median Aerodynamic Diameter) was performed with Excel software (Microsoft Excel, Microsoft, Redmond, USA).

Statistical analysis

Results are expressed as mean percentage (%) \pm standard deviation (SD) of the nominal dose of radioactivity. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism® v8.0.2.

Comparison of respiratory tracts used, in terms of mass and cuts, for each position was performed with a Kruskal-Wallis' test and *post-hoc* Dunn's multiple comparison test.

To compare the deposited fractions on each part of the model, a 2-way ANOVA was carried out with a *post-hoc* Tukey's multiple comparison test. Comparison of central and peripheral deposited fractions was carried out with a 2-way ANOVA with *post-hoc* Tukey's multiple comparison test. Comparison of MMAD was performed with 1-way ANOVA with *post-hoc* Tukey's multiple comparison test.

RESULTS: supplementary data

Nebulization

Deposited fractions

Table S1 allows to observe each p value for comparisons of RT deposited fractions according to the condition.

Respiratory tract distribution

Table S2 presents all p vales for comparisons between central and peripheral distributions of RT fraction according to each condition.

Size distribution

Table S3 displays the adjusted p value for each comparison of MMAD according to the condition.

Table S1: Tukey's multiple comparison test of respiratory tract deposited fractions according to the different conditions.

Conditions A: dry conditions; Conditions B: humidified conditions. In bold lettering the statistical significant differences. $P < 0,05$ was considered as significant.

Condition	Adjusted p value
A1 vs. A2	<0,0001
A1 vs. B1	0,4689
A1 vs. B2	<0,0001
A1 vs. B3	<0,0001
A2 vs. B1	<0,0001
A2 vs. B2	0,9081
A2 vs. B3	0,3108
B1 vs. B2	<0,0001
B1 vs. B3	0,0044
B2 vs. B3	0,0508

Table S2: Tukey's multiple comparison test central and peripheral distribution of respiratory tract deposited fractions according to the different conditions.

Conditions A: dry conditions; Conditions B: humidified conditions. In bold lettering the statistical significant differences. $P < 0,05$ was considered as significant.

Condition	Adjusted p value
Central distribution	
A1 vs. A2	<0,0001
A1 vs. B1	<0,0001
A1 vs. B2	<0,0001
A1 vs. B3	<0,0001
A2 vs. B1	>0,9999
A2 vs. B2	0,2349
A2 vs. B3	0,7675
B1 vs. B2	0,2776
B1 vs. B3	0,8205
B2 vs. B3	0,8673
Peripheral distribution	
A1 vs. A2	<0,0001
A1 vs. B1	<0,0001

A1 vs. B2	<0,0001
A1 vs. B3	<0,0001
A2 vs. B1	>0,9999
A2 vs. B2	0,2349
A2 vs. B3	0,7675
B1 vs. B2	0,2776
B1 vs. B3	0,8205
B2 vs. B3	0,8673

Table S3: Tukey's multiple comparison test of MMAD according to the different conditions.

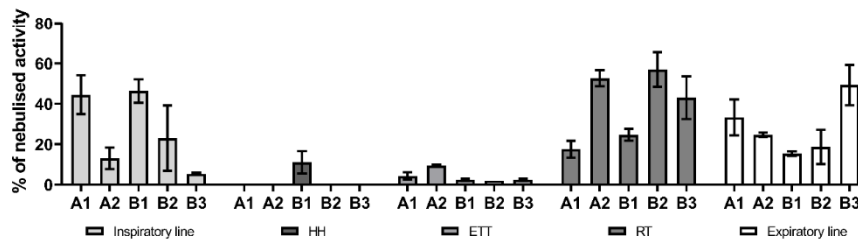
Neb: nebulizer alone; Conditions A are non humidified whereas conditions B are humidified. In bold lettering the statistical significant differences. $P < 0,05$ was considered as significant.

Tukey's multiple comparisons test	Adjusted p Value
Neb vs. A1	0,7672
Neb vs. B1	<0,0001
Neb vs. B2	<0,0001
Neb vs. A2	>0,9999
Neb vs. B3	<0,0001
A1 vs. B1	<0,0001
A1 vs. B2	<0,0001
A1 vs. A2	0,8036
A1 vs. B3	<0,0001
B1 vs. B2	0,0335
B1 vs. A2	<0,0001
B1 vs. B3	0,0086
B2 vs. A2	<0,0001
B2 vs. B3	0,961
B3 vs. A2	<0,0001

Figure S1: Overall comparison of each deposited fraction of nebulized dose in the different parts of the setting for the five conditions.

ETT: endotracheal tube; RT: respiratory tract; HH: heated humidifier

Conditions A are non humidified whereas conditions B are humidified. Subsequent differentiations of conditions are according to the nebulizer position as described in Figure 1.



4. Conclusions et perspectives

Les données obtenues montrent que la position du nébuliseur sur le circuit respiratoire permet de modifier la fraction pulmonaire des dépôts d'aérosols d'un facteur 2 environ. Tandis que l'humidification a pour conséquence d'augmenter la fraction central des dépôts pulmonaires aux dépens de la fraction périphérique. Bien que des données cliniques nécessaires soient nécessaires pour valider ces conclusions, cette application du modèle *ex vivo* montre qu'il est possible de générer des données robustes et fiables pour évaluer les pratiques cliniques existantes.

Chapitre 6

Preuve de concept sur la faisabilité d'aérosolisation des nanoparticules AGuIX® par analyse multimodale de la régionalisation des dépôts pulmonaires

1. Introduction

Cette étude est née d'une collaboration tripartite entre l'Institut Lumière Matière de l'Université de Lyon, par le biais de François LUX et Olivier TILLEMENT, l'équipe IBIO de l'Université de Bordeaux, par le biais de Yannick CREMILLIEUX, et entre l'équipe Particules Inhalées de l'UMR INSERM U1059, par le biais de Jérémie POURCHEZ.

Suite à des essais précliniques prometteurs des nanoparticules AGuIX® sur des modèles *in vivo* murins, l'intérêt d'une administration par voie pulmonaire de ces nanoparticules pour le

traitement de pathologies pulmonaires, telles que les cancers ou la fibrose pulmonaire, a nécessité la mise en place d'une étude préclinique dédiée à la faisabilité de l'aérosolisation de ces nanoparticules à l'aide de nébuliseurs utilisés dans la pratique clinique.

Afin de d'obtenir des données robustes et fiables sur la régionalisation des dépôts d'aérosol contenant des AGuIX[®], l'idée d'une analyse multimodale de la cartographie des dépôts, par IRM et scintigraphie planaire a été proposée. En effet, les AGuIX[®] possèdent des groupements DOTAGA qui chélatent du gadolinium, qui est un agent de contraste IRM. Ces groupements chimiques n'étant pas tous occupés par des atomes de gadolinium, des études préliminaires en collaboration avec les Hospices Civils de Lyon ont montré qu'il était possible de chélater un radiotraceur utilisé en clinique, le chlorure d'indium 111 (¹¹¹In).

Ainsi, cette étude a consisté à radiomarquer les AGuIX[®] avec de l'¹¹¹In, en adaptant le protocole lyonnais, puis à aérosoliser les nanoparticules dans le modèle *ex vivo* à l'aide d'un nébuliseur pneumatique. Des acquisitions IRM et scintigraphiques ont été réalisées et les quantifications des dépôts d'aérosol ont été réalisées.

L'objectif de cette étude était de fournir des données précliniques robustes qui seraient le support d'une potentielle transition clinique de cette nouvelle utilisation des AGuIX[®].

2. Article

Nebulised Gadolinium-Based Nanoparticles for a Multimodal Approach: Quantitative and Qualitative Lung Distribution Using Magnetic Resonance and Scintigraphy Imaging in Isolated Ventilated Porcine Lungs

This article was published in the following Dove Press journal:
International Journal of Nanomedicine

Yoann Montigaud¹
Jérémy Pourchez¹
Lara Leclerc¹
Olivier Tillement²
Anthony Clotagatide^{3,4}
Clémence Bal⁵
Noël Pinaud⁵
Nobuyasu Ichinose^{6,5}
Bei Zhang⁷
Sophie Perinel^{3,4}
François Lux^{2,8}
Yannick Crémillieux⁵
Nathalie Prevot^{3,4}

¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiosse, Centre CIS, Saint-Etienne, France; ²Institut Lumière Matière, Université de Lyon, Villeurbanne, France; ³INSERM U 1059 Sainbiosse, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France; ⁴CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, France; ⁵IBIO, Bordeaux, France; ⁶Canon Medical Systems Corporation, Otawara, Japan; ⁷Canon Medical Systems Europe, Zoetermeer, Netherlands; ⁸Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France

Purpose: This study aims at determining lung distribution of gadolinium-based polysiloxane nanoparticles, AGuIX® (small rigid platform – SRP), as a potential theranostic approach by the pulmonary route.

Methods: First, the aerodynamic size distribution and the aerosol output rate were thoroughly characterized. Then, a multimodal approach using magnetic resonance (MR) and gamma-camera (GC) imaging allows to assess the deposition of the aerosolised nanoparticles in the respiratory tract using isolated ventilated porcine lungs.

Results: The SRP has proven to be radiolabelled by radioisotope with a good yield. Crude SRP or radiolabelled ones showed the same aerodynamic size distribution and output as a conventional molecular tracer, as sodium fluoride. With MR and GC imaging approaches, the nebulised dose represented about 50% of the initial dose of nanoparticles placed in the nebuliser. Results expressed as proportions of the deposited aerosol showed approximately a regional aerosol deposition of 50% of the deposited dose in the lungs and 50% in the upper airways. Each technique assessed a homogeneous pattern of deposited nanoparticles in Lungs. MR observed a strong signal enhancement with the SRP, similar to the one obtained with a commonly used MRI contrast agent, gadoterate meglumine.

Conclusion: As a known theranostic approach by intravenous administration, SRP appeared to be easily aerosolised with a conventional nebuliser. The present work proves that pulmonary administration of SRP is feasible in a human-like model and allows multimodal imaging with MR and GC imaging. This work presents the proof of concept of SRP nebulisation and aims to generate preclinical data for the potential clinical transfer of SRP for pulmonary delivery.

Keywords: aerosol, pulmonary delivery, ex vivo model, MRI, SPECT/CT, theranostic

Introduction

Since decades, nanoparticulate forms are developed to overcome the limitations of drugs by decreasing their intrinsic toxicities and/or by improving their efficacy. Therefore, many nanoparticles were preclinically tested and showed promising results on various therapeutic areas with an unmet medical need such as oncology, orphan diseases, infectiology, etc. However, almost all failed to be transposed in clinical trials

Correspondence: Jérémy Pourchez
Mines Saint-Etienne, 158 Cours Fauriel,
CS 62362, Saint-Etienne, Cedex 2 42023,
France
Tel +33 4 77 42 01 80
Email pourchez@emse.fr

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress    
<https://doi.org/10.2147/IJN.S280649>

International Journal of Nanomedicine 2020:15 7251–7262

7251

 © 2020 Montigaud et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <http://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unported, v3.0) License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. Non-commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<http://www.dovepress.com/terms.php>).

due to an overestimated efficacy, an unfavourable toxicological profile or difficulties concerning the scalability of the manufacturing process.

Among the few nanoparticulate forms that have been successfully translated to the clinics, the small rigid platform AGuX[®] nanoparticles (SRP, NH TheraguiX[®], Villeurbanne, France) act as radiosensitizer and as MRI positive contrast agent.^{1–4} These inorganic nanoparticles are composed of a polysiloxane matrix grafted with DOTAGA moieties mostly chelated by gadolinium, while a small fraction of these moieties – about 2% – remain free to chelate radioactive isotopes allowing multimodal imaging and, therefore, theranostic approach.^{5–10}

SRP is currently implicated in two Phase II clinical trials on brain metastases (NANO-RAD2, NCT03818386 and NANO-STEREO: NCT04094077) and one phase Ib clinical trial on advanced cervical cancer (NANO-COL, NCT03308604).

Although being developed for intravenous administration (IV), pulmonary administration using either intratracheal instillation or nebulised aerosols is an approach that has been previously evaluated in mice.¹¹ Indeed, when administered by the pulmonary route, these nanoparticles can be used to generate specific contrast mechanisms in the lungs.

For pulmonary delivery, the size range of SRP – around 5 nm – is not large enough to ensure retention in the deep lung. Actually, most of them would be exhaled or deposited in the upper airways. It is commonly stated that the most adapted airborne particle sizes for lung targeting are between 2 and 5 μm ¹². Consequently, delivery of nanoparticles to the respiratory tract could be accomplished:

- (i) by nebulisation of nanosuspensions^{13–19} (i.e. generating airborne micron-size droplets containing nanoparticles using a nebuliser)
- (ii) by aerosolisation of solid microparticles containing nanoparticles^{20–23} (e.g. the Trojan horse concept based on the encapsulation of the nanocarriers into airborne microparticles).

Doubtless, the simplest way to administrate these nanoparticles to the lungs is to nebulise them as a suspension. In the present study, no pharmaceutical development was needed to generate a proof of concept. However, such development could be required to improve the stability of the suspension or to increase the efficiency of the nebulisation.

However, some challenges remain to be addressed to choose the most adapted nebulisation system (e.g. air-jet vs vibrating mesh technologies) according to the physicochemical features of the nanosuspension (viscosity, surface tension, etc.). The main challenge is to generate an aerosol of intact nanoparticles – no chemical or size changes – with appropriate aerodynamic performance to reach a relevant aerosol deposition in terms of dose and regional lung targeting. Indeed, the nebulisation technology could have a strong impact on aerosol features: modification of airborne droplet size, decreased aerosol output, enhanced nanoparticle aggregation within droplets or modified nanoparticle shape. For instance, many papers reported that jet nebulisation is generally more disruptive compared to vibrating-mesh nebulisation, for liposomes or polymeric nanoparticles.^{13–19} Nevertheless, due to their physicochemical properties the SRP demonstrated a high stability,⁶ being much less fragile than liposomes or polymeric nanoparticles, which made them promising candidates for jet nebulisation.

Within the framework of a potential clinical translation of nebulised SRP to treat lung diseases, the main objective of this work was to propose the proof of concept that SRP could be suitable for inhalation in a human-like lung model thanks to a conventional clinically used jet nebuliser. On the one hand, nebulisation performances (in terms of aerodynamic size, airborne nanoparticles output rate, etc.) were characterized in vitro using a cascade impactor according to the European standard procedure (NF EN 13544–1) for aerosol medical devices. On the other hand, quantitative and qualitative distribution of nebulised SRP were assessed in an ex vivo respiratory model by a multimodal approach (MRI and scintigraphic imaging). To determine if the SRP suspension induces modifications of nebulisation performances or in the regional aerosol deposition profile, comparison of molecular tracers with SRP nanotracers, either crude or radiolabelled with ¹¹¹In, were performed. Reference nebulisation performances were assessed with sodium fluoride (NaF) while regional aerosol deposition was assessed with gamma camera and magnetic resonance imaging with ^{99m}Tc diethylene triamine pentaacetic acid (^{99m}Tc-DTPA) or gadoterate meglumine, respectively.

Materials and Methods

Ex vivo Respiratory Model for Preclinical Aerosol Studies

The ex vivo respiratory model was composed of a human replica of upper airways connected to porcine lungs. This

original model was previously characterized and validated for preclinical regional aerosol studies^{24,25}. The Ear-Nose-Throat (ENT) replica, including laryngeal structures, was reconstructed from CT scans of a healthy adult subject and manufactured by 3D-printing technology. The scans were provided by the University Hospital of Saint-Etienne. Before radiological examination, patients received an explicit note informing them that their data could be used for research. Afterwards, a written and informed consent is given by patients. This use of patients' data was performed under the supervision of the Ethics Committee of Saint-Etienne hospital. This ENT replica was assessed by endoscopy and CT scans and then validated by a senior radiologist. It was previously used for nasal and pulmonary assessment of aerosol deposition.^{24–28} Porcine respiratory tracts were kindly supplied by a slaughterhouse (DespiVianes, La Talaudière France) and passed all quality controls requested by French regulation. Visual controls of wounds and sutures were achieved, and a bronchoscopy was performed to ensure the absence of significant obstruction of proximal bronchi. Lungs were placed in a sealed enclosure and ventilated using a depression generator (SuperDimension[®], Covidien, Dusseldorf, Germany). Mean depression inside the enclosure was -9 kPa (-92 cmH₂O). These relatively high negative pressures were two times the expected values, according to West.²⁹ Lungs were not used for more than 8 hours. The model was set in supine position with following breathing pattern: 15 cycles per minutes, tidal volume about 500 mL and dynamic compliance about 90 cmH₂O/mL as previously described.^{26,30} A scheme of the model and complete description are provided in [Supplementary Information](#).

Aerosol Medical Device

The chosen medical device was a PARI LC SPRINT (PARI GmbH, Starnberg, Germany) jet nebuliser, with a corresponding compressor PARI TurboBOY[®] SX (PARI GmbH, Starnberg, Germany).

Unless otherwise specified, the reservoir of the nebuliser was always filled with 3 mL of solution/suspension. Nebulisation was conducted until complete atomisation of the suspension.

Particle Aerodynamic Size Distribution

For all tracers (NaF, ^{99m}Tc-DTPA and SRP), the assessment of the mass median aerodynamic diameter (MMAD) was performed in triplicate using a 12-stage DLPI cascade impactor (Dekati Low Pressure Impactor, Dekati Ltd., Kangasala, Finland) operated at an airflow of 10 L.min⁻¹.

The NaF was used as a molecular chemical tracer according to European standard procedure on aerosol medical devices (NF EN 13544–1). The NaF concentration in the samples was assessed by conductimetry (PerfectION[™] combined with a SevenGo pro[™] F– electrode, Mettler Toledo, France). Finally, the MMAD and the geometric standard deviation (GSD) of the nebulised particles were calculated^{31–34}.

^{99m}Tc-DTPA was used as a molecular radiotracer. The deposited fraction on each DLPI stages was collected on an in-house impermeable plastic cover. The amount of ^{99m}Tc-DTPA was quantified using Packard Cobra II auto-gamma counting system (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Then, the activity median aerodynamic diameter (AMAD) and the geometric standard deviation (GSD) of the nebulised particles were calculated.

Finally, the SRP was used as a nanotracer. The nebuliser was filled with 3 mL of SRP suspension (corresponding to 900 μmol of SRP). After nebulisation, the deposited fraction on each DLPI stages was collected using 1 mL of deionised water. The amount of Gd was then quantified by ICP-MS (NexIon 2000, PerkinElmer, Wellesley, MA). Samples for ICP-MS were placed in polytetrafluoroethylene tube compatible with the microwave oven CEM Mars 5. Then, 10 mL of HNO₃ 69% was added. After cooling, the samples were diluted in HNO₃ 1% to reach a sample concentration of 1 g/L. Finally, the MMAD and the geometric standard deviation (GSD) of the nebulised particles were calculated. Further information is provided in the [Supplementary Information](#).

Aerosol Output

The aerosol output delivered by the nebuliser (ie the emitted aerosol fraction) was assessed according to the NF EN 13544–1 European standard using a residual gravimetric method^{31,35}. Briefly, the nebuliser was activated with 3 mL of solution/suspension containing the studied tracers (NaF and SRP), until atomisation. The nebuliser is connected to 2 absolute electrostatic filters: one inhalation filter which is connected to a respiratory pump (PARI Compas II, PARI GmbH, 500 mL tidal volume with sinusoidal pattern; 15 cycles/min; I/E of 1:1) and one expiratory filter placed after a one-way valve. The mass of tracer was measured on the filters before and after nebulisation. Results are presented as a proportion of the tracer in the inhalable filter versus the initial quantity of tracer introduced in the nebuliser.

Regional Aerosol Deposition Assessed by Gamma-Camera Imaging

Nebulised radionuclides used for scintigraphy imaging were ^{99m}Tc -DTPA as molecular radiotracer and ^{111}In chloride (^{111}In) chelated on the SRP as a nanoparticulate radiotracer (^{111}In -SRP). The nebulisation was performed with 100 MBq/3 mL of ^{99m}Tc -DTPA and 60 MBq/3 mL of ^{111}In -SRP suspension. The chelation of ^{111}In on SRP was performed following the protocol developed by Morlieras et al³⁶ and modified for the purification process. Briefly, the nanoparticles were suspended in milliQ water at the concentration of 100 mg/mL. Then, the SRP suspension was mixed with ^{111}In (ratio 1:2). Citrate buffer (pH 5; 100mM) was added qs for 10 mL. The mixture was incubated at 50°C under stirring for 15 minutes. Purification was achieved with Vivacon[®] centrifuge filter 2kDA MWCO (Sartorius, Göttingen, Germany). The complete process of the SRP radiolabelling with ^{111}In could be found in the [Supplementary Information](#). The nebuliser was connected to the ENT by a mouthpiece, sealing was conducted to avoid any loss of generated aerosol. To avoid exposure due to exhaled aerosol, an expiratory filter was positioned after a one-way valve.

The gamma-camera imaging was realized as previously described^{24,26} 2D scintigraphies were conducted on three respiratory tracts for each type of tracer with a variable angle dual detector Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT-CT, SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, TN). The initial radioactive dose in the nebuliser was calculated from the difference of activity between the full and empty syringe. After inhalation of the aerosol, each component of the system was imaged with 3-min anterior/posterior exposition: nebuliser (with dead volume), expiratory filter, ENT replica and respiratory tract. Further information is given in [Supplementary Information](#).

Regional Aerosol Deposition Assessed by MRI

MRI contrast agents used were gadoterate meglumine (Clariscan[®] Gé, GE Healthcare) as a molecular tracer and SRP as nanoparticulate (NP) tracer. The chosen concentration of each tracer was equivalent to 300 mM of gadolinium.

The protocol allowing the imaging of nebulised SRP in isolated porcine lungs was previously described.³⁰ Acquisitions were performed with a 3 Tesla whole body

magnet (Vantage Galan 3T ZGO, Canon Medical Systems Corporation, Japan) using a T_1 -weighted 3D UTE (Ultra short Echo Time) MRI sequence. Detailed information about the imaging protocol are available in the [Supplementary Information](#) and in the paper from Crémillieux et al.³⁰

Signal enhancement was defined as:

$$\frac{SNR_{aerosol} - SNR_{baseline}}{SNR_{baseline}}$$

where $SNR_{aerosol}$ and $SNR_{baseline}$ correspond to the signal-to-noise ratio (SNR) measured after and before nebulisation of the tracer, respectively. Then, the T_1 value was used to estimate the concentration, C (mM), of Gd^{3+} ion in the lungs as follows:³⁷

$$C = \frac{1}{r_1} \left(\frac{1}{T_{1post}} - \frac{1}{T_{1pre}} \right)$$

where T_{1pre} and T_{1post} are the longitudinal relaxation times before and after nebulisation of the tracer and r_1 is the longitudinal relaxivity induced by gadolinium ion. The measurements of SNR values in the region of interest (ROI) and the generation of maximum intensity of projection (MIP) were performed using OsiriX (Geneva, Switzerland). The computing of T_1 values was realized using open-source SciLab software (ESI, Paris, France). Further information is provided in the [Supplementary Information](#).

Lastly, samples of lung parenchyma (two pieces of 1.5 g each per lobe for each tracer) were used to quantify gadolinium concentration using ICP-MS (NexIon 2000, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). Following sampling, the pieces were placed in a PTFE tube compatible with the microwave oven CEM Mars 5 in 10 mL of HNO_3 69%. After cooling, the samples were diluted in HNO_3 1% to reach a concentration of tissue of 1 g/L.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). For the aerosol size and output determination, a one-way ANOVA with Tukey's *post hoc* multiple comparison test was performed. For the quantitative assessment of regional radio-aerosol deposition in the *ex vivo* model, a two-way ANOVA with Sidak's *post hoc* multiple comparison test was used. For MRI quantitative assessment, multiple t-tests were used and p-values were adjusted with Holm-Sidak's method.

For all tests, significance was fixed at 5%. The data are presented as mean value \pm standard deviation (SD).

Results

Aerosol Features of the Tracers

Features of nebulised tracers are presented in Table 1. No statistical difference was observed for the MMAD of the aerosol or for the output, whatever tracer used. Indeed, the aerosols containing ^{99m}Tc -DTPA or SRP tracers ($3.40 \pm 0.15 \mu\text{m}$ vs. $3.60 \pm 0.05 \mu\text{m}$; $p=0.1373$) and the aerosols containing the molecular tracers NaF or ^{99m}Tc -DTPA ($3.65 \pm 0.10 \mu\text{m}$ vs. $3.40 \pm 0.15 \mu\text{m}$; $p=0.0668$) presented similar MMAD around $3.5 \mu\text{m}$.

Regional Aerosol Deposition Assessed by Gamma-Camera Imaging

The regional aerosol deposition of both molecular and nanoparticulate tracers were assessed by planar scintigraphies using gamma camera ($n=3$ for each tracer). Figure 1 shows planar scintigraphies obtained with ^{99m}Tc -DTPA and ^{111}In -SRP. As seen, there is no qualitative difference in term of aerosol deposition pattern, whatever the tracer used. Indeed, these scintigraphies show a highly homogeneous lung deposition of aerosol. Quantification of the deposited fractions within the ex vivo model was performed. Results are presented in Table 2 as proportion \pm standard deviation (SD) of the nominal dose of radioactivity (ie the initial activity injected in the nebuliser tank). According to the nebulised activity, for both tracers, there is no significant difference ($54 \pm 2\%$ vs $52 \pm 3\%$; $p=0.9285$). Besides, significant differences were noticed between the deposited fractions: a higher exhaled fraction, and a 2-fold lower ENT deposition ($14 \pm 3\%$ vs $22 \pm 1\%$; $p=0.0207$) and lung deposition ($9 \pm 3\%$ vs $21 \pm 6\%$; $p=0.0022$) is observed for the nanoparticulate tracer compared to the molecular tracer. However, despite this disparate dose of tracers reaching the ENT or lung regions, the regional aerosol deposition profile remains similar with approximately 50% of the deposited fraction in the lungs whatever the tracers (ENT region: $51 \pm 6\%$ for ^{99m}Tc -DTPA vs $62 \pm 12\%$ for ^{111}In -SRP; lung region: $49 \pm 6\%$ for ^{99m}Tc -DTPA vs $38 \pm 12\%$ for ^{111}In -SRP; $p=0.2426$).

Ex vivo Regional Deposition Assessed by MRI

Signal enhancement in the lung after nebulisation is presented in Figure 2. Here, the lungs received two consecutive nebulisation of 6 mL of SRP suspension for a cumulative amount of Gd^{3+} nebulised of 3.6 mmol (1.8 mmol of Gd^{3+} /nebulisation).

A large increase of the image signal intensity can be noticed from the two exemplary coronal images (excitation flip angle of 25°) acquired before and after the nebulisation of the nanoparticles. This signal intensity increase is consistent with the lowering of T_1 values due to the presence of gadolinium ion in the lungs. As seen from the image, this SE was homogenous in the lungs, including its most distal regions. Some anatomical information accessible following the nebulisation of the aerosol and the resulting increase in SNR and contrast are highlighted in this MRI image with a red arrow and a yellow arrow pointing, respectively, a lung fissure separating two lobes and the mosaic-like pattern of the secondary pulmonary lobules enclosed by the hypo-intense interlobular septum. In the absence of aerosol, these anatomical structures are not observable in the MRI images.

To preferentially visualize the airways, a 3D MIP was applied to a 3D acquisition, shown in Figure 3. Up to eight generations of airways are visible from the trachea to the bronchi of the secondary lobules with a diameter of a few millimetres, close to the ultimate spatial resolution of the image. As Figure 2, this image was obtained after two consecutive nebulisation of SRP suspension. Before nebulisation, this level of anatomical detail was not present on the MRI images.

Similar qualitative and quantitative results were observed when nebulizing in the lung an aerosol of gadoterate meglumine (Gd-DOTA) solution. For the same amount of nebulised gadolinium (ie 3.6 mmol), the signal enhancements obtained with an excitation flip angle of 25° were equal to 171% and 208% for the SRP and the Gd-DOTA, respectively.

The concentrations of Gd^{3+} ion, derived from the measured longitudinal relaxation times T_1 after nebulisation, were found equal to $1029 \pm 22 \mu\text{M}$ for SRP and $1957 \pm 179 \mu\text{M}$ for Gd-DOTA.

The amounts of gadolinium measured in the lung samples with ICP-MS were $40 \pm 9.1 \mu\text{g/g}$ and $78.6 \pm 10.5 \mu\text{g/g}$ for the SRP and Gd-DOTA, respectively. By approximating the tissue density at 1 kg/L, these quantities correspond to a Gd^{3+} concentration of 0.25 mM and 0.5 mM in the tissue samples following SRP and Gd-DOTA nebulisation, respectively.

Discussion

The regional aerosol deposition was recorded by planar scintigraphies for each radiotracer. The quantitative assessment of deposited fractions was conducted for each component of the ex vivo model. The results presented in Table 2 show that there was no significant difference in the nebulised

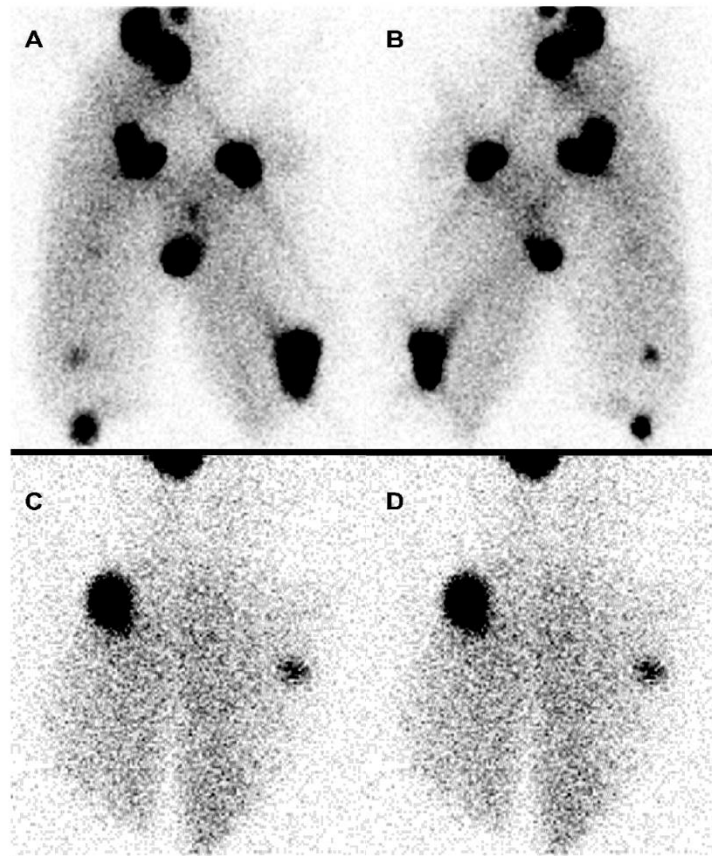


Figure 1 Planar scintigraphic images of regional aerosol deposition in the ex vivo model. (A, B) images obtained with ^{99m}Tc -DTPA molecular tracer, respectively anterior and posterior views. (C, D) images obtained with ^{111}In -SRP nanoparticulate tracer, respectively anterior and posterior views. Hotspots correspond to wounded and sutured region of the respiratory tracts.

activity of the aerosol, meaning that the nebulisation performances are not changed when a nanoparticulate suspension was used compared to a molecular tracer. These results are perfectly in accordance with the similar output rate observed in vitro for these two tracers (Table 1). However, the deposited fractions showed discrepancies. Significant differences were found between the two tracers, with 3-fold higher exhaled fraction and 2-fold lower ENT and respiratory tract fractions for the ^{111}In -SRP by comparing with ^{99m}Tc -DTPA. Nonetheless, the aerosol regional deposition profile remains similar (with approximately 50% of the radioaerosol deposited in the lung and the ENT region). Besides, as shown in Figure 1, despite the lower deposition of ^{111}In -SRP aerosol in

the respiratory tract, the amount of radioaerosol is sufficient to allow quantitative imaging. Moreover, the deposition pattern of ^{111}In -SRP is as homogeneous as the one obtained with the molecular tracer.

As easily seen, the scintigraphic images on Figure 1 present hotspots. These hyperfixations of the radioaerosol are due to the inevitable cuts present on the lungs. Despite being thoroughly sutured, these wounds of the lung parenchyma created regions with decreased resistances of the airflow and, thus, representing a preferred way for the airflow. However, this particular point does not represent an impairment to assess the homogeneity of the deposited aerosol as previously discussed.²⁶ Overall, these

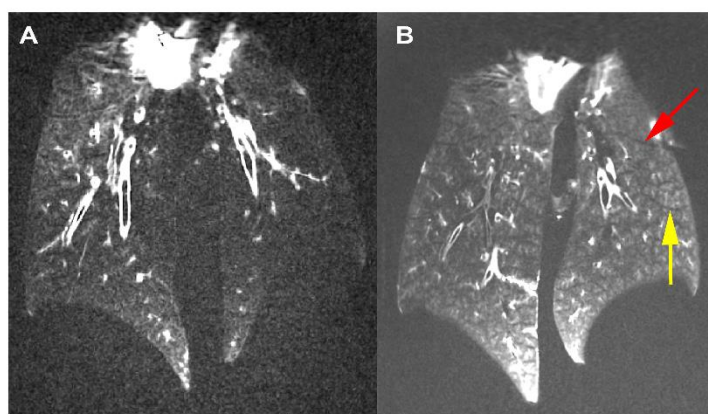


Figure 2 (A) Coronal slice extracted from a 3D dataset, obtained before nebulisation. (B) Coronal slice extracted from a 3D dataset obtained after nebulisation of 12 mL of nanoparticle suspension (3.6 mmol of Gd^{3+}) in both lungs. The red arrow is pointing a lung fissure separating two lobes and the yellow arrow is pointing the secondary pulmonary lobules (mosaic pattern) visible following the nebulisation of nanoparticles.

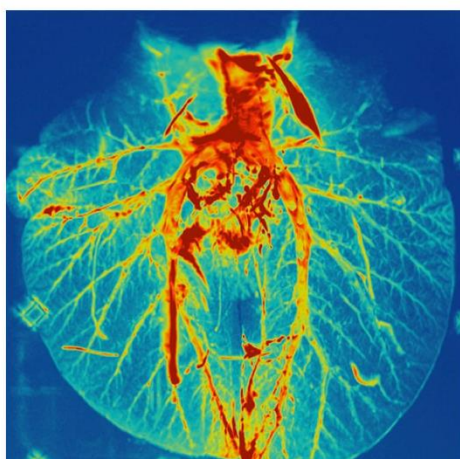


Figure 3 3D maximum intensity projection (MIP) image obtained after nebulisation of 12 mL of nanoparticles suspension (3.6 mmol of Gd^{3+}). Small bronchi, down to the 8th generation of the respiratory tract could be visualized.

experiments supported that it is feasible to use a conventional clinical nebuliser to aerosolise SRP suspension. Furthermore, the nebulisation performances are similar to a conventional molecular solution. Nevertheless, discrepancies were observed in the nebulisation process between the molecular and the nanoparticulate tracer. These discrepancies could be explained by the differences in the physicochemical properties of the nebulisation

media for the molecular and nanoparticulate tracers. Particularly, the modification of the composition, and thus, the viscosity could have a major impact on the behaviour of aerosolised droplets over time. Further experiments would be needed to thoroughly assess this point.

MR images obtained after nebulisation of SRP and Gd-DOTA aerosols showed a homogeneous and complete enhancement of the pulmonary parenchyma indicating that the aerosol penetrates deep into the lung to the level of bronchioles whose diameter is smaller than the dimension of the voxel (1 mm^3). For the same amount of nebulised gadolinium, a 2-fold higher concentration of Gd^{3+} ion is measured in the lungs for Gd-DOTA than SRP. This MRI-based result is coherent with ICP-MS: twice as much gadolinium for Gd-DOTA. These results are consistent with the scintigraphic measurements indicating that 21% of the radioactive dose was deposited in the lungs with ^{99m}Tc -DTPA as compared to 9% of the radioactive dose with the ^{111}In -SRP.

The difference observed between the Gd^{3+} concentration obtained using MRI (1 mM and 1.96 mM) and ICP-MS (0.25 mM and 0.5 mM) after nebulisation of SRP and Gd-DOTA could be explained by the intrinsic difference in the way each of these techniques measure gadolinium concentration. The ICP-MS measurement provides an average concentration in the tissue sample and does not contain information on the distribution of the gadolinium

Table 1 Aerosol Characteristics After Nebulization for the Nanoparticulate Tracer (SRP) and the Molecular Tracers (NaF and ^{99m}Tc-DTPA): Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) and Geometric Standard Deviation (GSD) Calculated Using DLPI Results. The Aerosol Output is Expressed as a Proportion of the Tracer Initially Introduced into the Nebulizer Tank. N/A: Not Available

Tracer	MMAD (µm)	GSD	Aerosol Output (%)
NaF	3.65 ± 0.10	2.55 ± 0.05	26.5 ± 3.0
^{99m} Tc-DTPA	3.40 ± 0.15	2.70 ± 0.05	N/A
SRP	3.60 ± 0.05	2.35 ± 0.10	29.3 ± 1.0

within the sample. Contrarily, the MRI measurement is sensitive to the heterogeneities in the distribution of gadolinium, even at a sub-pixel level. In the case of the lungs, the MRI signal intensity from Gd-free lung parenchyma regions is very weak, close to the noise level, and has little contribution to the overall MRI signal. As a result, the MRI signal originates mainly from regions where gadolinium is present and concentrated.

It is very likely that after deposition, the Gd-based nanoparticles and molecular contrast agents remain in the fluids that are lining the walls of the respiratory tract (from the bronchi down to the alveoli) and that there is no diffusion in the lung parenchyma. A simple calculation, considering standard pulmonary physiological parameters, allows to ensure the plausibility of this hypothesis. First, one can estimate the total lung capacity at 5 L, ie 2.5 L per lung. Assuming a lung tissue density of 0.35g/L, this is translated into a lung tissue volume of 1.35 L per lung.

Based on the ICP-MS measurements, that gives 0.338 mmol and 0.675 mmol of Gd³⁺ deposited in one lung for SRP and Gd-DOTA, respectively. These values represent 9% and 19% of the nominal dose of 3.6 mmol Gd³⁺ for SRP and Gd-DOTA, respectively, which are close to the values obtained with the gamma-camera imaging and therefore indicative of the relevance of the calculation.

The concentrations of Gd³⁺ ions obtained by MRI are four times higher than those obtained by ICP-MS. They can be understood as the consequence of the distribution of aerosols in one quarter only of the lung tissue volume. Taking up our previous calculation, this volume would equal to a lung tissue volume of 0.34 L. Assuming that this compartment corresponds to the lining fluid in the respiratory tract, spread over a total surface area of 70 m² per lung, one end up with a fluid thickness of 5 micrometres. Here again, this number is compatible with the non-physiological and ex vivo experimental conditions of the study and the probable presence of excess fluids in the airways.

In this study, two techniques were compared to precisely assess the regional deposition of aerosols in the respiratory tract. On the one hand, gamma-camera imaging is the gold standard method which allows a relatively easy assessment of the deposition pattern with an accurate semi-quantitative profile and potential metabolic following of the tracer. However, this method has some limitations, such as the spatial resolution and the follow-up of different radionuclides at the same time. Moreover, gamma-camera imaging exposes patients to ionizing radiation. Contrarily, the MRI is an upcoming technique with important recent improvements to image the lungs. This method has a very

Table 2 Deposited Fractions in Each Component of the ex vivo Respiratory Model. Data are Expressed as Mean ± Standard Deviation of the Nominal Dose of Radioactivity or of the Total Deposited Dose. Nebulized Activity Corresponds to the Proportion of Initial Radioactivity That Was Efficiently Nebulized

	Nebulized Activity in % of the Nominal Dose	Regional Aerosol Deposition Expressed in % of the Deposited Dose Within the Respiratory Tract (ENT and Lung Regions)		Regional Aerosol Deposition Expressed in % of the Nominal Dose Initially Introduced into the Nebulizer		
	Nebulized activity	ENT deposition	Lung deposition	Exhaled Fraction	ENT deposition	Lung deposition
^{99m} Tc-DTPA (molecular)	52 ± 3%	51 ± 6%	49 ± 6%	8 ± 3%	22 ± 1%	21 ± 6%
¹¹¹ In-SRP (nanoparticles)	54 ± 2%	62 ± 12%	38 ± 12%	26 ± 4%	14 ± 3%	9 ± 3%

Abbreviations: Exhaled, expiratory filter = one-way valve; Interface, mouthpiece + sealing plasticine; ENT, 3D-printed head replica; Respiratory tracts, porcine respiratory tract + pump filter.

International Journal of Nanomedicine downloaded from https://www.dovepress.com/ by 134.214.70.28 on 06-Oct-2020 For personal use only.

good spatial resolution and is completely unharmed for patients. However, the quantification of the deposition with MRI necessitates a contrast agent with known T_1 relaxivity in the experimental conditions. Moreover, as MRI is based on the detection of the water, imaging the lungs, which exert a reduced tissue density, remains a challenge.

To image the SRP deposition with MRI, Bianchi et al³⁸ used a dedicated lung MRI protocol in healthy mice. They assessed the MRI signal variations in the lungs following the intratracheal administration (IT). They showed that MRI acquisitions can be used to quantitatively monitor the biodistribution and the pharmacokinetics of the nanoparticles in the lungs of freely breathing animals. The implementation of pharmacokinetic models in lungs allowed them to identify the elimination pathways and the elimination time constants of the nanoparticles. Considering the favourable kinetics of these nanoparticles in the lungs (residence time in the order of 1 hour in the lung tissue) followed by an effective and complete renal clearance, several animal models of lung disease were then investigated. For instance, Tassali et al³⁹ investigated the application of lung MRI protocol combined with the intratracheal administration of the SRP in a bleomycin-induced fibrotic mouse model. The authors reported an MRI signal enhancement of 120% in fibrotic lesions as compared to 50% in healthy tissues and a two-fold increase of contrast-to-noise ratio between fibrotic and healthy tissue. They also assessed their clearance and observed that elimination time constant was 54% higher in fibrotic lesions. The authors concluded that this passive targeting of fibrotic lesions might help to monitor the efficacy of antifibrotic drugs and therapeutic molecules targeting this disease. Similarly, these theranostic nanoparticles can be delivered passively to lung tumours. Bianchi et al⁷ reported an original passive targeting of lung tumours in an orthotopic mouse model of lung cancer. Indeed, nanoparticles are retained in the tumour after administration through the airways but could translocate to blood circulation when deposited in healthy lungs. After the passage to blood circulation, they can also target tumours via Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect. The authors evaluated two administration routes for these nanoparticles, IV and IT administration and found that the IT route was more effective for targeting and detecting the lung tumour. Moreover, following intrapulmonary administration of these radio-sensitizing nano-assemblies, the animals were exposed to radiotherapy and a 45%-increase of the mean survival time was reported.⁴⁰

Despite these positive and promising preclinical results, the translation from small animals to humans of these diagnostic and therapeutic protocols using intrapulmonary administered nanoparticles remains challenging and requires further methodological validation steps on both the imaging and the delivery aspects. Indeed, there is an important gap between preclinical and clinical for pulmonary delivery of nanoparticles. One of the major pitfalls is the administration of the nanoparticles in the tracheobronchial tree. In small animal models, IT administrations are mainly performed by direct instillation through a specific needle placed in the trachea while the aerosolization is performed with a syringe containing a mixture of the nanoparticle suspension and air.^{11,38-40} However, this mode of administration was proved to generate an uneven pattern of deposition of the aerosol which could generate impairment to human transposition.⁴¹ Contrarily, inhalation of an aerosol generated by a nebuliser resulted in a homogeneous deposition and, thus, an easier extrapolation to human.⁴² This difference of deposition pattern between instillation and inhalation is well documented in nanotoxicology⁴³⁻⁴⁵ and was also found in mechanically ventilated patients.⁴⁶ Another major pitfall in animal-human transposition is the important difference in terms of the anatomy of the airways and the respiratory physiology between rodent models and human.⁴⁷⁻⁵⁰ This limitation could be partially overcome by using bigger animal such as pigs or non-human primates however ethical restrictions are much stronger in this case. Therefore, other models such as ex vivo respiratory models appear to be an interesting preclinical tool to assess aerosol deposition in healthy and pathological-like respiratory tracts.^{24,26} Composed a 3D-printed Ear-Nose-Throat (ENT) replica connected to a porcine respiratory tract (RT) in a sealed enclosure simulating passive ventilation, these models proved to be an innovative way to quantitatively assess aerosol deposition into the respiratory tract.^{30,51} Hence, it could be easier to assess aerosol deposition into the lungs and then to transpose it to human.

Considering the advantages and the limitations of each technique, it appears that MRI could be an interesting surrogate for gamma-camera imaging due to the absence of ionizing radiation and, thus, allowing multiplication of the acquisitions on the same patients. However, further improvements in the quantification technique based on MRI imaging need to be addressed. One of the major drawbacks being the need for important preliminary characterization of the contrast agent. Lastly, an interesting

way of research could be the development of co-assessment of aerosol deposition in the RT through the combination of gamma-camera imaging and MRI. Therefore, TEP-MRI technique could be a promising tool for such studies, especially as SRP – radiolabelled with ^{68}Ga – has shown interesting properties for PET/MRI.⁵²

Conclusion

Through this study, two main aims were hypothesized. First, the feasibility to aerosolize nanoparticles with a clinically used nebuliser with the same properties as a molecular tracer. This was proved to be validated by the measurement of the MMAD and the aerosol output, which were statistically equivalent. Second, we speculated that the two aerosols, molecular and nanoparticulate, would have similar regional deposition pattern on an ex vivo respiratory model. To confirm this point, we used a multimodal approach by using scintigraphy and MRI acquisition to qualitatively and quantitatively assess the deposited aerosol in the model. With both techniques, we observed a homogenous pattern of deposition with the SRP aerosol, pattern which is like the one obtained with a molecular tracer. The quantitative assessment of the deposition showed a 2-fold lower quantity of aerosol deposited into the respiratory tract with the SRP aerosol than the molecular tracer aerosol, for both imaging techniques. Thus, the consistency of the generated results seemed to validate our hypotheses.

Despite the limitations of the ex vivo model used to assess the regional deposition pattern of the aerosol, we proved that the aerosolization of a nanoparticulate suspension could be achieved with a clinical nebuliser. Therefore, we hope that these promising preclinical findings could facilitate the transfer of the aerosolized SRP to the clinic.

Acknowledgments

The authors are grateful to Canon Medical Systems for their technical and scientific support regarding MRI studies.

Funding

The aerosol size and output determination and the scintigraphic assessment of the regional aerosol deposition were funded by the French Agency for Research [ANR-17-CE19-0002-01]. The MRI studies were carried out within the IBIO (Institut de Bio-Imagerie de Bordeaux) and were achieved within the context of the Laboratory of

Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57. NH TherAGuIX[®] supported the cost of radionuclides for the radiolabelling of the AGuIX[®] nanoparticles with ^{111}In .

Disclosure

FL and OT must disclose the patent WO2011/135101. FL, OT and YC must disclose the patent WO2013153197. These patents protect the AGuIX[®] nanoparticles described in this publication and their administration via the airways. FL, OT and YC are employees from NH TherAGuIX[®] that is developing the AGuIX[®] Nanoparticles. FL and OT possess shares of this company. OT reports grants, personal fees from NH TherAguix, during the conduct of the study; In addition, OT has a patent WO200550302 licensed. FL reports grants, personal fees from NH TherAguix, during the conduct of the study and outside the submitted work. YC reports personal fees from NH TherAguix, outside the submitted work. The aforementioned authors report no other potential conflicts of interest in this work. The other authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Lux F, Tran VL, Thomas E, et al. AGuIX[®] from bench to bedside—Transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br J Radiol.* 2018;92(1093):20180365. doi:10.1259/bjr.20180365
- Verry C, Sancey L, Dufort S, et al. Treatment of multiple brain metastases using gadolinium nanoparticles and radiotherapy: NANO-RAD, a Phase I study protocol. *BMJ Open.* 2019;9(2):e023591. doi:10.1136/bmjopen-2018-023591
- Bort G, Lux F, Dufort S, Crémillieux Y, Verry C, Tillement O. EPR-mediated tumor targeting using ultrasmall-hybrid nanoparticles: from animal to human with theranostic AGuIX nanoparticles. *Theranostics.* 2020;10(3):1319-31.
- Sancey L, Lux F, Kotb S, et al. The use of theranostic gadolinium-based nanoprobes to improve radiotherapy efficacy. *Br J Radiol.* 2014;87(1041):20140134.
- Lux F, Mignot A, Mowat P, et al. Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew Chem Int Ed.* 2011;50(51):12299-303.
- Mignot A, Truillet C, Lux F, et al. A top-down synthesis route to ultrasmall multifunctional gd-based silica nanoparticles for theranostic applications. *Chem – Eur J.* 2013;19(19):6122-36.
- Bianchi A, Dufort S, Lux F, et al. Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulised multimodal contrast agents. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(25):9247-52.
- Kryza D, Taleb J, Janier M, et al. Biodistribution study of nanometric hybrid gadolinium oxide particles as a multimodal SPECT/MR/optical imaging and theragnostic agent. *Bioconj Chem.* 2011;22(6):1145-52.
- Miladi I, Duc GL, Kryza D, et al. Biodistribution of ultra small gadolinium-based nanoparticles as theranostic agent: application to brain tumors. *J Biomater Appl.* 2013;28(3):385-94.
- Miot-Noirault E, Vidal A, Morlieras J, et al. Small rigid platforms functionalization with quaternary ammonium: targeting extracellular matrix of chondrosarcoma. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med.* 2014;10(8):1887-95.

11. Bianchi A, Lux F, Tillement O, Crémillieux Y. Contrast enhanced lung MRI in mice using ultra-short echo time radial imaging and intratracheally administrated Gd-DOTA-based nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2013;70(5):1419-26. doi:10.1002/mrm.24580
12. Paranjpe M, Müller-Goymann CC. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review. *Int J Mol Sci*. 2014;15(4):5852-73.
13. Beck-Broichsitter M, Knuedeler M-C, Oesterheld N, Seeger W, Schmehl T. Boosting the aerodynamic properties of vibrating-mesh nebulised polymeric nanosuspensions. *Int J Pharm*. 2014;459(1-2):23-9. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.11.040
14. Beck-Broichsitter M, Kleimann P, Schmehl T, et al. Impact of lyoprotectants for the stabilization of biodegradable nanoparticles on the performance of air-jet, ultrasonic, and vibrating-mesh nebulisers. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2012;82(2):272-80.
15. Gaspar MM, Gobbo O, Ehrhardt C. Generation of liposome aerosols with the Aeroneb Pro and the AeroProbe nebulisers. *J Liposome Res*. 2010;20(1):55-61.
16. Bridges PA, Taylor KM. An investigation of some of the factors influencing the jet nebulisation of liposomes. *Int J Pharm*. 2000;204(1-2):69-79. doi:10.1016/S0378-5173(00)00477-4
17. Dailey LA, Schmehl T, Gessler T, et al. Nebulisation of biodegradable nanoparticles: impact of nebuliser technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2003;86(1):131-44.
18. Beck-Broichsitter M, Knuedeler M-C, Schmehl T, Seeger W. Following the concentration of polymeric nanoparticles during nebulisation. *Pharm Res*. 2013;30(1):16-24.
19. Elhissi AMA, Faizi M, Najji WF, Gill HS, Taylor KMG. Physical stability and aerosol properties of liposomes delivered using an air-jet nebuliser and a novel micropump device with large mesh apertures. *Int J Pharm*. 2007;334(1-2):62-70. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.022
20. Anton N, Jakhmola A, Vandamme TF. Trojan microparticles for drug delivery. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):1-25.
21. Tsapis N, Bennett D, Jackson B, Weitz DA, Edwards DA. Trojan particles: large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12001-5.
22. Mangal S, Gao W, Li T, Zhou QT. Pulmonary delivery of nanoparticle chemotherapy for the treatment of lung cancers: challenges and opportunities. *Acta Pharmacol Sin*. 2017;38(6):782-97.
23. Li X, Anton N, Ta TMC, Zhao M, Messaddeq N, Vandamme TF. Microencapsulation of nanoemulsions: novel Trojan particles for bioactive lipid molecule delivery. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1313-25.
24. Perinel S, Leclerc L, Prévôt N, et al. Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new ex vivo preclinical model. *Respir Res*. 2016;17(1). doi:10.1186/s12931-016-0395-7
25. Perinel S, Pourchez J, Leclerc L, et al. Development of an ex vivo human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Sci Rep*. 2017;7(1). doi:10.1038/srep43121
26. Montigaud Y, Perinel-Ragey S, Plantier L, et al. Development of an ex vivo preclinical respiratory model of idiopathic pulmonary fibrosis for aerosol regional studies. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-11.
27. Perinel S, Forest V, Landraud M, et al. Deposition pattern of aerosolized Legionella using an ex vivo human-porcine respiratory model. *Int J Hyg Environ Health*. 2018;221(2):252-9.
28. Ragey SP, Pourchez J, Leclerc L, et al. A human-like ex vivo preclinical model for aerosol deposition studies. *Eur Respir J*. 2015;46(suppl 59):PA3581.
29. West JB, West JB. *Pulmonary Pathophysiology: The Essentials*. 8th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2012:183.
30. Crémillieux Y, Montigaud Y, Bal C, et al. Three-dimensional quantitative MRI of aerosolized gadolinium-based nanoparticles and contrast agents in isolated ventilated porcine lungs. *Magn Reson Med*. 2020;83(5):1774-82.
31. Leclerc L, Pourchez J, Aubert G, et al. Impact of airborne particle size, acoustic airflow and breathing pattern on delivery of nebulised antibiotic into the maxillary sinuses using a realistic human nasal replica. *Pharm Res*. 2014;31(9):2335-43.
32. Leclerc L, Merhie AE, Navarro L, Prévôt N, Durand M, Pourchez J. Impact of acoustic airflow on intrasinus drug deposition: new insights into the vibrating mode and the optimal acoustic frequency to enhance the delivery of nebulised antibiotic. *Int J Pharm*. 2015;494(1):227-34.
33. El Merhie A, Navarro L, Delavenne X, Leclerc L, Pourchez J. A new strategy to improve drug delivery to the maxillary sinuses: the frequency sweep acoustic airflow. *Pharm Res*. 2016;33(5):1074-84.
34. Moghadam SJ, Navarro L, Leclerc L, Hodin S, Pourchez J. Toward smart Nebulisation: engineering acoustic airflow to penetrate maxillary sinuses in chronic rhinosinusitis. *Int J Pharm*. 2018;546(1):188-93.
35. Vecellio None L, Grimbert D, Bordenave J, et al. Residual gravimetric method to measure nebuliser output. *J Aerosol Med*. 2004;17(1):63-71.
36. Morlieras J, Chezal J-M, Miot-Noirault E, et al. In vivo evidence of the targeting of cartilaginous tissue by pyridinium functionalized nanoparticles. *Chem Commun*. 2013;49(29):3046-8.
37. Martin AR, Thompson RB, Finlay WH. MRI measurement of regional lung deposition in mice exposed nose-only to nebulised superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2008;21(4):335-42.
38. Bianchi A, Dufort S, Lux F, et al. Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultrashort TE MRI. *Magn Reson Mater Phys Biol Med*. 2014;27(4):303-16.
39. Tassali N, Bianchi A, Lux F, et al. MR imaging, targeting and characterization of pulmonary fibrosis using intra-tracheal administration of gadolinium-based nanoparticles. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016;11(5):396-404.
40. Dufort S, Bianchi A, Henry M, et al. Nebulised gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small*. 2015;11(2):215-21.
41. Yang L, Gradl R, Dierolf M, et al. Multimodal precision imaging of pulmonary nanoparticle delivery in mice: dynamics of application, spatial distribution, and dosimetry. *Small*. 2019;15(49):1904112.
42. Yang L, Feuchtinger A, Möller W, et al. Three-dimensional quantitative co-mapping of pulmonary morphology and nanoparticle distribution with cellular resolution in nondissected murine lungs. *ACS Nano*. 2019;13(2):1029-41.
43. Oberdörster G, Cox C, Gelein R. Intratracheal instillation versus intratracheal inhalation of tracer particles for measuring lung clearance function. *Exp Lung Res*. 1997;23(1):17-34.
44. Shinohara N, Nakazato T, Tamura M, et al. Clearance Kinetics of Fullerene C60 nanoparticles from rat lungs after intratracheal C60 instillation and inhalation C60 exposure. *Toxicol Sci*. 2010;118(2):564-73.
45. Landsiedel R, Sauer UG, Ma-Hock L, Schneckeburger J, Wiemann M. Pulmonary toxicity of nanomaterials: a critical comparison of published in vitro assays and in vivo inhalation or instillation studies. *Nanomed*. 2014;9(16):2557-85.
46. Klockare M, Dufva A, Danielsson A-M, et al. Comparison between direct humidification and nebulisation of the respiratory tract at mechanical ventilation: distribution of saline solution studied by gamma camera. *J Clin Nurs*. 2006;15(3):301-7.
47. Kuempel ED, Tran CL, Castranova V, Bailer AJ. Lung dosimetry and risk assessment of nanoparticles: evaluating and extending current models in rats and humans. *Inhal Toxicol*. 2006;18(10):717-24.
48. Sjaastad OV, Hove K, Sand O. Physiology of domestic animals. *Scan Vet Press*. 2010;808.
49. Reece WO. *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. John Wiley & Sons; 2015:760.

50. Parent RA. *Comparative Biology of the Normal Lung*. Academic Press; 2015:835.
51. Montigaud Y, Georges Q, Pourchez J, et al. Aerosol delivery during invasive mechanical ventilation: development of a preclinical ex vivo respiratory model for aerosol regional deposition. *Sci Rep*. 2019;9(1):17930.
52. Bouziotis P, Stellas D, Thomas E, et al. 68Ga-radiolabeled AGuIX nanoparticles as dual-modality imaging agents for PET/MRI-guided radiation therapy. *Nanomed*. 2017;12(13):1561-74.

International Journal of Nanomedicine downloaded from <https://www.dovepress.com/> by 134.214.70.28 on 06-Oct-2020
For personal use only.

International Journal of Nanomedicine

Dovepress

Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBase, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

3. Informations supplémentaires

1 ORIGINAL RESEARCH

2 Montigaud et al

3 **Nebulised gadolinium-based nanoparticles for a**
4 **multimodal approach: quantitative and qualitative lung**
5 **distribution using magnetic resonance and scintigraphy**
6 **imaging in isolated ventilated porcine lungs**

7 Yoann Montigaud¹

8 Jérémie Pourchez¹

9 Lara Leclerc¹

10 Olivier Tillement²

11 Anthony Clotagatide^{3,4}

12 Clémence Bal⁵

13 Noël Pinaud⁵

14 Nobuvasu Ichinose⁶

15 Bei Zhang⁷

16 Sophie Perinel^{3,4}

17 François Lux^{2,8}

18 Yannick Crémillieux⁵

19 Nathalie Prevot^{3,4}

20

21 ¹Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS,

22 Saint-Etienne France; ²Institut Matière Lumière, Université de Lyon, Villeurbanne, France;

23 ³INSERM U 1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France; ⁴CHU Saint-Etienne,

24 Saint-Etienne, France; ⁵Institut des Sciences Moléculaires, Université de Bordeaux, Bordeaux,

25 France; ⁶Canon Medical Systems Corporation, Otawara, Japan; ⁷Canon Medical Systems Europe,

26 Zoetermeer, Netherlands; ⁸Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France.

27

28 Correspondence: Jérémie Pourchez

29 École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne

30 158 cours Fauriel, CS 62362

31 42023 Saint-Etienne Cedex 2. FRANCE.

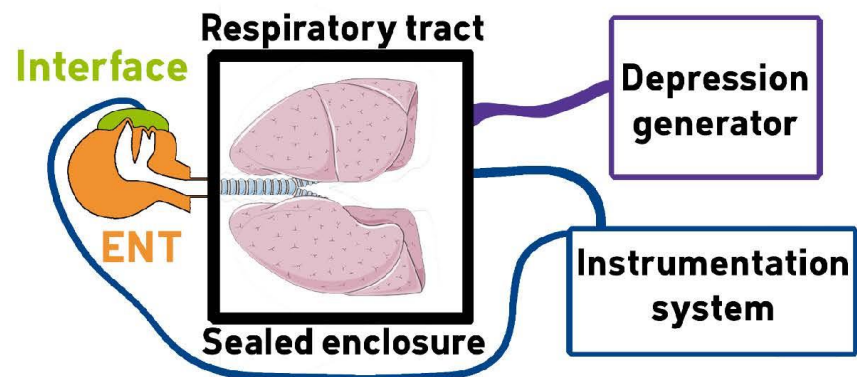
32 Tel +33 4 77 42 01 80

33 Email pourchez@emse.fr

34

35 **Material and methods**

36 *Ex vivo respiratory model for preclinical aerosol studies*



37

38 *Figure 1 - Schematic representation of the ex vivo model. ENT: Ear-Nose-Throat replica.*



39

40 *Figure 2 – Photographic image of the ex vivo model before the nebulization of SRP. 1: ENT. 2: Mouthpiece.*
 41 *3: Expiratory filter. 4: One-way valve for exhalation. 5: Nebuliser. 6: Compressor. 7: Sealed enclosure. 8:*
 42 *Porcine respiratory tract.*

43 The ex vivo respiratory model was composed of a replica of human upper airways connected to ex
 44 vivo porcine lungs. This original model was previously fully characterized and validated for
 45 preclinical regional aerosol studies^{1,2}. The ENT replica of an adult, including laryngeal structures,
 46 was reconstructed from CT scans of a healthy subject and made by 3D-printing technology. The
 47 scans were provided by the University Hospital of Saint-Etienne. Before radiological examination,
 48 patients received an explicit note informing them that their data could be used for research.
 49 Afterwards, a written and informed consent is given by patients. This use of patients' data was
 50 performed under supervision of the Ethic Committee of Saint-Etienne hospital. This ENT replica
 51 was assessed by endoscopy and CT scans and then validated by a senior radiologist. It was
 52 previously used for nasal and pulmonary assessment of aerosol deposition¹⁻⁵. Porcine respiratory
 53 tracts were kindly supplied by a slaughterhouse (DespiViandes, La Talaudière France) and passed
 54 all quality controls requested in French regulation. They were used within 24 hours or frozen at -20
 55 °C. Visual controls of wounds and sutures were achieved, and a bronchoscopy was performed to
 56 ensure the absence of significant obstruction of proximal bronchi. Lungs were placed in a sealed
 57 enclosure and ventilated using a depression generator (SuperDimension®, Covidien, Dusseldorf,

58 Germany). Mean depression inside the enclosure was -9 kPa (-92 cmH₂O). These relatively high
59 negative pressures were two time the expected values, according to West⁶. *Ex vivo* lungs were not
60 used during more than 8 hours. For all experiments, the model was set in supine position with
61 following breathing pattern: 15 cycles per min, with 1.33 s inspiratory time and 2.66 s expiratory
62 time leading to inspiratory/expiratory ratio of 1:2 inducing tidal volume about 500 mL and dynamic
63 compliance about 90 cmH₂O/mL as previously described^{3,7}.

64 ***Aerosol medical device***

65 A nebuliser is a drug delivery device used to administer medication in the form of an aerosol inhaled
66 into the lungs. The chosen medical device was a PARI LC SPRINT (PARI GmbH, Starnberg,
67 Germany) jet nebuliser, with a corresponding compressor PARI TurboBOY® SX (PARI GmbH,
68 Starnberg, Germany).

69 Unless otherwise specified, the reservoir of the nebuliser was always filled with 3 mL of
70 solution/suspension before experiments. Nebulisation was conducted until complete atomization of
71 the suspension.

72 ***Particle aerodynamic size distribution***

73 For all tracers (sodium fluoride [NaF], ^{99m}technetium diethylene triamine pentaacetic acid [^{99m}Tc-
74 DTPA] and AGulX®), the assessment of the mass median aerodynamic diameter (MMAD) was
75 performed in triplicate using a DLPI cascade impactor (Dekati Low Pressure Impactor). Operating
76 at an airflow of 10 L.min⁻¹, the DLPI allowed nebulised particles to be sorted into 12 aerodynamic
77 size groups (from 30 nm to 10 µm). The nebuliser was connected to the cascade impactor *via* a
78 metal United States Pharmacopeia (USP) like artificial throat (height 112 mm; width 42 mm; internal
79 diameter 19 mm).

80 The NaF was used as a molecular chemical tracer according to European standard procedure
81 focusing on aerosol medical devices (NF EN 13544-1). After the nebulisation process, the various
82 elements (USP throat and each stage of the DLPI) were rinsed with 5 mL of deionized water. The
83 NaF concentration of samples was assayed by electrochemical means (PerfectION™ combined

84 with a SevenGo pro™ F– electrode, Mettler Toledo, France). Finally, the MMAD and the geometric
85 standard deviation (GSD) of the nebulised particles were calculated⁸⁻¹¹.

86 ^{99m}Tc-DTPA was used as a molecular radiotracer. The deposited fraction on each DLPI stages was
87 collected on an in-house impermeable plastic cover. This cover was then removed and the amount
88 of ^{99m}Tc-DTPA quantified using Packard Cobra II auto-gamma counting system (Perkin-Elmer,
89 Waltham, MA, USA). Finally, the activity median aerodynamic diameter (AMAD) and the geometric
90 standard deviation (GSD) of the nebulised particles were calculated.

91 Finally, the AGuIX® were used as a nanotracer. The nebuliser was filled with 3 mL of AGuIX®
92 suspension (300 µmol of Gd/mL in deionized water corresponding to 900 µmol of AGuIX®, or
93 47 175 ppm of Gd, initially introduced into the nebuliser tank). After nebulisation, the deposited
94 fraction on each DLPI stages was collected using 1 mL of deionized water. The amount of Gd was
95 then quantified by ICP-MS (Nexlon 2000, PerkinElmer, Wellesley, MA). Preparation of samples for
96 ICP-MS, was performed by placing samples in a polytetrafluoroethylene tube compatible with the
97 microwave oven CEM Mars 5. A total of 10 mL of HNO₃ 69% were added, and after cooling down
98 the samples were diluted in HNO₃ 1% to obtain a sample concentration of 1 g/L. Finally, the MMAD
99 and the geometric standard deviation (GSD) of the nebulised particles were calculated.

100 ***Aerosol output rate***

101 The aerosol output delivered by the nebuliser (*i.e.* the emitted aerosol fraction) was assessed
102 according to the NF EN 13544-1 European standard using a residual gravimetric method^{8,12}. Briefly,
103 the nebuliser was activated with 3 mL of solution/suspension containing the studied tracers (NaF,
104 ^{99m}Tc-DTPA and AGuIX®), until atomization. The nebuliser is connected to 2 absolute electrostatic
105 filters: one inhalation filter which is connected to a respiratory pump (PARI Compas II, PARI GmbH,
106 500 mL tidal volume with sinusoidal pattern; 15 cycles/min; I/E of 1:1) and one expiratory filter with
107 a one-way valve. The mass of the emitted aerosol fraction was measured on the filter before and
108 after nebulisation. Results are given as proportion of the given tracer in the inhalable filter *versus*
109 the initial quantity of tracer introduced in the nebuliser.

110 ***Regional aerosol deposition assessed by gamma-camera***

111 ***imaging***

112 Nebulised radionuclides used for scintigraphy imaging were ^{99m}Tc-DTPA as molecular radiotracer
113 and ¹¹¹indium chloride (¹¹¹In) chelated on the AGulX® nanoparticles as a nanoparticulate
114 radiotracer. The nebulisation was performed with 100 MBq/3 mL of ^{99m}Tc-DTPA and 60 MBq/3 mL
115 of ¹¹¹In-AGulX® suspension. The chelation of ¹¹¹In on AGulX® was performed following the
116 protocol developed by Morlieras *et al.*¹³. The nanoparticles were suspended in milliQ water to reach
117 the concentration of 100 mg/mL, according to the manufacturer's recommendation. Then, 200 µL
118 of AGulX® suspension were placed in a scintillation vial with 400 µL of ¹¹¹In and citrate buffer (pH
119 5; 100mM) qs for 10 mL. The mixture was put under magnetic stirring at 50°C for 15 minutes. Then
120 purification was achieved with Vivacon® centrifuge filter 2kDA MWCO (Sartorius, Göttingen,
121 Germany) at 14,000 g for 15 minutes. The nebuliser was connected to the ENT by a mouthpiece,
122 sealing was conducted to avoid any loss of generated aerosol. To avoid exposure due to exhaled
123 aerosol, an expiratory filter was positioned after a one-way valve.

124 The gamma-camera imaging was realized as previously described^{1,3}. 2D scintigraphies were
125 conducted on 3 respiratory tracts for each radionuclide with a variable angle dual detector Single
126 Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT-CT, SYMBIA T2;
127 Siemens, Knoxville, TN). For the ¹¹¹In-AGulX nanoparticles, the gamma camera was equipped
128 with a medium-energy parallel-hole collimator with ¹¹¹In photopeaks (172 and 245 keV) set for 20%
129 windows is used to acquire planar imaging with the following parameters: 256x256 matrix, 180 s
130 acquisition time per image. FOV = 53.3 x 38.7 cm; pixel 2.4x 2.4 mm. Spatial resolution at 10cm :
131 12.5 mm. For the ^{99m}technetium-DTPA, the gamma camera was equipped with a low-energy, high-
132 resolution collimator (FWHM 8.3 mm at 10 cm); tested weekly for uniformity (UFOV 533 mm× 387
133 mm, CFOV 400 mm× 290 mm).

134 The inhalation experiments needed to assess the initial radioactive dose in the nebuliser, which
135 was calculated from the difference of activity between the full and empty syringe with 3-min
136 anterior/posterior scintigraphic images. After inhalation of the aerosol, each component of the

137 system was imaged with 3-min anterior/posterior exposition: nebuliser (with dead volume),
138 expiratory filter, ENT replica and respiratory tract. The count of each part was determined with
139 corrections for background radiation, radioactivity decay and tissue attenuation (correction factor
140 calculated for each component). Results were expressed in terms of the nominal dose of
141 radioactivity loaded in the nebuliser.

142 ***Regional aerosol deposition assessed by MRI***

143 MRI contrast agents used were gadoterate meglumine (Clariscan® Gé, GE Healthcare) as a
144 molecular tracer and AGuIX® nanoparticles as nanoparticulate (NP) tracer. The chosen
145 concentration of each tracer was 300 mM equivalent gadolinium.

146 For the MRI acquisitions, the protocol allowing the imaging of nebulised AGuIX® in isolated porcine
147 lungs was previously described⁷. The lungs within a specific non-magnetic sealed enclosure were
148 positioned inside a 3 Tesla whole body magnet (Vantage Galan 3T ZGO, Canon Medical Systems
149 Corporation, Japan). MR images were acquired using a T₁-weighted 3D UTE (Ultra short Echo
150 Time) MRI sequence with the following acquisition parameters: TR=3.7 ms, TE=96 µs, number of
151 radial trajectory=56064, 1 average, total acquisition time=3.5 min, FOV=50 cm, 1mm isotropic
152 resolution. Detailed information about the MR imaging protocol are available in the paper from
153 Crémillieux *et al.*⁷.

154 The signal enhancement (SE) was defined as:

$$155 \frac{SNR_{aerosol} - SNR_{baseline}}{SNR_{baseline}} \quad (1)$$

156 where SNR_{aerosol} and SNR_{baseline} correspond to the signal-to-noise ratio (SNR) measured
157 respectively in the nebulised lung and in the gadolinium-free lung. SNRs were measured in regions
158 of interest (ROI) avoiding visible airways with typical surface area of 20 cm². The UTE acquisitions
159 acquired at four different flip angles were used for computing the longitudinal relaxation time T₁⁷.
160 The T₁ value was then used to estimate the concentration, C (mM), of Gd³⁺ ion in the lungs as
161 follows:

162

163
$$C = \frac{1}{r_1} \left(\frac{1}{T_{1post}} - \frac{1}{T_{1pre}} \right) \quad (2)^{14}$$

164 where T_{1pre} and T_{1post} are the longitudinal relaxation times with and without nebulisation of Gd-
165 based aerosol and r_1 is the longitudinal relaxivity induced by the gadolinium ion and equal to 8.9
166 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ and $3.9 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ per Gd^{3+} ion at 3T and room temperature for AGuIX® nanoparticle and
167 gadoterate meglumine (DOTA), respectively. The measurements of SNR values in region of
168 interest (ROI) and the generation of maximum intensity of projection (MIP) were performed using
169 OsiriX (Geneva, Switzerland). The computing of T_1 values was realized using open-source SciLab
170 software (ESI, Paris, France).

171 Two pieces (1.5 g each) per lobe of two lungs nebulised with NP-aerosol and DOTA-aerosol were
172 sampled from the lung parenchyma and used for the quantification of gadolinium concentration
173 using ICP-MS (Nexlon 2000, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). Following harvesting, the pieces
174 were placed immediately in a PTFE tube compatible with the microwave oven CEM Mars 5. Ten
175 millimetres of HNO_3 69% were added, and after cooling down, the samples were diluted in HNO_3
176 1% in order to obtain a concentration of tissue of 1 g/L.

177 **Statistical analyses**

178 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego,
179 CA, USA). For the aerosol size and output determination, a one-way ANOVA with Tukey's *post-*
180 *hoc* multiple comparison test was performed. For the quantitative assessment of regional
181 radioaerosol deposition in the *ex vivo* model, a two-way ANOVA with Sidak's *post-hoc* multiple
182 comparison test was used. For MRI quantitative assessment, multiple t-tests were used with
183 statistical significance determined using the Holm-Sidak method.
184 For all tests, significance was fixed at a 5% probability level. The data are presented as mean value
185 \pm standard deviation (SD).

4. Conclusions et perspectives

Cette étude a validé la faisabilité de la nébulisation des AGuIX® par un nébuliseur pneumatique utilisé en clinique. Cependant, la régionalisation des dépôts d'aérosol de nanoparticule montre une fraction pulmonaire deux fois plus faible que les dépôts d'un aérosol composé des mêmes agents d'imagerie dans leur composante moléculaire.

Ainsi, l'aérosolisation des nanoparticules est réalisable à l'aide d'un nébuliseur commun. Toutefois, d'autres études précliniques sont nécessaires pour comprendre les phénomènes impliqués dans la modification de la fraction pulmonaire. En outre, des études avec un nébuliseur à tamis vibrant, dont l'efficacité de nébulisation est plus importante, peuvent être envisagées pour compenser la « perte » de la fraction pulmonaire.

Étude de la régionalisation des dépôts pulmonaires d'un aérosol émis par une cigarette électronique

1. Introduction

Depuis leur introduction sur le marché mondial, les cigarettes électroniques, aussi appelées e-cigarettes, sont au centre d'une polémique concernant leur impact à court et long termes sur la santé humaine.

Bien que leur apport en tant que dispositif de cessation de la consommation de tabac soit reconnu, la grande variabilité des données précliniques et cliniques recueillies ne permet pas de tirer de conclusions robustes et fiables.

Dans le but d'essayer d'outrepasser les limites inhérentes à l'étude préclinique de la cartographie des dépôts d'émissions de e-cigarette, cette étude s'est portée sur le radiomarquage d'un e-liquide par du ^{99m}Tc . Ensuite, la détermination du diamètre aérodynamique des émissions a été réalisée, afin de s'assurer de l'absence de modification des propriétés aérodynamiques de l'aérosol par le marquage. Enfin, l'étude de la régionalisation des dépôts d'aérosol dans le tractus respiratoire a été réalisée. Les données obtenues sont, à notre connaissance, les seules données précliniques expérimentales disponibles actuellement. En effet, de nombreuses études *in silico* ont été réalisées mais leurs conclusions sur la cartographie des dépôts sont disparates du fait de l'absence de consensus concernant les méthode de détermination du diamètre aérodynamique des aérosols émis par les e-cigarettes.

2. Article

Journal of Aerosol Science 151 (2021) 105633

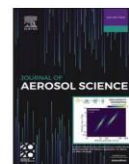


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Aerosol Science

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/jaerosci>



Aerosol regional deposition of electronic cigarette emissions using an original *ex vivo* respiratory model

Yoann Montigaud^a, Baptiste Manzotti^a, Sophie Chevrel^a, Lara Leclerc^a,
Gwendoline Sarry^a, Anthony Clotagatide^{b,c}, Jérémie Pourchez^{a,*},
Nathalie Prévôt^{b,c}

^a Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, Centre CIS, U 1059 Sainbiose, F 42023, Saint-Etienne, France

^b INSERM U 1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France

^c CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, F 42055, France

ARTICLE INFO

Keywords:

ex vivo model
e-cigarette
aerosol deposition
gamma-camera imaging

ABSTRACT

Aim: There is a need to bridge the data gap concerning the regional deposition of electronic nicotine delivery systems (ENDS) emissions in the airways. The present work aims to experimentally and precisely assess the aerosol regional deposition of ENDS emissions using an *ex vivo* model of lungs as a complementary approach to a deterministic computational model and as an alternative to animal or human *in vivo* experiments.

Methods: The refill liquid of a recent tank generation ENDS was radiolabelled with sodium pertechnetate. Particle size distributions of the emissions – in mass and in radioactivity – were determined using a cascade impaction technique. The aerosol regional deposition in the airways was both calculated with a deterministic computational model and experimentally assessed by gamma-camera imaging on a controlled breathing *ex vivo* model mimicking intrapleural depression thanks to generation of negative pressures in a sealed enclosure.

Results: The aerodynamic diameter of the ENDS emissions were $1.03 \pm 0.11 \mu\text{m}$ and $0.87 \pm 0.03 \mu\text{m}$ (mean \pm SD) in radioactivity and mass, respectively. The calculations led to a thoracic deposition of $92.89 \pm 0.03\%$ and $92.74 \pm 0.19\%$ in mass and radioactivity, respectively. The experimental data of thoracic deposition obtained by quantifying the deposited aerosol with planar scintigraphy of the *ex vivo* model were $91 \pm 4\%$.

Conclusions: The radiolabelling of the refill liquid did not affect the particle size distribution and allowed assessment of the aerosol regional deposition by two-dimensional gamma-camera imaging. When compared, no significant difference of the thoracic deposition between calculation and experimental data could be found. Moreover, data seemed to be in good accordance with previously published data. This work supports the conclusion that this preclinical respiratory model could be used to assess regional deposition of aerosol generated by an ENDS.

1. Introduction

Electronic nicotine delivery systems (ENDS) – also called electronic cigarettes or e-cigarettes – are a user-driven aerosol technology,

* Corresponding author.

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

<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2020.105633>

Received 4 May 2020; Received in revised form 3 August 2020; Accepted 3 August 2020

Available online 15 August 2020

0021-8502/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

which was first patented in early 2000's by Hon Lik (Grana et al., 2014). ENDS are a rapidly emerging and diversified product class (Williams and Talbot, 2019). Basically, ENDS are battery-powered personal vaporizers. The physical principle shared by all ENDS is an electrically powered heating element which vaporises a liquid solution. Thus, an aerosol is produced and available to be inhaled. The refill liquid of an ENDS contains humectants (i.e. glycerol and propylene glycol) and optional ingredients in small quantities (nicotine, water, ethanol, flavorings, etc.).

Claimed as a substitute for combustible cigarettes with a less harmful outcome, ENDS raised a controversy in the scientific and medical community. Indeed, despite containing less carcinogenic constituents than conventional cigarettes (Flora et al., 2016; Fuoco, Buonanno, Stabile, & Vigo, 2014; Palazzolo, 2013; Sood, Kesic, & Hernandez, 2018), health concerns are questioned due to the lack of robust clinical evidence about long-term outcomes and especially about potential risks associated with ENDS use (Caldwell, Sumner, & Crane, 2012; Flora et al., 2016; Fuoco et al., 2014; Kosmider et al., 2020; Olmedo et al., 2018; Palazzolo, 2013; Smith, Schneller, O'Connor, & Goniewicz, 2019; Visser et al., 2019). The vaping industry has seen a huge business increase during the last decade, representing billions of dollars worldwide and millions users (Palazzolo, 2013). This growing market is facing regulatory issues as regulators struggle to catch up with the fast development of new ENDS (Fuoco et al., 2014; Palazzolo, 2013; Williams & Talbot, 2019). Currently, most ENDS are regulated as general consumer products and not as medical devices. However, in some countries such as the United Kingdom, some ENDS are licensed as a medical product for smoking cessation – as a class IIa medical device – according to Directive 93/42/EC (MHRA, 2017; E-Voke 10 mg and 15 mg Electronic Inhaler, 2015).

Therefore, this area of research concentrated interests from the aerosol sciences community to bridge the data gap and reach a consensus concerning some scientific issues as the particle size distribution of ENDS emissions and the aerosol regional deposition (Fuoco et al., 2014; Palazzolo, 2013). Indeed, one of the main pitfalls of ENDS assessment is intrinsically related to the aerosol generated. This aerosol is composed of a dynamic mixture of gas and solvent droplets (Ingebrethsen, Cole, & Alderman, 2012; Kleinstreuer & Feng, 2013), mainly composed of a mixture of propylene glycol (PG) and vegetable glycerine (VG) acting as an airborne carrier for nicotine (Glasser et al., 2017; Thornburg, 2017). Thus, the experimental assessment of the particle size distribution of ENDS aerosol remains a challenge because of the high hygroscopicity and volatile nature of the particulate matter (Ingebrethsen et al., 2012; Manigrasso, Buonanno, Fuoco, Stabile, & Avino, 2015; Manigrasso, Buonanno, Stabile, Morawska, & Avino, 2015; Manigrasso, Buonanno, Fuoco, Stabile, & Avino, 2017; Mikheev, Brinkman, Granville, Gordon, & Clark, 2016; Oldham, Zhang, Rusyniak, Kane, & Gardner, 2018; Son et al., 2019; Sosnowski, Jabczyńska, Odziomek, Schlage, & Kuczaj, 2018; Sosnowski & Kramek-Romanowska, 2016; Sundahl, Berg, & Svensson, 2017). These obstacles seriously complicate the use of sizing techniques requiring a high degree of aerosol dilution, which are expected to induce a significant particle evaporation. This corresponds to a potential bias due to the alteration of the particle size distribution compared to the one provided to the user. Additionally, the dynamic behaviour of the ENDS aerosol is expected to occur after aerosol generation and after inhalation. Hence, particle size distribution and particle concentration are expected to evolve due to condensational growth, particulate matter evaporation, coagulation and particle deposition. Lastly, the assessment of the particle size distribution is also particularly tricky due to the number of existing ENDS devices and refill liquids, whose composition modifies of the aerodynamic features (Ooi, Dutta, Kazipeta, & Chong, 2019; Pourchez et al., 2018; Zervas, Litsiou, Konstantopoulos, Pouloupoulos, & Katsounou, 2018; Zhao et al., 2018).

Determining the aerodynamic size of ENDS emissions has a strong importance because these data are mandatory to run the existing semi-empirical and computational flow dynamic models estimating the aerosol regional deposition into the lungs (Kleinstreuer & Feng, 2013; Thornburg, 2017). Another entry needed for these models is the puffing regimen, which is also a controversial subject in research papers (Kleinstreuer & Feng, 2013; Son et al., 2019; Vansickel et al., 2018). Therefore, it remains difficult to use experimental aerodynamic data to calculate – using well-known computational models – a precise exposure dose and lung regional deposition profile to estimate with a high and robust confidence level the potential outcomes of ENDS use (Bertholon et al., 2013; Manigrasso, Buonanno, Fuoco, et al., 2015; Palazzolo, 2013; Son et al., 2019; Sosnowski & Kramek-Romanowska, 2016; Sundahl et al., 2017; Zhang, Sumner, & Chen, 2013).

As a complementary approach to semi-empirical and/or computational flow dynamics software, the aim of this work was to experimentally and precisely assess the aerosol regional deposition of ENDS emissions. Thus, an *ex vivo* respiratory model composed of an Ear-Nose-Throat (ENT) replica of healthy adult upper airways and a porcine respiratory tract, placed in a sealed enclosure, was used (Perinel et al., 2016, 2017). Passive ventilation was performed thanks to a depression generator, producing negative pressures in the enclosure. First, we needed to radiolabel the refill liquids with a radionuclide. This radiolabelling was validated by determining the aerodynamic size distribution of radiolabelled aerosols generated by a recent tank generation ENDS. Then, we assessed the aerosol regional deposition on the *ex vivo* model by gamma-camera imaging. The reliability of the obtained data was evaluated by comparison with the literature and by running the multiple path particle dosimetry (MPPD) model.

2. Material and methods

2.1. Materials

As previously described (Pourchez et al., 2018), the high-power ENDS used for this study was composed of a lithium-ion battery iStick TC40W (2600 mAh, Eleaf, Shenzhen, China), a GS Air 2 atomiser (Eleaf, Shenzhen, China) and a GS Air pure cotton head wick (0.75 Ω , kanthal heating wire, Eleaf, Shenzhen, China). All components were purchased in a local specialised store. For all experiments, the atomiser was filled with at least 2 g of refill liquid (approximately 2 mL), the power of the ENDS was set at 10 W and the airflow ring was removed to prevent any “dry hit” (i.e. user puffing without sufficient amount of refill liquid in the wick, leading to overheat and potential damages/degradations).

The refill liquid was prepared from 100-PG base and 100-VG base (Arômes et Liquides, Andrézieux-Bouthéon, France). Both bases were purchased from a local supplier as commercial grade to be as close as possible to real-life use. The surfactant Tween® 80 was purchased from Sigma-Aldrich (CAS 9005-65-6, Saint-Louis, MO, USA). Needed radioactivity of sodium pertechnetate (^{99m}Tc) was taken off from a Tekcis® generator (Curium, Paris, France) located in the Nuclear Medicine department of the Saint-Etienne hospital. Absolute ethanol (EtOH) was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

2.2. Radiolabelling of ENDS refill liquid

The refill liquid was prepared from bulk components in the following mass proportions: 74% PG, 14% VG, 5% ^{99m}Tc , 4% Tween® 80 and 3% EtOH.

Bulk components were weighed with precision scales (Adventurer Pro, OHAUS, Parsippany, USA) and homogenised thanks to a stirring plate and magnetic bar in a 20 mL scintillation vial. First, PG, VG, Tween® 80 and EtOH were homogenised and kept under constant stirring. Then, ^{99m}Tc was added in the radiopharmacy laboratory in the Nuclear Medicine department of the Saint-Etienne University Hospital. The mixture was stirred for at least 10 min. Just before experiments, at least 2 g of radiolabelled refill liquid were placed in the reservoir of the atomiser.

2.3. Puffing regimen

An in-house interface was previously developed to reproducibly introduce a puff that was well-controlled for duration and volume (Bertrand et al., 2018; Pourchez et al., 2017; Prévôt et al., 2017). The puffing regimen – called AFNOR regimen – was as follows: 55-mL puff volume, 4 s puff duration, 30-s inter-puff interval, 25 puffs per series, 300-s inter-series interval as described in the AFNOR standard XP D90-300-1.

3. Particle size determination

The methodology was previously described and validated (Bertrand et al., 2018; Pourchez et al., 2018, 2017; Prévôt et al., 2017). The assessment of the aerodynamic size distribution was performed in triplicate using a DLPI cascade impactor (Dekati Low Pressure Impactor, Dekati Ltd., Kangasala, Finland) operating at an airflow of 10 L/min. The DLPI allowed aerosolised particles to be sorted into 12 aerodynamic size groups (from 30 nm to 10 μm).

The aerosol generated by the e-cigarette was sampled and transferred to the DLPI through a metal United States Pharmacopeia (USP) like artificial throat (height 112 mm; width 42 mm; internal diameter 19 mm) with a previously described in-house interface (Pourchez et al., 2017, 2018). The deposited fraction on each DLPI stage was collected on an impermeable plastic cover. This cover was then removed and the amount of ^{99m}Tc quantified using Packard Cobra II auto-gamma counting system (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Finally, the activity median aerodynamic diameter (AMAD) and the geometric standard deviation (GSD) of the aerosolised particles were calculated, according to European Pharmacopeia 2.9.18. GSD is determined by the ratio of the provisional size at the 84th percentile of the distribution to the provisional size at the 16th percentile. Between each puff, the DLPI was turned off to reduce potential evaporation of the collected particles. The mass median aerodynamic diameter (MMAD) and the subsequent GSD were determined by gravimetric measurement of each stage. For these experiments, 25 puffs with AFNOR regimen were performed.

3.1. Calculation of aerosol deposition using computational model

Estimation of the deposition of ENDS emissions in the human airways was carried out using the Multiple Path Particle Dosimetry software (MPPD v3.04, ARA, Arlington, VA, USA). Introduced parameters were obtained from the work of Son et al. (Son et al., 2019). Some parameters such as puff volume, aerosol density, AMAD/MMAD and GSD were obtained from data generated in the present study.

We used the Yeh & Schum symmetric airway morphometry with a functional residual capacity of 3300 mL and upper respiratory tract volume of 50 mL. The density of the aerosol was set at 1.07086 g/mL, while the MMAD and GSD was obtained from experimental data. Shape factor was set at 1. We used constant exposure scenario, allowing the supine position inhalation. Aerosol concentration was set at 36181 g/m³ according to experimental data of cascade impaction. Breathing frequency was set at 15 cycle/min with 500 mL of tidal volume and an inspiratory fraction of 0.33 with oral breathing, according to the experimental settings.

3.2. Experimental assessment of regional aerosol deposition using an ex vivo respiratory model

To assess the regional deposition of the aerosol generated with an ENDS, the refill liquid was labelled with 400 MBq of sodium pertechnetate. To assure enough deposition and, thus, a quantitative assessment of the deposited dose, 100 puffs were sampled – according to the puffing regimen described above – to be inhaled by the *ex vivo* respiratory model. To ensure inhalation of ENDS emissions, each puff was manually synchronized with a deep inspiration over 4s. The human-like model is composed of a 3D-printed Ear-Nose-Throat (ENT) replica (female subject, 27 years old) connected to a sealed enclosure. The ENT presents a naso-buccal breathing but for the purposes of this study, nasal orifices were occluded to ensure strict oral breathing. Within this enclosure, an *ex vivo* porcine respiratory tract is passively ventilated thanks to a SuperDimension® depression generator (Covidien, Dusseldorf, Germany), which applied negative pressure in the enclosure (mean depression -9 kPa). Respiratory parameters were previously

described (Crémillieux et al., 2020; Montigaud, Perinel-Ragey et al., 2019): 15 cycles per min, with 1.33 s inspiratory time and 2.67 s expiratory time leading to inspiratory/expiratory ratio of 1:2 inducing tidal volume about 500 mL and dynamic compliance about 90 cmH₂O/mL. All experiments with the *ex vivo* model were performed at isothermal laboratory temperature.

Detailed collection, preparation and storage protocols were extensively described in previously work of our group (Montigaud, Georges, et al., 2019; Perinel et al., 2016, 2017). Briefly, all respiratory tracts, collected from a local slaughterhouse, passed all quality controls according to French regulation. At slaughtering time, swine were 6 months old, with 44% of female and 56% of male from three different species: large white, pietrain and landrace (with mainly large white). After removal of viscera, carcasses weighted 90 to 93 kg. Visual controls of wounds and sutures were achieved, and a bronchoscopy was performed to ensure the absence of significant obstruction of proximal bronchi.

The gamma-camera imaging was performed as previously described (Montigaud, Perinel-Ragey et al., 2019; Perinel et al., 2016). Briefly, two-dimension scintigraphies were conducted on 3 respiratory tracts with a variable angle dual detector Single Photon Emission Computed Tomography/Computed Tomography (SPECT-CT, SYMBIA T2; Siemens, Knoxville, TN, USA). After inhalation of the aerosol, each component of the system was imaged with 3-min anterior/posterior exposition: e-cigarette, expiratory filter, ENT replica and respiratory tract. The count of each part was determined with corrections for background radiation, radioactivity decay and tissue attenuation (correction factor calculated for each component). Results were expressed in terms of the total deposited dose of radioactivity in the respiratory tract and the ENT or as proportion of inhaled dose, which corresponds to the sum of deposited aerosol in the ENT, the respiratory tract and the exhaled filter. The central-to-peripheral ratio (C/P ratio) and its inverse, the penetration index (PI), were calculated as previously described (Montigaud, Georges, et al., 2019; Newman et al., 2012).

3.3. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 8 software. For the aerodynamic size distribution, a non-parametric Kolmogorov-Smirnov test was used. For the comparison of the regional deposition experimentally obtained and estimated with the MPPD software, a two-way ANOVA was used with a Tukey's multiple comparison *post-hoc* test.

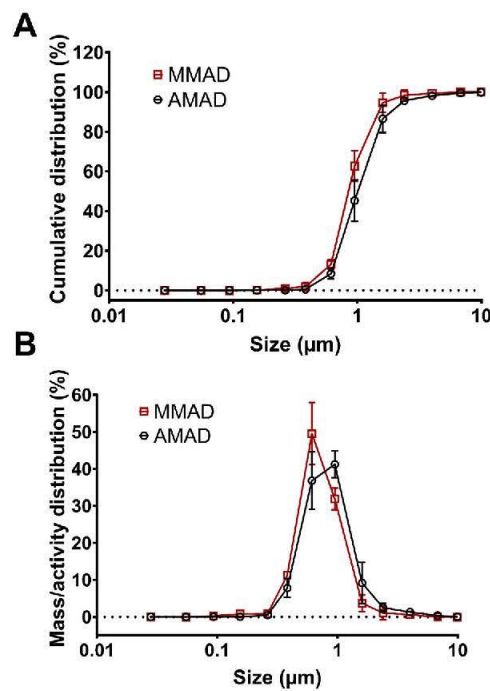


Fig. 1. A: cumulative frequency of mass or radioactivity distribution ($n = 3$). B: frequency of mass or radioactivity distribution. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of the total deposited fraction in the apparatus ($n = 3$). MMAD: Mass Median Aerodynamic Diameter. AMAD: Activity Median Aerodynamic Diameter.

4. Results

4.1. Particle size distribution

The aerodynamic size distribution was used to determine the MMAD and the AMAD of the ENDS emissions. Fig. 1 presents the distribution of the radiolabelled droplets thanks to a DLPI cascade impactor. As easily seen, there is a strong recovery of the 2 curves. Table 1 presents the obtained AMAD and MMAD, with respective GSD. No significant difference between the two curves was observed ($p = 0.5696$).

4.2. Aerosol regional deposition using an ex vivo respiratory model

The regional aerosol deposition was assessed with our innovative ex vivo respiratory model. One hundred puffs were used with the AFNOR regimen. Fig. 2 presents the images obtained with planar scintigraphies. A homogenous deposition could be observed in the respiratory tract, as also shown by Table S1. It is important to note that the hot-spots in Fig. 2 correspond to cuts in the respiratory tract due to the sacrifice of the animal at the slaughterhouse. Therefore, it collected more aerosol due to the decreased resistance in these areas. This point corresponds to an intrinsic artefact of the respiratory model that was extensively acknowledged in previously published works but does not significantly modify the overall aerosol regional deposition within the model (Montigaud, Georges, et al., 2019; Montigaud, Périnel-Ragey et al., 2019; Perinel et al., 2016, 2017).

When expressed as a percentage of the total aerosol deposited dose in the respiratory tract, the fraction in the lungs represents about 90% of the deposited dose, while the ENT collected 10% of the deposited dose (Table 2). The C/P ratio of the ex vivo model was 0.75 of the deposited dose in the respiratory tract.

When expressed as a proportion of total inhaled dose (Table 3), the deposition pattern remained similar: most of the aerosol found in the lungs ($84\% \pm 8$), while the rest of the aerosol is partitioned between exhaled fraction ($7\% \pm 6$) and deposited fraction in the interface and upper airways ($8\% \pm 3$).

4.3. Estimation of aerosol deposition using computational model

The estimation of the deposited doses in the respiratory tract was performed with the MPPD implemented with the AFNOR puffing regimen and the AMAD or the MMAD of the emitted aerosol. The other parameters were taken from a published paper (Son et al., 2019). Fig. 3 presents the different deposited fractions of the aerosol along the airways up to the pulmonary region. As presented, over 70% of the aerosol is exhaled, while the remaining aerosols are partitioned between the head, the tracheobronchial tree and the pulmonary region. Fig. 3 presents the comparison of experimental and estimated data. We only considered the deposited doses in the ex vivo model in this comparison. No significant difference could be found between the estimated deposition obtained with AMAD and MMAD as entries, as well as for our experimental data ($p > 0.9999$; Table 2 and Fig. 3). Penetration of the aerosol was assessed by the determination of the C/P ratio, which were 0.7495 ± 0.0203 and 0.6942 ± 0.0365 for the estimation based on the MMAD and the AMAD, respectively, as expressed as a proportion of the total deposited dose in the respiratory tract (Table 3).

When the deposition pattern is expressed as proportion of the inhaled dose, as presented in Table 3, we could see that the exhaled fraction is over 80% ($85.24\% \pm 0.72$ and $82.86\% \pm 1.79$ for the estimation based on the MMAD and the AMAD, respectively). Lung deposition is about 15% ($13.71\% \pm 0.67$ and $15.90\% \pm 1.64$ for the estimation based on the MMAD and the AMAD, respectively). The upper airway deposition is about 1% ($1.05\% \pm 0.06$ and $1.25\% \pm 0.15$ for the estimation based on the MMAD and the AMAD, respectively).

5. Discussion

5.1. Particle size distribution

To our knowledge, only one study was conducted on radiolabelled aerosol emitted with an ENDS (Holbrook, Zeman, Burke, Jaspers, & Bennett, 2018). In this work, the aerosol is radiolabelled by a complex process with technetium solid particles incorporated in the ENDS emissions. Despite being an ingenious way to radiolabel the aerosol, this method seems not to be suitable for extensive studies. The method presented in this work seems to be easier as it only needs to introduce a radionuclide – pertechnetate ions ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) – in the refill liquid. With a MMAD of $0.87 \pm 0.03 \mu\text{m}$ and an AMAD of $1.03 \pm 0.11 \mu\text{m}$, we considered that the two aerodynamic sizes are equivalent. This assumption is supported by the absence of significant difference of the distributions obtained

Table 1
Aerodynamic size assessment of aerosols emitted with an ENDS. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of a triplicate. MMAD: Mass Median Aerodynamic Diameter. AMAD: Activity Median Aerodynamic Diameter.

	MMAD	AMAD
Size (μm)	0.87 ± 0.03	1.03 ± 0.11
GSD	1.47 ± 0.05	1.53 ± 0.05

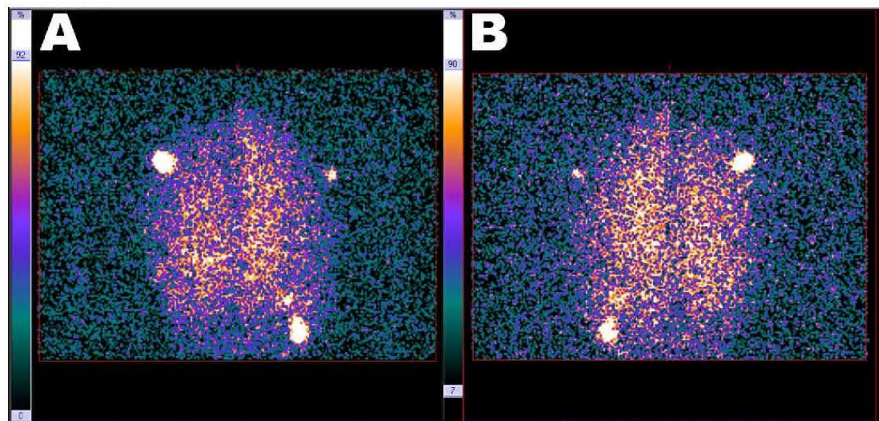


Fig. 2. Planar scintigraphies of a respiratory tract after inhalation of 100 radiolabelled puffs ENDS emissions. A: anterior acquisition. B: posterior acquisition. Hot spots correspond to cuts in the respiratory tract and, therefore, collected more aerosol due to the decreased resistance in these areas.

Table 2

Regional aerosol deposition expressed as mean \pm standard deviation (SD) of the percentage of total deposited aerosol for computational model with AMAD and MMAD as inputs or for experimental results presented in this study. Extra-thoracic: ENT replica + mouth interface equivalent to head deposition in the deterministic computational model. Thoracic: respiratory tract equivalent to the sum of tracheobronchial and peripheral deposition in the deterministic computational model.

	MPPD estimation from MMAD	MPPD estimation from AMAD	Experimental results (n = 3)
Extra-thoracic deposition	7.11% \pm 0.03	7.26% \pm 0.19	9% \pm 4
Thoracic deposition	92.89% \pm 0.03	92.74% \pm 0.19	91% \pm 4

Table 3

Homogeneity and penetration of the aerosol deposition expressed as mean \pm standard deviation (SD) of the percentage of total inhaled aerosol for computational model with AMAD and MMAD as inputs or for experimental results presented in this study. Interface: in-house mouth interface. ENT: human head replica. Lungs: tracheobronchial + pulmonary deposition. Exhaled: fraction collected on the respiratory filter or as the complementary to one of the deposited fractions. C/P: central-to-peripheral ratio. PI: penetration index.

	Deposited fraction of the aerosol expressed as proportion of the inhaled dose (%)			Regionalisation of the deposition/penetration of the aerosol in the respiratory tract		
	Interface + ENT	Exhaled	Lungs	C/P ratio	PI	Left/right ratio
Experimental data	8 \pm 3	7 \pm 6	84 \pm 8	0.75 (n = 1)	1.33 (n = 1)	1.00 (n = 1)
Estimation from MMAD	1.05 \pm 0.06	85.24 \pm 0.72	13.71 \pm 0.67	0.7495 \pm 0.0203 (n = 3)	1.3348 \pm 0.0366 (n = 3)	N/A
Estimation from AMAD	1.25 \pm 0.15	82.86 \pm 1.79	15.90 \pm 1.64	0.6942 \pm 0.0365 (n = 3)	1.4432 \pm 0.0759 (n = 3)	N/A

with a cascade impactor ($p = 0.5696$). Therefore, one could assume that the radiolabelling was efficient and does not modify the airborne properties of the ENDS emissions. These aerodynamic sizes are coherent with data found in literature, when cascade impactors were used (Holbrook et al., 2018; Mulder et al., 2019; Oldham et al., 2018; Pourchez et al., 2018; Sundahl et al., 2017; Zhao et al., 2018).

While the presented data are coherent with literature for cascade impactor measurements, they fall in the wide controversy concerning the aerodynamic size determination and concerning the lack standardized methods for this assessment (Ingebrethsen et al., 2012). Indeed, when particle count and light scattering methods are used, the aerodynamic size distribution appeared to be bimodal with a mode composed of small nanoparticles between 10 and 100 nm and another of submicronic particles with a size 2-fold lower than the MMAD and AMAD found in this study (Nordlund et al., 2017; Pratte, Cosandey, & Goujon-Ginglinger, 2016; Son et al., 2019). However, due to the high concentration of droplets in the aerosol, these methods required to dilute the aerosol and, thus, it is acknowledged that this particular point is a bias leading to an underestimation of the size of the droplets (Bertholon et al., 2013; Ingebrethsen et al., 2012). This is due to a dynamic evaporation process induced by the volatile and semi-volatile components of the refill liquids (Caldwell et al., 2012; Glasser et al., 2017; Sosnowski & Odziomek, 2018).

Lastly, it is important to be noted that there is an important variability of ENDS technical features and refill liquids. The main point of variation of the ENDS is due to the power generated by the battery and the coil, while the composition of the refill liquids would

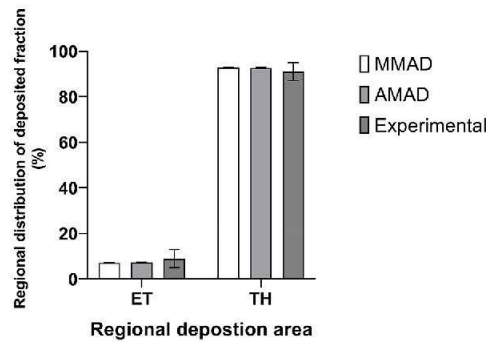


Fig. 3. MPPD estimation with MMAD or AMAD as input and experimental results of the deposition of emission of the chosen ENDS. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD) of the percentage of total deposited aerosol. ET: extra-thoracic region (head and mouthpiece). TH: thoracic region (tracheobronchial tree + peripheral lungs). MMAD: Mass Median Aerodynamic Diameter. AMAD: Activity Median Aerodynamic Diameter.

influence the dynamic behaviour of the e-cigarette aerosols (Floyd, Queimado, Wang, Regens, & Johnson, 2018; Mulder et al., 2019; Olmedo et al., 2018; Ooi et al., 2019).

5.2. Aerosol regional deposition of ENDS emissions: modelling vs. experimental

In this study, about 90% of the deposited dose was found to the thoracic regions (Table 2). Moreover, our estimation based on the experimentally determined AMAD and MMAD led to similar modelled results, which were not significantly different from the experimental data generated with the *ex vivo* model. This findings seems to be coherent with some modelled data of the literature, where e-cigarette and conventional cigarette aerosol deposition are estimated to deposit up to 90% in the thoracic region (Son et al., 2019; Sundahl et al., 2017). However, these findings seem to be similar when only expressed as proportion of the total deposited dose. Moreover, comparison should be done cautiously, as the breathing pattern and the airway morphometry used to estimate the values could be different, which would generate comparison biases.

Indeed, when the results are expressed as a proportion of the total inhaled dose (*i.e.* the sum of the radioactivity found in the respiratory tract, the upper airways and in the exhaled filters). In this case the experimental data did not match with estimated values obtained with the MPPD or the literature, where 70 to 90 % of the aerosol is found to be exhaled (Son et al., 2019; Sundahl et al., 2017). In the present study, only 7% is found in the exhaled filter for experimental data, while over 80% of the aerosol is exhaled according to the MPPD. (Table 3). These discrepancies between the experimental and estimated values seem to be problematic because it is hard to determine, which model is similar to reality. However, while most of the estimation are agreeing on a high exhaled fraction, the study from St. Helen et al. showed interesting "deposition data" on healthy volunteers. In their study, the retained dose of PG, VG and nicotine as well as the exhaled dose of the same components were assessed. They found that the retained dose, equivalent to the deposited dose, of the aerosol was about $93.8 \pm 14.4\%$ for the nicotine, $84.4 \pm 26.4\%$ for the VG and $91.7 \pm 15.9\%$ for the PG (St. Helen, Havel, Dempsey, Jacob, & Benowitz, 2016). Interestingly, these real-life data are in opposition with estimated data while they appeared to be similar to the present experimental values. One could think that determinist computational model are not accurate enough, due to some biases in the model itself.

However, further studies are needed to validate both the estimation by a determinist computational model, such as the MPPD, and expedata obtained, such as St. Helen et al. or the present study, and to reconcile computational and experimental data. Particularly, hygroscopic growth and condensation phenomena, as well as vapour-gas equilibrium and deposition mechanisms involved (James F. Pankow, 2001; James F. Pankow, Tavakoli, Luo, & Isabelle, 2003), should be better understood to predict the outcomes of the exposure to an aerosol emitted by ENDS.

It is interesting to note that, even if the regionalisation of the deposition is not accurate between experimental data, when expressed as proportion of the inhaled dose, the penetration of the aerosol tend to be similar. Indeed, for the *ex vivo* model the C/P ratio was 0.75, while it was between 0.70 and 0.75 for the estimation with the MPPD.

Therefore, despite being questionable to assess the exhaled dose, the *ex vivo* respiratory model appeared to be a potential tool of interest to assess regional deposition and the penetration of aerosol emitted with an ENDS. Moreover, this model already proved to be an interesting surrogate preclinical model to animal experiments by respecting the 3Rs concept and therefore being ethically less restricted (National Center for Replacement, Reduction and Refinement of Animal Research, 2018; Perinel et al., 2016, 2017). Despite the improvements that could be added to the model, such as an automated aerosol sample or the vertical position of the respiratory tract. Indeed, the supine position of the *ex vivo* model is a known limit of the model that could lead to overestimate the deposited fraction in the respiratory tract. However, we hope that this new tool would be a new step to assess the deposition of e-cigarette aerosols and to help to produce strong and reliable scientific evidence concerning the outcomes of ENDS.

6. Conclusion

Through this study, we aimed to assess the regional deposition of an aerosol generated with a high-power ENDS. First, we had to radiolabel the refill liquid with pertechnetate sodium solution, which was achieved thanks to the use of a commonly used surfactant. To validate this point, we studied the recovery of the MMAD and the AMAD using a DLPI cascade impactor. No significant difference could be found between these two aerodynamic distributions. Then, we assessed the regional aerosol deposition with a preclinical *ex vivo* respiratory model. Pulmonary deposition ($91 \pm 4\%$) was coherent with data described in literature using semi-empirical/computational fluid dynamics software (Sundahl et al., 2017; Zhang et al., 2013). Lastly, we compared the estimated deposition available in published data with our experimental data and with estimated values obtained by running the MPPD software, which appeared to be in the same range of commonly acknowledged values (Manigrasso, Buonanno, Fuoco, et al., 2015; Manigrasso, Buonanno, Stabile, et al., 2015; Son et al., 2019; Sosnowski & Kramek-Romanowska, 2016; Sundahl et al., 2017; Zhang et al., 2013). Therefore, we supported that this preclinical model could be used to assess regional deposition of aerosol generated with an ENDS. We hope that this work will allow the generation of strong evidences to fill the data gap concerning the outcomes of ENDS.

Funding source

This work was funded by a grant from the French National Agency for Research [ANR-17-CE19-0002-01].

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: JP works as expert on electronic cigarette risk assessment for the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). Other authors report no conflict of interest concerning the present study.

Acknowledgement

Authors would like to kindly thank the slaughterhouse DespiViandes (La Talaudière France) for supplying the porcine respiratory tracts.

References

- e-Voke 10mg and 15mg Electronic Inhaler, Pub L. (2015). No. PL 42601/0003-4, PL 42601/0003-4 PL 42601/0003-4. <https://mhraproductsprod.blob.core.windows.net/docs-20200420/56f25daab2a2968139bc37075e194d1a5f12b33f>.
- Bertholon, J.-F., Bequemin, M. H., Roy, M., Roy, F., Ledur, D., Annesi Maesano, L., et al. (2013). Comparaison de l'aérosol de la cigarette électronique à celui des cigarettes ordinaires et de la chicha. *Revue des Maladies Respiratoires*, 30(9), 752–757. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2013.03.003>.
- Bertrand, P., Bonnarme, V., Piccirilli, A., Ayrault, P., Lemée, L., Frapper, G., et al. (2018). Physical and chemical assessment of 1,3 Propanediol as a potential substitute of propylene glycol in refill liquid for electronic cigarettes. *Scientific Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29066-6>.
- Caldwell, B., Sumner, W., & Crane, J. (2012). A systematic review of nicotine by inhalation: Is there a role for the inhaled route? *Nicotine & Tobacco Research*, 14(10), 1127–1139. <https://doi.org/10.1093/ntr/mts009>.
- Crémillieux, Y., Montigaud, Y., Bal, C., Pinaud, N., Pham, V., Perinel, S., et al. (2020). Three-dimensional quantitative MRI of aerosolized gadolinium-based nanoparticles and contrast agents in isolated ventilated porcine lungs. *Magnetic Resonance in Medicine*, 83(5), 1774–1782. <https://doi.org/10.1002/mrm.28041>.
- Flora, J. W., Meruva, N., Huang, C. B., Wilkinson, C. T., Ballentine, R., Smith, D. C., et al. (2016). Characterization of potential impurities and degradation products in electronic cigarette formulations and aerosols. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 74, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.11.009>.
- Floyd, E. L., Queimado, L., Wang, J., Regens, J. L., & Johnson, D. L. (2018). Electronic cigarette power affects count concentration and particle size distribution of vaping aerosol. *PLoS One*, 13(12), Article e0210147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210147>.
- Fuoco, F. C., Buonanno, G., Stabile, L., & Vigo, P. (2014). Influential parameters on particle concentration and size distribution in the mainstream of e-cigarettes. *Environmental Pollution*, 184, 523–529. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.010>.
- Glasser, A. M., Collins, L., Pearson, J. L., Abudayyeh, H., Niaura, R. S., Abrams, D. B., et al. (2017). Overview of electronic nicotine delivery systems: A systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*, 52(2), e33–e66. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2016.10.036>.
- Grana, R., Neal, B., & Glantz Stanton, A. (2014). E-Cigarettes. *Circulation*, 129(19), 1972–1986. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.007667>.
- Holbrook, L. T., Zeman, K. L., Burke, A., Jaspers, I., & Bennett, W. D. (2018). Radiolabeling an electronic cigarette aerosol using technetium carbon ultrafine particles. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 32(1), 47–53. <https://doi.org/10.1089/jamp.2017.1442>.
- Ingebrethsen, B. J., Cole, S. K., & Alderman, S. L. (2012). Electronic cigarette aerosol particle size distribution measurements. *Inhalation Toxicology*, 24(14), 976–984. <https://doi.org/10.3109/08958378.2012.744781>.
- Kleinsteuer, C., & Feng, Y. (2013). Lung deposition analyses of inhaled toxic aerosols in conventional and less harmful cigarette smoke: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 4454–4485. <https://doi.org/10.3390/ijerph10094454>.
- Kosmider, L., Cox, S., Zaciara, M., Kurek, J., Goniewicz, M. L., McRobbie, H., et al. (2020). Daily exposure to formaldehyde and acetaldehyde and potential health risk associated with use of high and low nicotine e-liquid concentrations. *Scientific Reports*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63292-1>.
- Manigrasso, M., Buonanno, G., Fuoco, F. C., Stabile, L., & Avino, P. (2015). Aerosol deposition doses in the human respiratory tree of electronic cigarette smokers. *Environmental Pollution*, 196, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.013>.
- Manigrasso, M., Buonanno, G., Fuoco, F. C., Stabile, L., & Avino, P. (2017). Electronic cigarettes: Age-specific generation-resolved pulmonary doses. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(14), 13068–13079. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8914-8>.
- Manigrasso, M., Buonanno, G., Stabile, L., Morawska, L., & Avino, P. (2015). Particle doses in the pulmonary lobes of electronic and conventional cigarette users. *Environmental Pollution*, 202, 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.008>.
- MHRA (2017, December 14). E-cigarettes: Regulations for consumer products. GOV.UK. <https://www.gov.uk/guidance/e-cigarettes-regulations-for-consumer-products>.
- Mikheev, V. B., Brinkman, M. C., Granville, C. A., Gordon, S. M., & Clark, P. I. (2016). Real-time measurement of electronic cigarette aerosol size distribution and metals content analysis. *Nicotine & Tobacco Research*, 18(9), 1895–1902. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntw128>.
- Montigaud, Y., Georges, Q., Pourchez, J., Ledere, L., Goy, C., Clotagatide, A., et al. (2019). Aerosol delivery during invasive mechanical ventilation: Development of a preclinical *ex vivo* respiratory model for aerosol regional deposition. *Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54480-9>.

- Montigaud, Y., Perinel-Ragey, S., Plantier, L., Leclerc, L., Goy, C., Clotagatide, A., et al. (2019). Development of an ex vivo preclinical respiratory model of idiopathic pulmonary fibrosis for aerosol regional studies. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54479-2>.
- Mulder, H. A., Patterson, J. L., Halquist, M. S., Kosmider, L., Turner, J. B. M., Poklis, J. L., et al. (2019). The effect of electronic cigarette user modifications and E-liquid adulteration on the particle size profile of an aerosolized product. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46387-2>.
- National Center for Replacement. (2018, August 13). Reduction and refinement of animal research. The 3Rs | NC3Rs <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>.
- Newman, S., Bennett, W. D., Biddiscombe, M., Devadason, S. G., Dolovich, M. B., Fleming, J., et al. (2012). Standardization of techniques for using planar (2D) imaging for aerosol deposition assessment of orally inhaled products. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 25(S1), S-10. <https://doi.org/10.1089/jamp.2012.15s4>.
- Nordlund, M., Belka, M., Kuczaj, A. K., Lízal, F., Jedelsky, J., Elcner, J., et al. (2017). Multicomponent aerosol particle deposition in a realistic cast of the human upper respiratory tract. *Inhalation Toxicology*, 29(3), 113–125. <https://doi.org/10.1080/08958378.2017.1315196>.
- Oldham, M. J., Zhang, J., Rusyniak, M. J., Kane, D. B., & Gardner, W. P. (2018). Particle size distribution of selected electronic nicotine delivery system products. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.045>.
- Olmedo, P., Goessler, W., Tanda, S., Grau-Perez, M., Jarmul, S., Aherrera, A., et al. (2018). Metal concentrations in e-cigarette liquid and aerosol samples: The contribution of metallic coils. *Environmental Health Perspectives*, 126(2). <https://doi.org/10.1289/EHP2175>.
- Ooi, B. G., Dutta, D., Kazipeta, K., & Chong, N. S. (2019). Influence of the E-cigarette emission profile by the ratio of glycerol to propylene glycol in E-liquid composition. *ACS Omega*, 4(8), 13338–13348. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01504>.
- Palazzolo, D. L. (2013). Electronic cigarettes and vaping: A new challenge in clinical medicine and public health. A literature review. *Frontiers in Public Health*, 1. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00056>.
- Pankow, J. F. (2001). A consideration of the role of gas/particle partitioning in the deposition of nicotine and other tobacco smoke compounds in the respiratory tract. *Chemical Research in Toxicology*, 14(11), 1465–1481. <https://doi.org/10.1021/cr010090i>.
- Pankow, J. F., Tavakoli, A. D., Luo, W., & Isabelle, L. M. (2003). Percent free base nicotine in the tobacco smoke particulate matter of selected commercial and reference cigarettes. *Chemical Research in Toxicology*, 16(8), 1014–1018. <https://doi.org/10.1021/cr0340596>.
- Perinél, S., Leclerc, L., Prévôt, N., Deville, A., Cottier, M., Durand, M., et al. (2016). Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new ex vivo preclinical model. *Respiratory Research*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12931-016-0395-7>.
- Perinél, S., Pourchez, J., Leclerc, L., Avet, J., Durand, M., Prévôt, N., et al. (2017). Development of an ex vivo human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep43121>.
- Pourchez, J., de Oliveira, F., Perinel-Ragey, S., Basset, T., Vergnon, J.-M., & Prévôt, N. (2017). Assessment of new-generation high-power electronic nicotine delivery system as thermal aerosol generation device for inhaled bronchodilators. *International Journal of Pharmaceutics*, 518(1), 264–269. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.009>.
- Pourchez, J., Parisse, S., Sarry, G., Perinel-Ragey, S., Vergnon, J.-M., Clotagatide, A., et al. (2018). Impact of power level and refill liquid composition on the aerosol output and particle size distribution generated by a new-generation e-cigarette device. *Aerosol Science and Technology*, 52(4), 359–369. <https://doi.org/10.1080/02786826.2017.1422857>.
- Pratte, P., Cosandey, S., & Goujon-Ginglinger, C. (2016). A scattering methodology for droplet sizing of e-cigarette aerosols. *Inhalation Toxicology*, 28(12), 537–545. <https://doi.org/10.1080/08958378.2016.1224956>.
- Prévôt, N., Oliveira, F. de, Perinel-Ragey, S., Basset, T., Vergnon, J.-M., & Pourchez, J. (2017). Nicotine delivery from the refill liquid to the aerosol via high-power e-cigarette device. *Scientific Reports*, 7(1), 2592. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03008-0>.
- Smith, D. M., Schneller, L. M., O'Connor, R. J., & Goniewicz, M. L. (2019). Are E-cigarette flavors associated with exposure to nicotine and toxicants? Findings from wave 2 of the population assessment of tobacco and health (PATH) study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(24), 5055. <https://doi.org/10.3390/ijerph16245055>.
- Son, Y., Mainelis, G., Delnevo, C., Wackowski, O. A., Schwander, S., & Meng, Q. (2019). Investigating E-cigarette particle emissions and human airway depositions under various E-cigarette-use conditions. *Chemical Research in Toxicology*. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00243>.
- Sood, A. K., Kesic, M. J., & Hernandez, M. L. (2018). Electronic cigarettes: One size does not fit all. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(6), 1973–1982. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.029>.
- Sosnowski, T. R., Jablczynska, K., Odziomek, M., Schlage, W. K., & Kuczaj, A. K. (2018). Physicochemical studies of direct interactions between lung surfactant and components of electronic cigarettes liquid mixtures. *Inhalation Toxicology*, 30(4–5), 159–168. <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1478916>.
- Sosnowski, T. R., & Kramiec-Romanowska, K. (2016). Predicted deposition of E-cigarette aerosol in the human lungs. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 29(3), 299–309. <https://doi.org/10.1089/jamp.2015.1268>.
- Sosnowski, T. R., & Odziomek, M. (2018). Particle size dynamics: Toward a better understanding of electronic cigarette aerosol interactions with the respiratory system. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00853>.
- St Helen, G., Havel, C., Dempsey, D., Jacob, P., & Benowitz, N. L. (2016). Nicotine delivery, retention, and pharmacokinetics from various electronic cigarettes. *Addiction*, 111(3), 535–544. <https://doi.org/10.1111/add.13183>.
- Sundahl, M., Berg, E., & Svensson, M. (2017). Aerodynamic particle size distribution and dynamic properties in aerosols from electronic cigarettes. *Journal of Aerosol Science*, 103, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2016.10.009>.
- Thornburg, J. (2017). Chapter 3 - exposures to e-cigarette vapor. In K. E. Farsalinos, I. G. Gillman, S. S. Hecht, R. Polosa, & J. Thornburg (Eds.), *Analytical assessment of E-cigarettes* (pp. 37–58). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811241-0.00003-6>.
- Vansickel, A. R., Edmiston, J. S., Liang, Q., Duhon, C., Connell, C., Bennett, D., et al. (2018). Characterization of puff topography of a prototype electronic cigarette in adult exclusive cigarette smokers and adult exclusive electronic cigarette users. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.019>.
- Visser, W. F., Klerx, W. N., Cremers, H. W. J. M., Ramlal, R., Schwillens, P. L., & Talhout, R. (2019). The health risks of electronic cigarette use to bystanders. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(9), 1525. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091525>.
- Williams, M., & Talbot, P. (2019). Design features in multiple generations of electronic cigarette atomizers. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(16), 2904. <https://doi.org/10.3390/ijerph16162904>.
- Zervas, E., Litsiou, E., Konstantopoulos, K., Pouloupoulos, S., & Katsaounou, P. (2018). Physical characterization of the aerosol of an electronic cigarette: Impact of refill liquids. *Inhalation Toxicology*, 30(6), 218–223. <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1500662>.
- Zhang, Y., Sumner, W., & Chen, D.-R. (2013). In vitro particle size distributions in electronic and conventional cigarette aerosols suggest comparable deposition patterns. *Nicotine & Tobacco Research*, 15(2), 501–508. <https://doi.org/10.1093/ntn/nts165>.
- Zhao, J., Nelson, J., Dada, O., Pyrgiotakis, G., Kavouras, I. G., & Demokritou, P. (2018). Assessing electronic cigarette emissions: Linking physico-chemical properties to product brand, e-liquid flavoring additives, operational voltage and user puffing patterns. *Inhalation Toxicology*, 30(2), 78–88. <https://doi.org/10.1080/08958378.2018.1450462>.

3. Conclusions et perspectives

Cette étude a permis de montrer qu'il était possible de marquer, de manière relativement aisée, le liquide de e-cigarette avec un radioisotope couramment utilisé en imagerie scintigraphique. En outre, ce marquage ne modifie pas le diamètre aérodynamique de l'aérosol émis.

L'étude de la régionalisation des dépôts montrent une fraction déposée thoracique d'environ 90%, tandis que les dépôts extrathoraciques représentent 10% de la dose déposée. Ces résultats sont compatibles avec les données estimées à l'aide des modélisations mathématiques *in silico*.

Bien que des études complémentaires précliniques et cliniques soient nécessaires pour valider la portée de cette preuve de concept. L'utilisation du modèle *ex vivo* a permis de fournir des résultats fiables et robustes, en accord avec les modélisations mathématiques couramment admises. En outre, l'utilisation du modèle *ex vivo* dans ce type d'étude permet d'outrepasser les facteurs confondants inhérents à la détermination du diamètre aérodynamique de émissions générées par les e-cigarettes, qui sont dépendantes des propriétés physico-chimiques de l'aérosol (volatilités des solvants utilisés, comportement dynamique de l'aérosol, hygroscopie des gouttelettes aérosolisées, proportion relative des différents composants du liquide), de la e-cigarette (type de dispositif, composition de la mèche et de la résistance, puissance utilisée) et des modes de consommation des usagers.

Amélioration de la pertinence scientifique des modèles *ex vivo* : vers un modèle perfusé-ventilé

1. Introduction

La transformation du modèle *ex vivo* ventilé en un modèle perfusé-ventilé est une discussion de long cours au sein de l'équipe. En effet, bien qu'un modèle ventilé soit un apport pertinent aux études de dépôt d'aérosol, les apports d'un modèle qui serait également perfusé permettrait, non seulement, des études de dépôt mais aussi des études d'absorption par voie pulmonaire. Cela permettrait, *in fine*, de développer une plateforme PK-PD, un nouvel outil d'intérêt majeur dans le criblage et le développement de nouveaux DM ou de l'utilisation de PA en aérosolthérapie, pour des administrations locale ou systémiques.

Toutefois, les contraintes logistiques apportées par cette évolution du modèle sont drastiques. En effet, dans ce cas précis, il serait impossible d'utiliser des poumons obtenus auprès d'abattoirs, car ceux-ci ne seraient plus viables. Aussi, d'autres solutions ont-elles été trouvées. Toujours dans une démarche 3R, notre équipe collabore avec d'autres équipes universitaires utilisant des porcs pour de l'expérimentation animale. Lors de la mise à mort des animaux, nous prélevons les poumons de l'animal.

2. Données préliminaires

Actuellement, après s'être formée, notre équipe a eu la possibilité de réaliser une première expérience de faisabilité du modèle perfusé.

Le prélèvement du tractus respiratoire porcin a été réalisé grâce à la visio-assistance d'un chirurgien thoracique spécialisé dans les greffes pulmonaires. Lors de l'ouverture du thorax, un soluté de conservation est injecté laver le territoire vasculaire pulmonaire et éviter une éventuelle formation d'embolie. Puis, les poumons sont sortis de la cage thoracique et placés dans un container de transport à 4°C et transportés jusqu'à nos laboratoires.

Le tractus est, ensuite, placé sur un circuit de circulation extra-corporelle et le soluté de conservation est remplacé par un soluté de perfusion. Un monitoring des pressions minutieux est réalisé pour prévenir toute formation d'œdème aigu du poumon (OAP) lors de la perfusion.

Au cours de cet essai, la ventilation en pression positive du tractus respiratoire a été réalisée selon un protocole proche du modèle *ex vivo* en ventilation mécanique invasive.

3. Conclusions et perspectives

La réalisation de cet essai de faisabilité nous a permis d'adapter le protocole expérimental qui avait préalablement mis en place. Finalement, nous avons pu perfuser le tractus respiratoire pendant 2 heures sans déclenchement d'OAP, ni modification flagrante des paramètres ventilatoires.

À la suite de ce premier essai fructueux, des questionnements sur la viabilité de la paroi alvéolo-capillaire subsiste. La réalisation d'autres essais impliquant l'évaluation de la perméabilité capillaire par clairance d'un aérosol de ^{99m}Tc -DTPA servira de preuve de concept pour le développement et la validation de ce modèle perfusé-ventilé.

Cette nouvelle étape dans l'amélioration du modèle *ex vivo* devrait permettre de proposer un modèle plus pertinent et biomimétique, nous seulement orienté pour le développement de nouveaux DM mais aussi pour de potentiels essais sur l'administration par voie inhalée de PA à visée systémique.

Conclusions

Conclusions générales

Le développement et la validation expérimentale de modèles *ex vivo* pathologiques au cours de ces travaux de thèse ont suivi un cahier des charges stricts, afin de permettre la génération de données robustes et fiables sur la cartographie des dépôts d'aérosol dans le tractus respiratoire. Les différents résultats présentés et publiés dans différentes revues démontrent la viabilité de ces modèles.

D'autre part, les applications de ce modèle dans divers champs cliniques et précliniques sont concluantes. En effet, nous avons pu, grâce à ces modèles, étudier la régionalisation des dépôts d'aérosols divers (émissions de e-cigarette, aérosols de nanoparticules théranostiques, recherche de la position optimale d'un nébuliseur dans un circuit ventilation pour la ventilation mécanique) et réaliser des essais de prototypes de bronchoscope pour un industriel.

Ainsi, ces travaux, reposent sur une démarche multidisciplinaire et collaborative, ont permis de répondre à des questions diverses. Après plusieurs années de développement et de valorisation, les modèles *ex vivo* ventilés semblent attiser la curiosité des industriels de l'aérosolthérapie. En effet, les modèles semblent être un outil pertinent, complémentaire des différents modèles précliniques existants.

Enfin, ces travaux de thèse s'achèvent sur un constat simple mais qui ne doit pas être oublié : ces différents modèles *ex vivo* ne sont pas des alternatives à la recherche clinique et ne visent pas à supplanter les autres modèles précliniques existants. En effet, ces modèles permettent de répondre à des limites inhérentes aux autres modèles mais étant donné leurs limites propres, ils ne peuvent se prévaloir de répondre à toutes les questions précliniques et encore moins à toutes les interrogations cliniques.

Ainsi, il convient de garder à l'esprit que l'extrapolation des résultats obtenus avec les modèles précliniques vers l'être humain, entre autres les modèles *ex vivo*, doit toujours être faite avec circonspection et prudence. Toutefois, bien que les modèles précliniques ne soient qu'une représentation simplifiée de l'être humain leur objectif est d'avoir une similarité suffisante, en

fonction de l'objectif recherché, pour permettre l'obtention des données préliminaires indispensables à la mise en place d'études *in vivo* humaines.

Perspectives

Les modèles *ex vivo* nécessitent un processus d'amélioration continue, pour accroître le biomimétisme et la pertinence clinique, tout en respectant le cahier des charges initial, notamment en termes de coût de fonctionnement et facilité d'utilisation du modèle. Ceci a été réalisé à plusieurs reprises au cours des trois années écoulées, notamment par la création de deux nouvelles enceintes instrumentées, l'investissement dans un système d'acquisition Biopac®, la production de 2 nouvelles répliques anatomiques des VAS humaines ou la réalisation des nébulisations en position proclive à 30° dans certaines études.

Cependant, les possibilités d'amélioration restent importantes. En effet, le modèle est, actuellement, en conditions d'isothermie et d'isohumidité avec l'air ambiant. Le développement d'une humidification et d'un réchauffement de l'air inspiré, entre les VAS et la partie proximale des VAI, permettrait d'accroître la pertinence des modèles. De même, permettre aux modèles de pouvoir passer de la position de décubitus dorsal à une position proclive à différents angles d'inclinaison (30°, 60° et 90°). Enfin, les modèles *ex vivo*, exception faite du modèle pédiatrique de BPD, ne présentent pas de diaphragme, ni de cage thoracique. Lors de la verticalisation, les bases pulmonaires reposent sur la coupole diaphragmatique, ce qui est à l'origine d'une modification locale de la ventilation. L'absence de cage thoracique pose le problème du volume pulmonaire maximal en fin d'inspiration, qui dépend de la mécanique respiratoire dans les modèles *ex vivo*, alors qu'*in vivo* la cage thoracique vient limiter l'expansion des poumons.

Ces différents points sont autant de perspectives d'amélioration des modèles *ex vivo*, afin d'accroître leur pertinence dans l'étude de régionalisation des dépôts d'aérosols.

Concernant les perspectives scientifiques des modèles, les applications potentielles sont vastes et s'étendent de la formation des internes en médecine à l'endoscopie bronchique à l'étude de l'exposition à des aérosols toxiques en passant par différentes applications en aérosolthérapie, telles que l'administration inhalée d'antibiotiques dans les infections des voies respiratoires par aérosolisation de bactéries dans le tractus respiratoire comme cela a précédemment été réalisé avec des légionelles.

Conclusions personnelles

Ces trois années de thèse représentent un long cheminement professionnel et personnel, car elles parachèvent mes études de pharmacie. Grâce aux encouragements, aux conseils et à la confiance de l'équipe d'encadrant qui m'ont suivi, j'ai pu, dans un environnement de grande autonomie, prendre ce projet de thèse à bras le corps et le transformer selon mes envies et les résultats que nous obtenions.

J'ai eu la chance d'être traité par mes collègues, non comme un apprenti-chercheur, mais comme un égal dont le point de vue, certes moins expérimenté, n'en était pas moins intéressant. Ainsi, au cours de ces travaux, j'ai non seulement intégré un projet plus grand que mon « simple projet de thèse » mais aussi une équipe scientifique et une entité de recherche. J'ai pu entreprendre la gestion de projets scientifiques dans sa globalité, non à l'échelle de quelques mois, mais à l'échelle de plusieurs années, dans la façon de construire et d'orienter les différents projets selon une ligne directrice. En outre, l'intégration au sein d'une équipe multidisciplinaire a été une expérience forte en enseignements, qui m'ont permis de prendre du recul quant à mes connaissances.

Je ressors de ces trois années, certes fatigué par le rythme effréné que je leur ai donné, mais heureux et fier d'avoir pu réaliser cette aventure.

Sur le plan professionnel, alors que j'étais plein de certitudes sur une carrière dans l'industrie pharmaceutique à l'entrée en thèse, je suis maintenant plus circonspect sur ce projet professionnel. Occupant actuellement un poste de post-doctorat au sein de l'équipe de Génie Pharmaceutique du LAGEPP (Laboratoire d'Automatisation, de Génie des Procédés et de Génie Pharmaceutique) de l'Université Claude Bernard Lyon 1, je souhaite dorénavant intégrer la recherche académique. Des zones d'ombres planent encore sur ce nouveau projet professionnel quant à une orientation enseignement-recherche ou recherche pure. Les prochains mois sauront répondre à ces interrogations.

Bibliographie

- Adjei IM, Sharma B, Labhasetwar V. Nanoparticles: Cellular Uptake and Cytotoxicity. In: Capco DG, Chen Y, éditeurs. *Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cité 10 juill 2020]. p. 73-91. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_5
- AFNOR. NF EN 13544-1+A1 - Novembre 2009 [Internet]. 2009 [cité 18 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-13544-1a1/materiel-respiratoire-therapeutique-partie-1-systemes-de-nebulisation-et-leurs-composants/article/781495/fa165049>
- Albasarah YY. Colloidal carriers for nebulized drug delivery [Internet] [Ph.D.]. University of London; 2012 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://ethos.bl.uk/OrderDetails.do?uin=uk.bl.ethos.553758>
- Albuquerque I. Aérosols nanométriques médicaux : Développement, caractérisation et cartographie de dépôt. [Internet] [phdthesis]. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne; 2013 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00834730>
- Alcorn JL. Chapter 4 - Pulmonary Surfactant Trafficking and Homeostasis. In: Sidhaye VK, Koval M, éditeurs. *Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [cité 22 juin 2020]. p. 59-75. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803809300004X>
- Ali S, Rytting E. Influences of Nanomaterials on the Barrier Function of Epithelial Cells. In: Capco DG, Chen Y, éditeurs. *Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cité 10 juill 2020]. p. 45-54. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_3
- Anderson PJ. Assessment end points for inhaled drug delivery. *Respir Care*. juin 2000;45(6):737-55.
- Apiou-Sbirlea G, Newman S, Fleming J, Siekmeier R, Ehrmann S, Scheuch G, et al. Bioequivalence of inhaled drugs: fundamentals, challenges and perspectives. *Ther Deliv*. 26 févr 2013;4(3):343-67.
- Ari A. Patient Education and Adherence to Aerosol Therapy. *Respir Care*. 1 juin 2015;60(6):941-57.
- Artzy-Schnirman A, Hobi N, Schneider-Daum N, Guenat OT, Lehr C-M, Sznitman J. Advanced in vitro lung-on-chip platforms for inhalation assays: From prospect to pipeline. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 nov 2019;144:11-7.
- Arulmuthu ER. Formulation and aerosol delivery of nano-sized biomaterials [Internet] [Ph.D.]. Loughborough University; 2007 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://hdl.handle.net/2134/33593>
- Bäckman P, Arora S, Couet W, Forbes B, de Kruijf W, Paudel A. Advances in experimental and mechanistic computational models to understand pulmonary exposure to inhaled drugs. *Eur J Pharm Sci*. 15 févr 2018;113:41-52.

- Bailey MM, Berkland CJ. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. *Med Res Rev.* 2009;29(1):196-212.
- Bajc M, Neilly JB, Miniati M, Schuemichen C, Meignan M, Jonson B. EANM guidelines for ventilation/perfusion scintigraphy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 1 août 2009;36(8):1356-70.
- Bates JHT. Chapter 16 - Mechanical Properties of the Lung. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 289-304. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000163>
- Beck-Broichsitter M, Gauss J, Packhaeuser CB, Lahnstein K, Schmehl T, Seeger W, et al. Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model. *Int J Pharm.* 9 févr 2009;367(1):169-78.
- Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, et al. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey Inside the Cell. *Chem Soc Rev.* 17 juill 2017;46(14):4218-44.
- Berlinski A. Assessing New Technologies in Aerosol Medicine: Strengths and Limitations. *Respir Care.* 1 juin 2015;60(6):833-49.
- Berlinski A. Pediatric Aerosol Therapy. *Respir Care.* 1 juin 2017;62(6):662-77.
- Bisgaard H, O'Callaghan C, Smaldone G. Drug delivery to the lung. *Drug Delivery to the Lung.* 2001. p. 512.
- Bohr A, Ruge CA, Beck-Broichsitter M. Preparation of Nanoscale Pulmonary Drug Delivery Formulations by Spray Drying. In: Capco DG, Chen Y, éditeurs. *Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine* [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cité 10 juill 2020]. p. 183-206. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_10
- Brazzell RK, Smith RB, Kostenbauder HB. Isolated Perfused Rabbit Lung As a Model for Intravascular and Intrabronchial Administration of Bronchodilator Drugs I: Isoproterenol. *J Pharm Sci.* 1 nov 1982;71(11):1268-74.
- Brown JS. Chapter 27 - Deposition of Particles. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 513-36. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000278>
- Buckley ST, Kim K-J, Ehrhardt C. Chapter 18 - In Vitro Cell Culture Models for Evaluating Controlled Release Pulmonary Drug Delivery. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 417-42. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_18
- Burrowes KS, Backer JD, Kumar H. Image-based computational fluid dynamics in the lung: virtual reality or new clinical practice? *WIREs Syst Biol Med.* 2017;9(6):e1392.
- Carvalho TC, McConville JT. The function and performance of aqueous aerosol devices for inhalation therapy. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(5):556-78.
- Chan H-K. Dry Powder Aerosol Delivery Systems: Current and Future Research Directions. *J Aerosol Med.* 1 mars 2006;19(1):21-7.

- Chan JGY, Wong J, Zhou QT, Leung SSY, Chan H-K. Advances in Device and Formulation Technologies for Pulmonary Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech.* 12 avr 2014;15(4):882-97.
- Choi L. Simulation of fluid dynamics and particle transport in realistic human airways [Internet] [Thesis]. RMIT University; 2007 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://trove.nla.gov.au/version/50931528>
- Cipolla D, Chan H-K, Schuster J, Farina D. Personalizing aerosol medicine: development of delivery systems tailored to the individual. *Ther Deliv.* 1 nov 2010;1(5):667-82.
- Clark AR. Understanding Penetration Index Measurements and Regional Lung Targeting. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 26 janv 2012;25(4):179-87.
- Claus S, Weiler C, Schiewe J, Friess W. How can we bring high drug doses to the lung? *Eur J Pharm Biopharm.* 1 janv 2014;86(1):1-6.
- Coleman DM, Kelly HW, McWilliams BC, Pérez A, Perreault MM. Therapeutic Aerosol Delivery during Mechanical Ventilation. *Ann Pharmacother.* 1 juin 1996;30(6):644-55.
- Conway J, Fleming J, Bennett M, Havelock T. The Co-imaging of Gamma Camera Measurements of Aerosol Deposition and Respiratory Anatomy. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 21 mars 2013;26(3):123-30.
- Corcoran TE. Imaging in Aerosol Medicine. *Respir Care.* 1 juin 2015;60(6):850-7.
- Coste G. Les techniques d'aérosolthérapie par nébulisation. *Actual Pharm.* 1 févr 2019;58(583):49-53.
- Croce C, Fodil R, Durand M, Sbirlea-Apiou G, Caillibotte G, Papon J-F, et al. In Vitro Experiments and Numerical Simulations of Airflow in Realistic Nasal Airway Geometry. *Ann Biomed Eng.* 1 juin 2006;34(6):997-1007.
- Crompton GK, Barnes PJ, Broeders M, Corrigan C, Corbetta L, Dekhuijzen R, et al. The need to improve inhalation technique in Europe: A report from the Aerosol Drug Management Improvement Team. *Respir Med.* 1 sept 2006;100(9):1479-94.
- Crowder TM, Donovan MJ. Chapter 9 - Science and Technology of Dry Powder Inhalers. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 203-22. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_9
- Cunningham DA, Lavender JP. Krypton 81m ventilation scanning in chronic obstructive airways disease. *Br J Radiol.* 1 févr 1981;54(638):110-6.
- Darquenne C, Fleming JS, Katz I, Martin AR, Schroeter J, Usmani OS, et al. Bridging the Gap Between Science and Clinical Efficacy: Physiology, Imaging, and Modeling of Aerosols in the Lung. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 1 févr 2016;29(2):107-26.
- Darquenne C, Paiva M. One-dimensional simulation of aerosol transport and deposition in the human lung. *J Appl Physiol.* 1 déc 1994;77(6):2889-98.
- Darquenne C, Paiva M. Two- and three-dimensional simulations of aerosol transport and deposition in alveolar zone of human lung. *J Appl Physiol.* 1 avr 1996;80(4):1401-14.
- Dhand R. Aerosol Therapy in Patients Receiving Noninvasive Positive Pressure Ventilation. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 22 déc 2011;25(2):63-78.

- DiBlasi RM. Clinical Controversies in Aerosol Therapy for Infants and Children. *Respir Care*. 1 juin 2015;60(6):894-916.
- Dolovich M b. Measuring Total and Regional Lung Deposition Using Inhaled Radiotracers. *J Aerosol Med*. 1 févr 2001;14(supplement 1):35-44.
- Dugernier J, Hesse M, Jumetz T, Bialais E, Roeseler J, Depoortere V, et al. Aerosol Delivery with Two Nebulizers Through High-Flow Nasal Cannula: A Randomized Cross-Over Single-Photon Emission Computed Tomography-Computed Tomography Study. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2 mai 2017;30(5):349-58.
- Durand M, Le Guellec S, Pourchez J, Dubois F, Aubert G, Chantrel G, et al. Sonic aerosol therapy to target maxillary sinuses. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*. 1 oct 2012;129(5):244-50.
- Ehrmann S, Schmid O, Darquenne C, Rothen-Rutishauser B, Sznitman J, Yang L, et al. Innovative preclinical models for pulmonary drug delivery research. *Expert Opin Drug Deliv*. 2 avr 2020;17(4):463-78.
- El Merhie A, Navarro L, Delavenne X, Leclerc L, Pourchez J. A new Strategy to Improve Drug Delivery to the Maxillary Sinuses: The Frequency Sweep Acoustic Airflow. *Pharm Res*. mai 2016;33(5):1074-84.
- El-Gendy N, Kaviratna A, Berkland C, Dhar P. Delivery and performance of surfactant replacement therapies to treat pulmonary disorders. *Ther Deliv* [Internet]. août 2013 [cité 10 juin 2020];4(8). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3840129/>
- El-Sherbiny IM, El-Baz NM, Yacoub MH. Inhaled nano- and microparticles for drug delivery. *Glob Cardiol Sci Pract* [Internet]. 31 mars 2015 [cité 6 févr 2020];2015. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4386009/>
- El-Sherbiny IM, Villanueva DG, Herrera D, Smyth HDC. Chapter 5 - Overcoming Lung Clearance Mechanisms for Controlled Release Drug Delivery. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 101-26. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_5
- European Commission. Definition - Nanomaterials - Environment [Internet]. European Commission. 2011 [cité 24 août 2020]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm
- Ewing P. A novel technology for studying the disposition of drugs and toxicants in the lung : Short inhalation exposures of the isolated and perfused rat lung to respirable dry particle aerosols [dok]. Institutet för miljömedicin (IMM) / Institute of Environmental Medicine; 2010.
- Fazio F, Jones T. Assessment of regional ventilation by continuous inhalation of radioactive krypton-81m. *Br Med J*. 20 sept 1975;3(5985):673-6.
- Fazio F, Wollmer P, Lavender JP, Barr MM. Clinical ventilation imaging with In-113m aerosol: a comparison with Kr-81m. *J Nucl Med U S* [Internet]. 1 avr 1982 [cité 26 août 2020];23:4. Disponible sur: <https://www.osti.gov/biblio/5588672>
- Fenwick N, Griffin G, Gauthier C. The welfare of animals used in science: How the “Three Rs” ethic guides improvements. *Can Vet J*. mai 2009;50(5):523-30.

- Fleming J, Bailey DL, Chan H-K, Conway J, Kuehl PJ, Laube BL, et al. Standardization of Techniques for Using Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT) for Aerosol Deposition Assessment of Orally Inhaled Products. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 1 déc 2012;25(S1):S-29.
- Fleming J s., Conway J h., Bolt L, Holgate S t. A Comparison of Planar Scintigraphy and SPECT Measurement of Total Lung Deposition of Inhaled Aerosol. *J Aerosol Med.* 1 mars 2003;16(1):9-19.
- Fleming JS, Quint M, Bolt L, Martonen TB, Conway JH. Comparison of SPECT Aerosol Deposition Data with Twenty-Four-Hour Clearance Measurements. *J Aerosol Med.* 1 sept 2006;19(3):261-7.
- Ganguly K, Carlander U, Garessus ED, Fridén M, Eriksson UG, Tehler U, et al. Computational modeling of lung deposition of inhaled particles in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients: identification of gaps in knowledge and data. *Crit Rev Toxicol.* 7 févr 2019;49(2):160-73.
- Garcia JGN. 6 - Pulmonary Circulation and Regulation of Fluid Balance. In: Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, et al., éditeurs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [cité 11 juin 2020]. p. 92-110.e8. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455733835000063>
- Gibbons A, Smyth HDC. Chapter 10 - Science and Technology of Nebulizers and Liquid-Based Aerosol Generators. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 223-36. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_10
- Goldstein I. Pénétration pulmonaire et efficacité des antibiotiques administrés par aérosol au cours des broncho-pneumonies expérimentales chez le porcelet ventilé [Thèse de doctorat]. [1970-2019, France]: Université Paris Descartes; 2005.
- Goralski JL, Davis SD. Breathing easier: Addressing the challenges of aerosolizing medications to infants and preschoolers. *Respir Med.* 1 août 2014;108(8):1069-74.
- Groneberg DA, Paul H, Welte T. Novel strategies of aerosolic pharmacotherapy. *Exp Toxicol Pathol.* 15 juin 2006;57:49-53.
- Guillon A, Vecellio L, Montharu J, Barc C, Schubnel V, Roseau G, et al. Techniques d'administration d'aérosols de médicaments chez l'animal. *STAL Sci Tech Anim Lab.* 2013;39(3):31.
- Harkema JR. Chapter 2 - Comparative Anatomy and Epithelial Cell Biology of the Nose. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 7-19. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000023>
- Hatch TF, Gross P, Clayton GD. Pulmonary Deposition and Retention of Inhaled Aerosols [Internet]. Elsevier; 1964 [cité 14 juill 2020]. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/C20130125937>
- Hayes M, Taplin GV. Lung Imaging with radioaerosols for the assessment of airway disease. *Semin Nucl Med.* 1 juill 1980;10(3):243-51.

- Hazari MS, Farraj AK. Chapter 15 - Comparative Control of Respiration. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 245-88. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000151>
- Henderson W, Paré PA, Ayas NT. 5 - Respiratory System Mechanics and Energetics. In: Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, et al., éditeurs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [cité 11 juin 2020]. p. 76-91.e2. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455733835000051>
- Henning A, Hein S, Schneider M, Bur M, Lehr C-M. Pulmonary Drug Delivery: Medicines for Inhalation. In: Schäfer-Korting M, éditeur. *Drug Delivery* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010 [cité 6 févr 2020]. p. 171-92. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_6
- Hess DR. Aerosol Delivery Devices in the Treatment of Asthma. *Respir Care*. 1 juin 2008;53(6):699-725.
- Heuking S, Borchard G. Chapter 16 - Pulmonary Delivery of Plasmid DNA for Disease Prevention and Therapy. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 367-81. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_16
- Heyder J. Deposition of Inhaled Particles in the Human Respiratory Tract and Consequences for Regional Targeting in Respiratory Drug Delivery. *Proc Am Thorac Soc*. 1 déc 2004;1(4):315-20.
- Hidalgo A, Cruz A, Pérez-Gil J. Barrier or carrier? Pulmonary surfactant and drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 sept 2015;95:117-27.
- Hiemstra PS, Grootaers G, van der Does AM, Krul CAM, Kooter IM. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol In Vitro*. 1 mars 2018;47:137-46.
- Hirota K, Terada H. Chapter 5 - Particle-manufacturing technology-based inhalation therapy for pulmonary diseases. In: Ohshima H, Makino K, éditeurs. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2014 [cité 22 juin 2020]. p. 103-19. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626141000053>
- Hittinger M, Schneider-Daum N, Lehr C-M. Cell and tissue-based in vitro models for improving the development of oral inhalation drug products. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 sept 2017;118:73-8.
- Ho D-K, Nichols BLB, Edgar KJ, Murgia X, Loretz B, Lehr C-M. Challenges and strategies in drug delivery systems for treatment of pulmonary infections. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 nov 2019;144:110-24.
- Hodson ME. Aerosolized Dornase Alfa (rhDNase) for Therapy of Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 mars 1995;151(3_pt_2):S70-4.
- Hofmann W. Modeling Techniques for Inhaled Particle Deposition: The State of the Art. *J Aerosol Med*. 1 janv 1996;9(3):369-88.

- Hughes M, Health JBS of P. The Principles of Humane Experimental Technique: Preface [Internet]. Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. 2019 [cité 17 avr 2019]. Disponible sur: http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/addendum
- Hureauux J. Paclitaxel-loaded lipid nanocapsules and lung cancer: first data of efficacy and toxicity in mice and nebulisation studies by using preclinical batches [Internet] [Theses]. Université d'Angers; 2009 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00492820>
- ICRP. Human Respiratory Tract Model for Radiological Protection. Ann ICRP. 1994;24.
- Inserm. Bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) [Internet]. Inserm - La science pour la santé. 2020 [cité 6 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/bronchopneumopathie-chronique-obstructive-bpco>
- Intagliata S, Rizzo A, Gossman WG. Physiology, Lung Dead Space [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2019 [cité 11 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482501/>
- Islam N, Cleary MJ. Developing an efficient and reliable dry powder inhaler for pulmonary drug delivery – A review for multidisciplinary researchers. Med Eng Phys. 1 mai 2012;34(4):409-27.
- ISO. NF EN ISO 27427 - Septembre 2019 [Internet]. 2019 [cité 18 juin 2020]. Disponible sur: <https://www.boutique.afnor.org/norme/nf-en-iso-27427/materiel-d-anesthesie-et-de-reanimation-respiratoire-systemes-de-nebulisation-et-ses-composants/article/934555/fa196428>
- Jaafar-Maalej C, Andrieu V, Elaissari A, Fessi H. Assessment methods of inhaled aerosols: technical aspects and applications. Expert Opin Drug Deliv. 1 sept 2009;6(9):941-59.
- Janssens HM, de Jongste JC, Fokkens WJ, Robben SGF, Wouters K, Tiddens HAWM. The Sophia Anatomical Infant Nose-Throat (Saint) Model: A Valuable Tool to Study Aerosol Deposition in Infants. J Aerosol Med. 1 déc 2001;14(4):433-41.
- Kaminsky DA. The Netter Collection of Medical Illustrations - Respiratory System. 2nd edition. Saunders; 2011. (Netter Green Book Collection; vol. 3).
- Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 14th edition. A&L Lange; 2017.
- Kettler K, Veltman K, Meent D van de, Wezel A van, Hendriks AJ. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. Environ Toxicol Chem. 2014;33(3):481-92.
- Kim CS. Methods of calculating lung delivery and deposition of aerosol particles. Respir Care. juin 2000;45(6):695-711.
- Koullapis P, Kassinos SC, Muela J, Perez-Segarra C, Rigola J, Lehmkuhl O, et al. Regional aerosol deposition in the human airways: The SimInhale benchmark case and a critical assessment of in silico methods. Eur J Pharm Sci. 15 févr 2018;113:77-94.
- Kourmatzis A, Cheng S, Chan H-K. Airway geometry, airway flow, and particle measurement methods: implications on pulmonary drug delivery. Expert Opin Drug Deliv. 4 mars 2018;15(3):271-82.

- Koval M, Sidhaye VK. Introduction: The Lung Epithelium. In: Sidhaye VK, Koval M, éditeurs. Lung Epithelial Biology in the Pathogenesis of Pulmonary Disease [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [cité 22 juin 2020]. p. xiii-xviii. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128038093000233>
- Krpetić Ž, Anguissola S, Garry D, Kelly PM, Dawson KA. Nanomaterials: Impact on Cells and Cell Organelles. In: Capco DG, Chen Y, éditeurs. Nanomaterial: Impacts on Cell Biology and Medicine [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014 [cité 10 juill 2020]. p. 135-56. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8739-0_8
- Laube BL. The Expanding Role of Aerosols in Systemic Drug Delivery, Gene Therapy, and Vaccination. *Respir Care*. 1 sept 2005;50(9):1161-76.
- Laube BL. The expanding role of aerosols in systemic drug delivery, gene therapy and vaccination: an update. *Transl Respir Med* [Internet]. 13 janv 2014 [cité 18 juill 2020];2. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4215822/>
- Lavanya MN, Maria Leena M, Moses JA, Anandharamakrishnan C. Nano-aerosols and Its Applications. In: Reference Module in Food Science [Internet]. Elsevier; 2020 [cité 10 juin 2020]. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965230230>
- Lavorini F, Buttini F, Usmani OS. 100 Years of Drug Delivery to the Lungs. In: Barrett JE, Page CP, Michel MC, éditeurs. Concepts and Principles of Pharmacology: 100 Years of the Handbook of Experimental Pharmacology [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cité 6 févr 2020]. p. 143-59. (Handbook of Experimental Pharmacology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/164_2019_335
- Le Guellec S, Le Pennec D, Gatier S, Leclerc L, Cabrera M, Pourchez J, et al. Validation of Anatomical Models to Study Aerosol Deposition in Human Nasal Cavities. *Pharm Res*. 2014;31(1):228-37.
- Leclerc L, Merhie AE, Navarro L, Prévôt N, Durand M, Pourchez J. Impact of acoustic airflow on intrasinus drug deposition: New insights into the vibrating mode and the optimal acoustic frequency to enhance the delivery of nebulized antibiotic. *Int J Pharm*. 15 oct 2015;494(1):227-34.
- Leclerc L, Pourchez J, Aubert G, Leguellec S, Vecellio L, Cottier M, et al. Impact of Airborne Particle Size, Acoustic Airflow and Breathing Pattern on Delivery of Nebulized Antibiotic into the Maxillary Sinuses Using a Realistic Human Nasal Replica. *Pharm Res*. 1 sept 2014a;31(9):2335-43.
- Leclerc L, Pourchez J, Prevot N, Vecellio L, Le Guellec S, Cottier M, et al. Assessing sinus aerosol deposition: Benefits of SPECT–CT imaging. *Int J Pharm*. 28 févr 2014b;462(1):135-41.
- Lee Z, Berridge MS, Finlay WH, Heald DL. Mapping PET-measured triamcinolone acetonide (TAA) aerosol distribution into deposition by airway generation. *Int J Pharm*. 10 avr 2000;199(1):7-16.
- Lee Z, Berridge MS, Nelson AD, Heald DL. The Effect of Scatter and Attenuation on Aerosol Deposition as Determined by Gamma Scintigraphy. *J Aerosol Med*. 1 juin 2001;14(2):167-83.

- Li DK, Treves S, Heyman S, Kirkpatrick JA, Lambrecht RM, Ruth TJ, et al. Krypton-81m: A Better Radiopharmaceutical for Assessment of Regional Lung Function in Children. *Radiology*. 1 mars 1979;130(3):741-7.
- Liang Z, Ni R, Zhou J, Mao S. Recent advances in controlled pulmonary drug delivery. *Drug Discov Today*. 1 mars 2015;20(3):380-9.
- Lizal F, Belka M, Adam J, Jedelsky J, Jicha M. A method for in vitro regional aerosol deposition measurement in a model of the human tracheobronchial tree by the positron emission tomography. *Proc Inst Mech Eng [H]*. 1 oct 2015;229(10):750-7.
- Longest PW, Bass K, Dutta R, Rani V, Thomas ML, El-Achwah A, et al. Use of computational fluid dynamics deposition modeling in respiratory drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. janv 2019;16(1):7-26.
- Lu Q, Girardi C, Zhang M, Bouhemad B, Louchahi K, Petitjean O, et al. Nebulized and intravenous colistin in experimental pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med*. juill 2010;36(7):1147-55.
- Manshadi MKD, Saadat M, Mohammadi M, Kamali R, Shamsi M, Naseh M, et al. Magnetic aerosol drug targeting in lung cancer therapy using permanent magnet. *Drug Deliv*. déc 2019;26(1):120-8.
- Manunta MDI, McAnulty RJ, McDowell A, Jin J, Ridout D, Fleming J, et al. Airway Deposition of Nebulized Gene Delivery Nanocomplexes Monitored by Radioimaging Agents. *Am J Respir Cell Mol Biol*. sept 2013;49(3):471-80.
- Marieb EN, Hoehn KN. *Human Anatomy and Physiology*. 10th edition. Softcover; 2016.
- Marieb EN, Keller SM. *Essentials of Human Anatomy and Physiology*. 12th edition. Softcover; 2017.
- Martin AR, Finlay WH. Nebulizers for drug delivery to the lungs. *Expert Opin Drug Deliv*. 3 juin 2015;12(6):889-900.
- Martin AR, Moore CP, Finlay WH. Models of deposition, pharmacokinetics, and intersubject variability in respiratory drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2 déc 2018;15(12):1175-88.
- Martonen TB. Mathematical Model for the Selective Deposition of Inhaled Pharmaceuticals. *J Pharm Sci*. 1 déc 1993;82(12):1191-9.
- Martonen TB, Musante CJ, Segal RA, Schroeter JD, Hwang D, Dolovich MA, et al. Lung models: strengths and limitations. *Respir Care*. juin 2000;45(6):712-36.
- Mason RJ, Dobbs LG. 8 - Alveolar Epithelium and Pulmonary Surfactant. In: Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, et al., éditeurs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [cité 11 juin 2020]. p. 134-149.e5. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455733835000087>
- Mercer RR, Crapo JD. Chapter 8 - Architecture of the Gas Exchange Region of the Lungs. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 93-104. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000084>

- Moghadam SJ, Navarro L, Leclerc L, Hodin S, Pourchez J. Toward smart Nebulization: Engineering acoustic airflow to penetrate maxillary sinuses in chronic rhinosinusitis. *Int J Pharm.* 30 juill 2018;546(1):188-93.
- Möller W, Meyer G, Scheuch G, Kreyling WG, Bennett WD. Left-to-Right Asymmetry of Aerosol Deposition after Shallow Bolus Inhalation Depends on Lung Ventilation. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* déc 2009;22(4):333-9.
- Montesantos S. Development of improved analysis of radionuclide images of aerosol deposition [Internet] [Ph.D.]. University of Southampton; 2008 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://eprints.soton.ac.uk/66009/>
- Montigaud Y. Drug repurposing and nanomedicines for new therapeutics : through the exemple of acriflavine [Internet] [Theses]. Université Paris-Saclay/Université Paris-Sud; 2019 [cité 18 juill 2020]. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-02895887>
- Morozov VN, Kanev IL. Dry Lung as a Physical Model in Studies of Aerosol Deposition. *Lung.* 1 oct 2015;193(5):799-804.
- Morrow PE. Aerosol Characterization and Deposition. *Am Rev Respir Dis.* 1 déc 1974;110(6P2):88-99.
- Morrow PE. Factors determining hygroscopic aerosol deposition in airways. *Physiol Rev.* 1 avr 1986;66(2):330-76.
- Nadel JA. 10 - Airway Epithelium and Mucous Secretion. In: Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, et al., éditeurs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [cité 11 juin 2020]. p. 157-167.e3. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455733835000105>
- National Center for Replacement, Reduction and Refinement of Animal Research. The 3Rs | NC3Rs [Internet]. 2018 [cité 13 août 2018]. Disponible sur: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>
- National Research Council. Comparative Dosimetry of Radon in Mines and Homes [Internet]. The National Academic Press. 1991 [cité 24 août 2020]. Disponible sur: <https://doi.org/10.17226/1799>
- Netter FH. *Netter's Atlas of Human Anatomy.* 6th edition. Saunders; 2014.
- Newman S, Bennett WD, Biddiscombe M, Devadason SG, Dolovich MB, Fleming J, et al. Standardization of Techniques for Using Planar (2D) Imaging for Aerosol Deposition Assessment of Orally Inhaled Products. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 1 déc 2012;25(S1):S-10.
- Newman SP. Drug delivery to the lungs: challenges and opportunities. *Ther Deliv.* 1 juill 2017;8(8):647-61.
- Newman SP, Agnew JE, Pavia D, Clarke SW. Inhaled aerosols: lung deposition and clinical applications. *Clin Phys Physiol Meas.* févr 1982;3(1):1-20.
- Newman SP, Wilding IR. Imaging techniques for assessing drug delivery in man. *Pharm Sci Technol Today.* 1 mai 1999;2(5):181-9.

- Nickel S, Clerkin CG, Selo MA, Ehrhardt C. Transport mechanisms at the pulmonary mucosa: implications for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 3 mai 2016;13(5):667-90.
- NIH. Regulations & Standards | OACU [Internet]. 2019 [cité 17 avr 2019]. Disponible sur: <https://oacu.oir.nih.gov/regulations-standards>
- Oakes JM, Shadden SC, Grandmont C, Vignon-Clementel IE. Aerosol transport throughout inspiration and expiration in the pulmonary airways. *Int J Numer Methods Biomed Eng.* 2017;33(9):e2847.
- O'Callaghan C, Barry PW. The science of nebulised drug delivery. *Thorax.* avr 1997;52(Suppl 2):S31-44.
- O'Donnell KP, Smyth HDC. Chapter 1 - Macro- and Microstructure of the Airways for Drug Delivery. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 1-19. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_1
- Oh N, Park J-H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *Int J Nanomedicine.* 6 mai 2014;9(Suppl 1):51-63.
- Ohshima H. Chapter 1 - Interaction of colloidal particles. In: Ohshima H, Makino K, éditeurs. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2014 [cité 22 juin 2020]. p. 1-28. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626141000016>
- Olsson B, Bondesson E, Borgström L, Edsbäcker S, Eirefelt S, Ekelund K, et al. Chapter 2 - Pulmonary Drug Metabolism, Clearance, and Absorption. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 21-50. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_2
- O'Riordan TG, Smaldone GC. 11 - Aerosol Deposition and Clearance. In: Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, et al., éditeurs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [cité 11 juin 2020]. p. 168-183.e2. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455733835000117>
- Palange P, Rohde G. *ERS Handbook of Respiratory Medicine.* 2019.
- Paranjpe M, Müller-Goymann CC. Nanoparticle-Mediated Pulmonary Drug Delivery: A Review. *Int J Mol Sci.* avr 2014;15(4):5852-73.
- Peake JL, Pinkerton KE. Chapter 3 - Gross and Subgross Anatomy of Lungs, Pleura, Connective Tissue Septa, Distal Airways, and Structural Units. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 21-31. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000035>
- Perinel S, Forest V, Landraud M, Pourchez J, Girardot F, Riffard S, et al. Deposition pattern of aerosolized Legionella using an ex vivo human-porcine respiratory model. *Int J Hyg Environ Health.* 1 mars 2018;221(2):252-9.
- Perinel S, Leclerc L, Prévôt N, Deville A, Cottier M, Durand M, et al. Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new ex vivo preclinical model. *Respir Res*

- [Internet]. 2016 [cité 16 oct 2017];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4937580/>
- Perinel S, Pourchez J, Leclerc L, Avet J, Durand M, Prévôt N, et al. Development of an ex vivo human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Sci Rep* [Internet]. 24 févr 2017 [cité 16 oct 2017];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5324051/>
- Phalen RF, Oldham MJ, Wolff RK. The relevance of animal models for aerosol studies. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 1 mars 2008;21(1):113-24.
- Pinkerton KE, Van Winkle LS, Plopper CG, Smiley-Jewell S, Covarrubias EC, McBride JT. Chapter 4 - Architecture of the Tracheobronchial Tree. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 33-51. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000047>
- Pleasant RA, Hess DR. Aerosol Delivery Devices for Obstructive Lung Diseases. *Respir Care*. 1 juin 2018;63(6):708-33.
- Plopper CG, Hyde DM. Chapter 7 - Epithelial Cells of the Bronchiole. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 83-92. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000072>
- Pourchez J, Leclerc L, Girardot F, Riffard S, Prevot N, Allegra S. Experimental human-like model to assess the part of viable *Legionella* reaching the thoracic region after nebulization. *PLoS ONE* [Internet]. 5 oct 2017a [cité 18 juin 2020];12(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5628919/>
- Pourchez J, de Oliveira F, Perinel-Ragey S, Basset T, Vergnon J-M, Prévôt N. Assessment of new-generation high-power electronic nicotine delivery system as thermal aerosol generation device for inhaled bronchodilators. *Int J Pharm*. 25 févr 2017b;518(1):264-9.
- Pourchez J, Parisse S, Sarry G, Perinel-Ragey S, Vergnon J-M, Clotagatide A, et al. Impact of power level and refill liquid composition on the aerosol output and particle size distribution generated by a new-generation e-cigarette device. *Aerosol Sci Technol*. 3 avr 2018;52(4):359-69.
- Powell FL, Wagner PD, West JB. 4 - Ventilation, Blood Flow, and Gas Exchange. In: Broaddus VC, Mason RJ, Ernst JD, King TE, Lazarus SC, Murray JF, et al., éditeurs. *Murray and Nadel's Textbook of Respiratory Medicine (Sixth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2016 [cité 11 juin 2020]. p. 44-75.e3. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978145573383500004X>
- Prévôt N, Oliveira F de, Perinel-Ragey S, Basset T, Vergnon J-M, Pourchez J. Nicotine delivery from the refill liquid to the aerosol via high-power e-cigarette device. *Sci Rep*. 1 juin 2017;7(1):2592.
- Price DN, Stromberg LR, Kunda NK, Muttill P. In Vivo Pulmonary Delivery and Magnetic-Targeting of Dry Powder Nano-in-Microparticles. *Mol Pharm*. 4 déc 2017;14(12):4741-50.
- Rajapaksa AE. Advances in pulmonary drug delivery via high frequency acoustic nebulization [Internet] [Thesis]. *Mechanical and Aerospace Engineering*; 2013 [cité 22 juin 2020]. Disponible sur: <https://trove.nla.gov.au/version/200124185>

- Rangaraj N, Pailla SR, Sampathi S. Insight into pulmonary drug delivery: Mechanism of drug deposition to device characterization and regulatory requirements. *Pulm Pharmacol Ther.* 1 févr 2019;54:1-21.
- Rau JL. Practical Problems With Aerosol Therapy in COPD. *Respir Care.* 1 févr 2006;51(2):158-72.
- Reece WO. *Dukes' Physiology of Domestic Animals.* John Wiley & Sons; 2015.
- Resnier P, Mottais A, Sibiril Y, Montier TLG and T. Challenges and Successes Using Nanomedicines for Aerosol Delivery to the Airways [Internet]. *Current Gene Therapy.* 2016 [cité 6 févr 2020]. Disponible sur: <http://www.eurekaselect.com/138266/article>
- Reychler G, Miguel-Pagola MS, Aubriot A-S, Herrero-Cortina B, Lecocq V, Hesse M, et al. Targeted Lung Deposition From Nebulization Is Not Improved in the Lateral Decubitus Position in Healthy Volunteers. *Respir Care.* 1 déc 2019;64(12):1537-44.
- Reynolds SD, Pinkerton KE, Mariassy AT. Chapter 6 - Epithelial Cells of Trachea and Bronchi. In: Parent RA, éditeur. *Comparative Biology of the Normal Lung (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2015 [cité 23 juin 2020]. p. 61-81. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124045774000060>
- Rissler J, Gudmundsson A, Nicklasson H, Swietlicki E, Wollmer P, Löndahl J. Deposition efficiency of inhaled particles (15-5000 nm) related to breathing pattern and lung function: an experimental study in healthy children and adults. *Part Fibre Toxicol* [Internet]. 8 avr 2017 [cité 4 mars 2019];14. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5385003/>
- da Rocha SRP, Bharatwaj B, Saiprasad S. Chapter 8 - Science and Technology of Pressurized Metered-Dose Inhalers. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 165-201. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_8
- Rogers L, Reibman J. Pharmacologic approaches to life-threatening asthma. *Ther Adv Respir Dis.* 1 déc 2011;5(6):397-408.
- Rubin BK. Other medications for aerosol delivery. *Paediatr Respir Rev.* 1 janv 2006;7:S76-9.
- Rubin BK. Air and Soul: The Science and Application of Aerosol Therapy. *Respir Care.* 1 juill 2010;55(7):911-21.
- Rubin BK, Fink JB. Aerosol therapy for children. *Respir Care Clin N Am.* juin 2001;7(2):175-213, v.
- Ruge CA, Kirch J, Lehr C-M. Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers—therapeutic possibilities and technological challenges. *Lancet Respir Med.* 1 juill 2013;1(5):402-13.
- Sakagami M, Gumbleton M. Chapter 6 - Targeted Drug Delivery Through the Respiratory System: Molecular Control on Lung Absorption and Disposition. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 127-41. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_6

- Salomon JJ. Drug transport across the human respiratory epithelial barrier [Doctoral thesis]. Trinity College (Dublin, Ireland). School of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences; 2012.
- Sanders M. Chapter 3 - Pulmonary Drug Delivery: An Historical Overview. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 51-73. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_3
- Sanjar S, Matthews J. Treating Systemic Diseases via the Lung. *J Aerosol Med.* 1 févr 2001;14(supplement 1):51-8.
- Scherließ R. Future of nanomedicines for treating respiratory diseases. *Expert Opin Drug Deliv.* 2 janv 2019;16(1):59-68.
- Scheuch G, Bennett W, Borgström L, Clark A, Dalby R, Dolovich M, et al. Deposition, Imaging, and Clearance: What Remains to be Done? *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 1 déc 2010;23(S2):S-39.
- Seeger W, Walmrath D, Grimminger F, Rosseau S, Schütte H, Krämer HJ, et al. Adult respiratory distress syndrome: model systems using isolated perfused rabbit lungs. *Methods Enzymol.* 1994;233:549-84.
- Shah S, Fung K, Brim S, Rubin BK. An in vitro evaluation of the effectiveness of endotracheal suction catheters. *Chest.* nov 2005;128(5):3699-704.
- Sheth P, Myrdal PB. Chapter 11 - Excipients Utilized for Modifying Pulmonary Drug Release. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011a [cité 6 juill 2020]. p. 237-63. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_11
- Sheth P, Myrdal PB. Chapter 12 - Polymers for Pulmonary Drug Delivery. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011b [cité 6 juill 2020]. p. 265-82. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_12
- Sibum I, Hagedoorn P, de Boer AH, Frijlink HW, Grasmeijer F. Challenges for pulmonary delivery of high powder doses. *Int J Pharm.* 5 sept 2018;548(1):325-36.
- Smaldone GC. Aerosolized Antibiotics in Mechanically Ventilated Patients. *Respir Care.* 1 juin 2004;49(6):635-9.
- Snell NJC, Ganderton D. Assessing lung deposition of inhaled medications: Consensus statement from a workshop of the British Association for Lung Research, held at the Institute of Biology, London, U.K. on 17 April 1998. *Respir Med.* 1 févr 1999;93(2):123-33.
- Son Y-J, Mitchell JP, McConville JT. Chapter 17 - In Vitro Performance Testing for Pulmonary Drug Delivery. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 383-415. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_17
- de Souza Carvalho C, Daum N, Lehr C-M. Carrier interactions with the biological barriers of the lung: Advanced in vitro models and challenges for pulmonary drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 30 août 2014;75:129-40.

- Spahija JA, Grassino A. Effects of pursed-lips breathing and expiratory resistive loading in healthy subjects. *J Appl Physiol*. 1 mai 1996;80(5):1772-84.
- Stavngaard T, Mortensen J. Assessment of ventilation inhomogeneity with Krypton SPECT and planar imaging. *Clin Physiol Funct Imaging*. 1 mars 2005;25(2):106-12.
- Stein SW, Thiel CG. The History of Therapeutic Aerosols: A Chronological Review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 1 févr 2017;30(1):20-41.
- Stuart BO. Deposition and clearance of inhaled particles. *Environ Health Perspect*. avr 1984;55:369-90.
- Sweeney TD, Brain JD. Pulmonary Deposition: Determinants and Measurement Techniques. *Toxicol Pathol*. 1 nov 1991;19(4_part_1):384-97.
- Tadros T. Chapter 2 - Colloid and interface aspects of pharmaceutical science. In: Ohshima H, Makino K, éditeurs. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* [Internet]. Amsterdam: Elsevier; 2014 [cité 22 juin 2020]. p. 29-54. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626141000028>
- Thompson RB, Finlay WH. Using MRI to Measure Aerosol Deposition. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 30 mars 2012;25(2):55-62.
- Tronde A. Pulmonary Drug Absorption : In vitro and in vivo investigations of drug absorption across the lung barrier and its relation to drug physicochemical properties [text.thesis.doctoral]. Uppsala University, Sweden; 2002.
- Upadhyay S, Palmberg L. Air-Liquid Interface: Relevant In Vitro Models for Investigating Air Pollutant-Induced Pulmonary Toxicity. *Toxicol Sci*. 1 juill 2018;164(1):21-30.
- Vassilakopoulos T. Chapter 6 - Control of Ventilation and Respiratory Muscles. In: Spiro SG, Silvestri GA, Agustí A, éditeurs. *Clinical Respiratory Medicine (Fourth Edition)* [Internet]. Philadelphia: W.B. Saunders; 2012 [cité 22 juin 2020]. p. 50-62. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781455707928000064>
- Venegas J, Winkler T, Harris RS. Lung Physiology and Aerosol Deposition Imaged with Positron Emission Tomography. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2 août 2012;26(1):1-8.
- Verbanck S, Ghorbaniasl G, Biddiscombe MF, Dragojlovic D, Ricks N, Lacor C, et al. Inhaled Aerosol Distribution in Human Airways: A Scintigraphy-Guided Study in a 3D Printed Model. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 23 juin 2016;29(6):525-33.
- Vulović A, Šušteršič T, Cvijić S, Ibrić S, Filipović N. Coupled in silico platform: Computational fluid dynamics (CFD) and physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modelling. *Eur J Pharm Sci*. 15 févr 2018;113:171-84.
- Waller DG, Sampson AP. 1 - Principles of pharmacology and mechanisms of drug action. In: Waller DG, Sampson AP, éditeurs. *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)* [Internet]. Elsevier; 2018a [cité 22 juin 2020]. p. 3-31. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702071676000014>
- Waller DG, Sampson AP. 2 - Pharmacokinetics. In: Waller DG, Sampson AP, éditeurs. *Medical Pharmacology and Therapeutics (Fifth Edition)* [Internet]. Elsevier; 2018b [cité 22 juin 2020]. p. 33-62. Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702071676000026>

- Wallin M, Tagami T, Chen L, Yang M, Chan H-K. Pulmonary drug delivery to older people. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 oct 2018;135:50-61.
- West JB, Luks AM. *West's Respiratory Physiology* [Internet]. 10th edition. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2015 [cité 24 juin 2020]. Disponible sur: <https://shop.lww.com/West-s-Respiratory-Physiology/p/9781496310118>
- West JB, Luks AM. *West's Pulmonary Pathophysiology* [Internet]. 9th edition. Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2017 [cité 24 juin 2020]. Disponible sur: <https://shop.lww.com/West-s-Pulmonary-Pathophysiology/p/9781496339447>
- Whalen K. *Pharmacology*. 6th edition. LWW; 2014. (Lippincott Illustrated Reviews Series).
- Xu Z, Hickey AJ. Chapter 4 - The Physics of Aerosol Droplet and Particle Generation from Inhalers. In: Smyth HDC, Hickey AJ, éditeurs. *Controlled Pulmonary Drug Delivery* [Internet]. New York, NY: Springer; 2011 [cité 6 juill 2020]. p. 75-100. (Advances in Delivery Science and Technology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9745-6_4
- Yang MY, Chan JGY, Chan H-K. Pulmonary drug delivery by powder aerosols. *J Controlled Release.* 10 nov 2014;193:228-40.
- Yeh H-C, Schum GM. Models of human lung airways and their application to inhaled particle deposition. *Bull Math Biol.* 1 janv 1980;42(3):461-80.
- Zhang S, Gao H, Bao G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano.* 22 sept 2015;9(9):8655-71.
- Zhao F, Zhao Y, Liu Y, Chang X, Chen C, Zhao Y. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials. *Small.* 2011;7(10):1322-37.

Rappels pharmacologiques (suite)

1. Absorption

Pour toutes les voies d'administration, exception faite de la voie intraveineuse où elle est immédiate, l'absorption débute dès que le PA est mis en contact avec les cellules. Elle est médiée par 4 mécanismes principaux : diffusion passive, transport facilité, transport actif et par transcytose (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**) (Figure 58).

La diffusion passive d'un PA est fonction de sa taille et de sa lipophilie. En effet, les molécules simples et les gaz sont à même de traverser les jonctions serrées entre les cellules et de diffuser de la lumière d'un organe vers son interstitium, ou inversement. Les molécules lipophiles, elles, diffusent à travers la double couche lipidique cellulaire et sont, ensuite, prises en charge par le trafic intracellulaire. Cette diffusion passive est gouvernée par la loi de Fick qui tient compte de la concentration de part et d'autre du tapis cellulaire, de sa surface et de son épaisseur, ainsi que d'un coefficient de perméabilité propre à chaque PA. (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**) (Équation 17).

Équation 17 - Loi de Fick de la diffusion transmembranaire, d'après (Katzung 2017).

$$Flux = (C_{lumière} - C_{interstitium}) \times \frac{Surface \times Perméabilité}{Épaisseur}$$

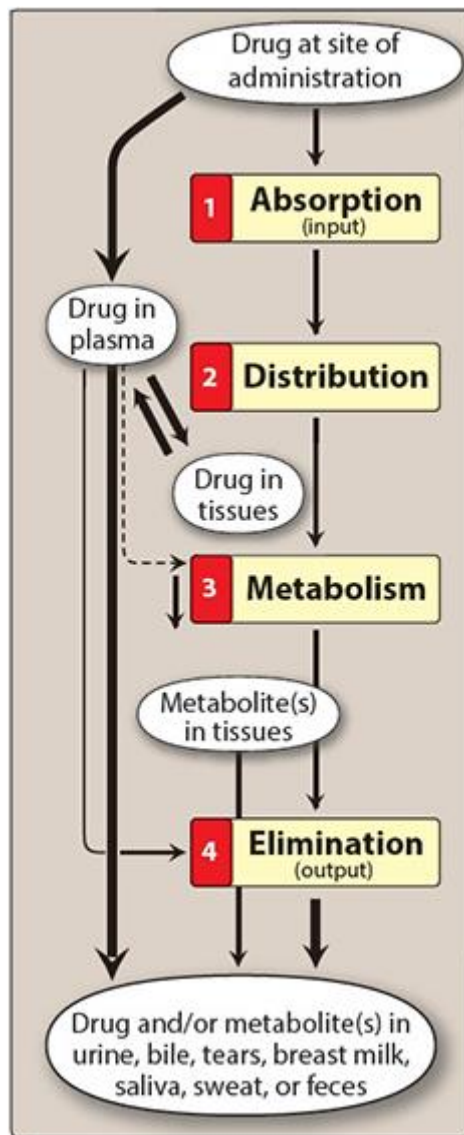


Figure 57 - Devenir pharmacologique d'un PA dans l'organisme, d'après (Whalen 2014).

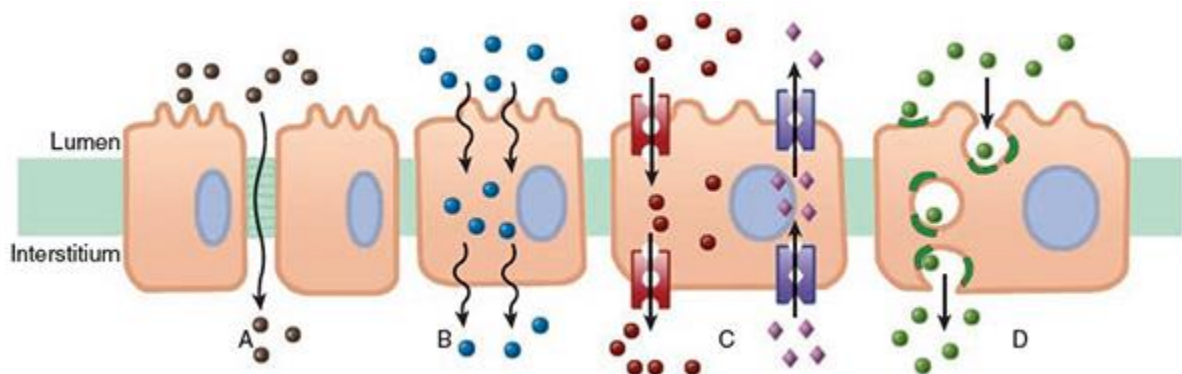


Figure 58 - Représentation schématique des mécanismes d'absorption d'un PA, d'après (Katzung 2017). A : diffusion passive paracellulaire. B : diffusion passive transcellulaire. C : transport transcellulaire médié par un transporteur. D : transport transcellulaire médié par un mécanisme d'endocytose.

Il est important de noter que dans le cas PA lipophiles, la balance hydrophile-lipophile du composé influe sur la diffusion : une molécule très lipophile diffusera plus facilement qu'une molécule de lipophilie moindre. Dans le cas des acides et des bases faibles, l'état d'ionisation de la molécule influe sur la diffusion en fonction du pK_A du PA et du pH local, selon la relation d'Henderson-Hasselbach (Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b) (Figure 59).

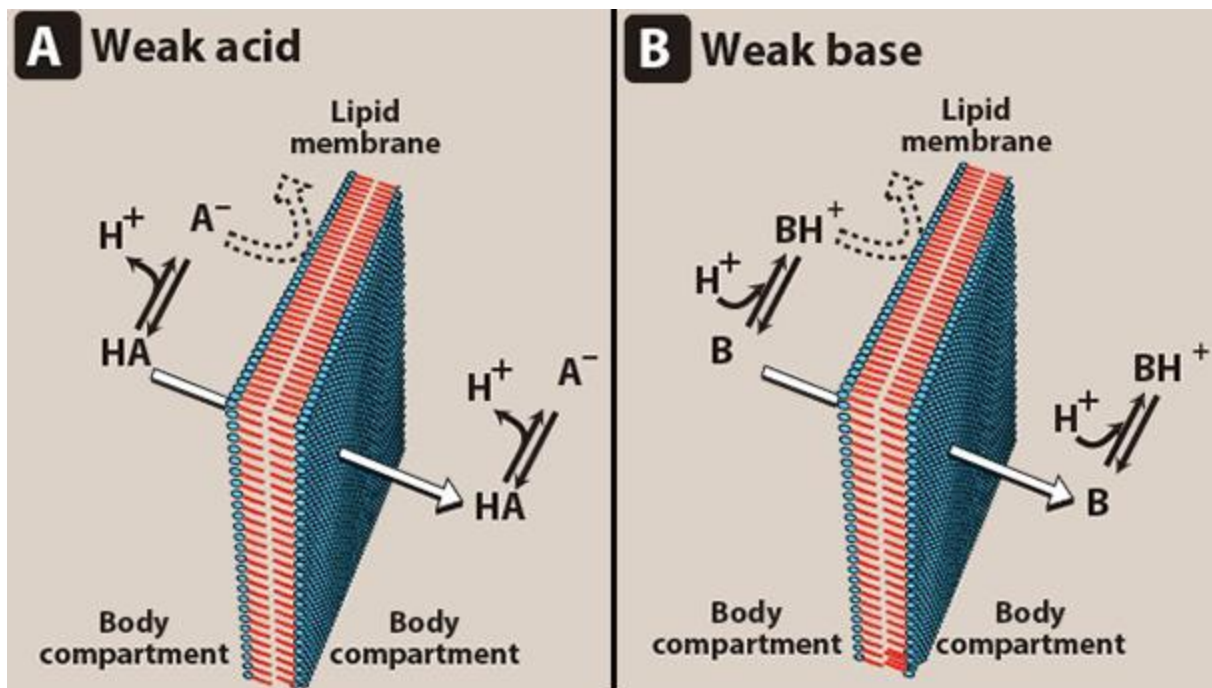


Figure 59 - Illustration de la diffusion passive pour les acides et bases faibles, d'après (Whalen 2014).

La diffusion passive peut aussi se faire par passage à travers les pores membranaires ou les canaux ioniques. Ce type de diffusion ne concerne que les molécules solubles dans l'eau dont le poids moléculaire est strictement inférieur à 100 Da, ainsi les ions sont les espèces majoritaires pouvant suivre ce type de voie de diffusion (Waller et Sampson 2018b).

Pour les molécules de poids moléculaire trop important ou pour celles dont la lipophilie est faible, le passage transmembranaire est médié par un transporteur. Ce phénomène peut être facilité ou actif.

Dans le premier cas, un transporteur transmembranaire prend en charge la molécule soit dans le sens de son gradient de concentration (*i.e.* de manière passive), soit dans le sens contraire du gradient en utilisant le gradient électro-chimique d'un transporteur secondaire. Ce mode

de transport ne nécessite pas d'utilisation d'énergie, sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**). Ce phénomène est, principalement médié par une superfamille de transporteurs, les « solute carriers » (SLC), parmi lesquels 4 grandes familles de transporteurs : les « organic anion transporters » (OAT), les « organic anion-transporting polypeptides » (OATP), les « organic cation transporters » (OCT) et les « organic cation/carnitine transporters » (OCTN) (**Tronde 2002; Groneberg et al. 2006; Olsson et al. 2011; Salomon 2012; Nickel et al. 2016; Waller et Sampson 2018b**) (Tableau 16).

Dans le cas des transporteurs actifs, l'utilisation d'énergie, sous forme d'ATP, est nécessaire pour transporter le PA contre son gradient de concentration. Ce phénomène est médié par une superfamille de transporteurs non-spécifiques, es ATP binding cassettes (ABC), qui compte 49 membres actuellement identifiés. On retrouve, notamment, une famille extrêmement importante en pharmacologie et exprimée de manière ubiquitaire dans l'organisme, la P-glycoprotéine, qui est une pompe d'efflux. Elle est responsable du transport de nombreux PA du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire luminal et est, ainsi, responsable de l'excrétion des PA (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**).

Différents points importants doivent être notés concernant les transporteurs. Premièrement, le transport net généré peut se faire selon deux sens : intracellulaire vers extracellulaire et inversement. De ce fait, ils peuvent être générateurs d'influx ou d'efflux de part et d'autre d'une membrane et, ainsi, affectent l'absorption des PA. Deuxièmement, lors de l'administration de plusieurs PA, des phénomènes de compétitivité peuvent être observés au niveau d'un ou plusieurs transporteurs, ce qui induit des modifications de la pharmacocinétique des médicaments et peut être à l'origine d'effets secondaires ou de délais dans l'absorption des PA. Finalement, il existe des variations inter-individuelles d'expression ou de fonctionnement des transporteurs qui peuvent, elles aussi, être à l'origine de modifications de la pharmacocinétique ou de toxicité des PA (**Tronde 2002; Groneberg et al. 2006; Salomon 2012; Nickel et al. 2016; Waller et Sampson 2018b**).

Tableau 16 - Exemple de transporteurs retrouvés dans l'appareil respiratoire, d'après (Waller et Sampson 2018b). P-gp : P-glycoprotéine. MRP : « multi-resistant protein ». BCRP : « Breast cancer resistant protein ». OAT : « organic anion transporters ». OCT : « organic cation transporters ».

Superfamille	Famille	Substrats	Localisation
---------------------	----------------	------------------	---------------------

<i>ABC</i>	P-gp (MDR1)	PA hydrophobes cationiques, dont dans anticancéreux	Face apicale des cellules épithéliales
	MRP1	Nombreux dont les anticancéreux	Face basolatérale de la plupart des cellules
	BCRP	Anticancéreux, antiviraux, antibiotiques antibactériens, flavonoïdes	Face apicale des cellules épithéliales
<i>SLC</i>	OAT1	PA anioniques	Cellules musculaires lisses
	OAT3	PA anioniques	Cellules musculaires lisses
	OCT3	PA cationiques	Cellules musculaires lisses et cellules pulmonaires

Enfin, un dernier mécanisme de transport existe pour les PA de taille importante comme les nanoparticules : la transcytose. Ce mécanisme est ubiquitaire dans les différents types cellulaires de l'organisme. Il fait intervenir différents phénomènes, non mutuellement exclusif, dont l'un ou plusieurs peuvent être prépondérant en fonction des caractéristiques physico-chimiques du PA, de la micro- ou nanoparticule concerné, particulièrement en fonction de sa taille, de sa forme tridimensionnelle, de sa charge de surface ou encore de son hydrophobicité (**Adjei et al. 2014; Kettler et al. 2014; Whalen 2014; Behzadi et al. 2017; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**) (Figure 60). Bien que de grandes avancées sur les phénomènes de transcytose aient été réalisées dans les dernières décennies, la complète mécanistique reste encore inconnue. Elle se décompose en endocytose et exocytose. La présentation des phénomènes d'endocytose sera, de fait, simplifiée pour en exprimer les concepts sous-jacents (**Adjei et al. 2014; Kettler et al. 2014; Oh et Park 2014; Whalen 2014; Zhang et al. 2015; Behzadi et al. 2017; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**) (Figure 61) :

Phagocytose : Ce phénomène est particulièrement présent dans les cellules immunitaires responsables de la présentation des antigènes, les cellules du système réticulo-endothélial (RES). La phagocytose débute par la reconnaissance d'antigènes (ou de la couronne protéique des micro- ou nanoparticules). La cellule forme des extensions membranaires qui ont pour rôle d'enclaver le PA/la nanoparticule dans une

vésicule, appelée phagosome, qui peut mesurer jusqu'à plusieurs micromètres de diamètre. Le processus complet de phagocytose peut durer jusqu'à plusieurs heures.

Macropinocytose : Il s'agit d'un phénomène cellulaire par lequel la cellule crée une large extension membranaire, qui permet l'internalisation de large vésicules dont la taille varie de 0,2 à 5 μm . La macropinocytose serait particulièrement utilisée pour permettre la captation de milieu interstitiel/extracellulaire, afin de fournir à la cellule des facteurs de croissances ou de large quantité d'ions et molécules de base. Ce phénomène reste, cependant, très peu élucidé.

Endocytose médiée par les cavéolines : Les cavéolines sont des protéines membranes présentes sur la face interne des régions riches en cytosquelette. Lors de la reconnaissance cellulaire par un récepteur spécifique, la paroi cellulaire forme une invagination en forme de flasque. Ce phénomène permet la formation, *in fine*, de vésicules de taille comprise entre 50 et 80 nm. Les cavéolines sont particulièrement présentes dans les adipocytes ou les cellules musculaires lisses.

Endocytose médiée par les clathrines : À l'instar des cavéolines, les clathrines sont des protéines membranaires de la face interne de la paroi cellulaire. Leur densité est variable, avec des zones de très forte concentration de ces protéines qui peuvent représenter jusqu'à 2% de la membrane. Lors de la reconnaissance membranaire, il y a polymérisation spontanée des clathrines pour l'induction et la stabilisation d'une invagination membranaire. La forme des clathrines, un triskélium, est à l'origine de la création d'une véritable cage autour de la substance internalisée. Lorsque le processus est complété, les clathrines sont libérées de la vésicule et sont ré-adressées à la membrane cellulaire.

Endocytose indépendante des clathrines et cavéolines : Ce phénomène est encore peu élucidé. Il mène à la formation de vésicules allant jusqu'à 50 nm de diamètre, souvent moins, et peut-être ou non médié par un récepteur.

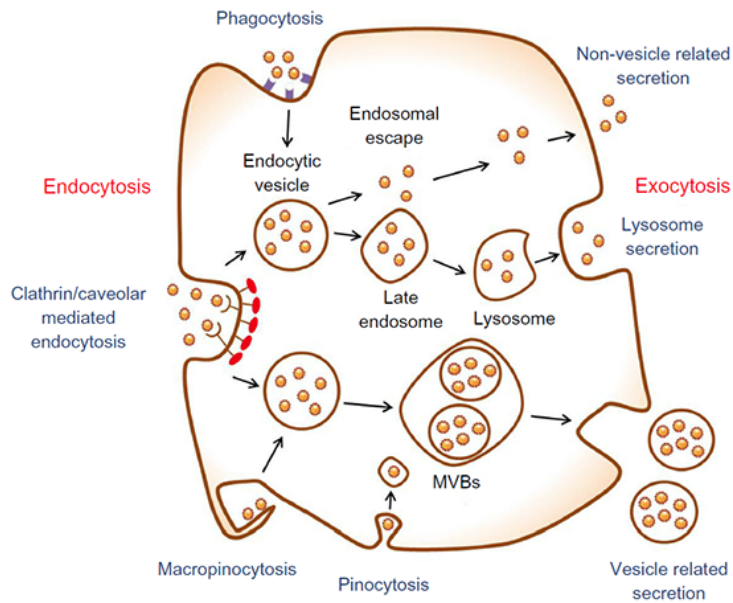


Figure 60 - Représentation schématique des différents phénomènes présents dans le mécanisme de transcytose, d'après (Oh et Park 2014).

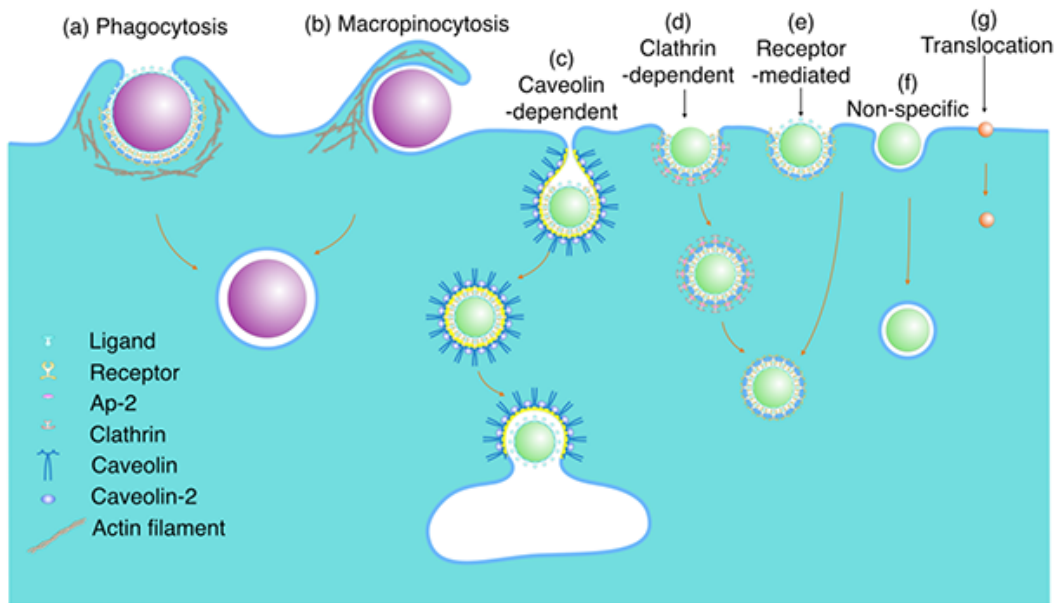


Figure 61 - Représentation schématique de grands phénomènes d'endocytose, d'après (Zhang et al. 2015).

Tous les mécanismes d'endocytose mènent à la formation de vésicules, qui nécessitent un adressage intracellulaire, afin de rejoindre les différentes organelles de la cellule ou la face basolatérale des cellules pour y être exocytées, le PA étant alors disponible au niveau sanguin (Zhao et al. 2011; Adjei et al. 2014; Kettler et al. 2014; Krpetić et al. 2014; Oh et Park 2014; Whalen 2014; Zhang et al. 2015; Behzadi et al. 2017; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b) (Figure 60).

La qualité de l'absorption d'un PA peut être quantifiée par le calcul de la biodisponibilité. Elle correspond à la quantité de PA atteignant le compartiment sanguin, sous sa forme initiale (*i.e.* forme non métabolisée). La biodisponibilité des PA est variable selon les voies d'administration (**Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**) (Tableau 17).

Tableau 17 – Biodisponibilité théorique des PA en fonction de la voie d'administration, d'après (Katzung 2017).

Voie d'administration	Biodisponibilité (%)	Caractéristiques
IV	100 (voie de référence)	Instantanée et totale
IM	75 à 100	Larges volumes
SC	75 à 100	Larges volumes
Orale	5 à 100	Plus aisée
Rectale	30 à 100	Nécessite un placement correct de la forme galénique
Inhalée	5 à 100	Quasi-instantanée
Transdermique	80 à 100	Très lente

La voie inhalée semble être une voie particulièrement intéressante, car elle possède les bonnes caractéristiques pour une absorption de bonne qualité : une large surface d'absorption, un territoire vasculaire vaste et bien drainé, ainsi qu'une barrière alvéolo-capillaire fine. Toutefois, on observe peu d'effets systémiques, ce qui a conduit au développement de cette voie d'administration pour des traitements locaux dans les pathologies pulmonaires. Une des explications potentielles pour le manque d'effet systémique observé lors de l'utilisation de la voie inhalée pulmonaire serait la présence des nombreux transporteurs d'efflux dans la barrière alvéolo-capillaire, limitant de manière très importante l'absorption systémique des PA. (**Tronde 2002; Groneberg et al. 2006; Salomon 2012; Waller et Sampson 2018b**). De fait, des adaptations des formes galéniques sont nécessaires pour délivrer les PA sous forme d'un aérosol dont la taille des gouttelettes permet, de manière plus ou moins précise, de cibler les zones de dépôt. On considère que les gouttelettes d'un diamètre supérieur à 10 µm ne passent pas les voies aériennes supérieures. Pour des dépôts pulmonaires centraux au niveau de la carène et des bronches souches, on considère que des tailles comprises entre 5

et 10 µm sont optimales, tandis que pour le ciblage des zones pulmonaires profondes des tailles entre 2 et 5 µm sont optimales (**Waller et Sampson 2018b**). Cependant, il convient de noter que malgré des tailles optimales identifiées, seule une faible fraction de la dose nébulisée (*i.e.* dose ayant réellement quittée le nébuliseur), entre 5 et 30%, se dépose dans les alvéoles et petites voies aériennes (**Waller et Sampson 2018b**).

Outre les difficultés et défis associés au dépôt d'un PA dans les alvéoles pulmonaires, dans le cas des poumons, il est nécessaire de prendre en compte la couche de mucus existante dans les voies aériennes, ainsi que la couche de surfactant présente dans les alvéoles. Le mucus est une sécrétion visqueuse composée à 95% d'eau. Il contient une famille de protéines, les mucines, dont le pouvoir tensioactif fait du mucus un gel viscoélastique. Il est produit par les glandes submuqueuses dans les voies aériennes de conduction et par les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire. On retrouve deux familles de mucines majoritaires dans l'appareil respiratoire sain : la famille MUC5AC sécrétées par les cellules caliciformes et la famille MUC5B produites par les glandes submuqueuses. Le mucus contient aussi d'autres protéines (enzymes, peptides antimicrobiens, immunoglobuline, albumine), en proportions variables, qui ont pour rôle d'assurer la protection de l'épithélium respiratoire (**El-Sherbiny et al. 2011; Olsson et al. 2011; Nadel 2016**).

Une fois sécrété, le mucus s'organise en deux couches : une couche dense et très visqueuse au contact de l'épithélium respiratoire – la phase sol – et une couche plus fluide au-dessus – la phase gel. C'est cette dernière qui est rapidement transportée jusqu'au carrefour aéro-digestif par l'ascenseur muco-ciliaire avec une vitesse croissante entre les parties distales et centrales des poumons (de 1 mm/min dans les petites voies aériennes à 20 mm/min dans la trachée). Ainsi, lors du dépôt d'une particule ou d'un PA dans les voies aériennes, il est nécessaire, pour l'absorption, de réussir à franchir cette barrière. Il convient de noter que le franchissement du mucus est très dépendant de sa composition et de son épaisseur, qui varie en fonction de l'état physiologique ou pathologique du patient (**El-Sherbiny et al. 2011; Olsson et al. 2011; Nadel 2016**).

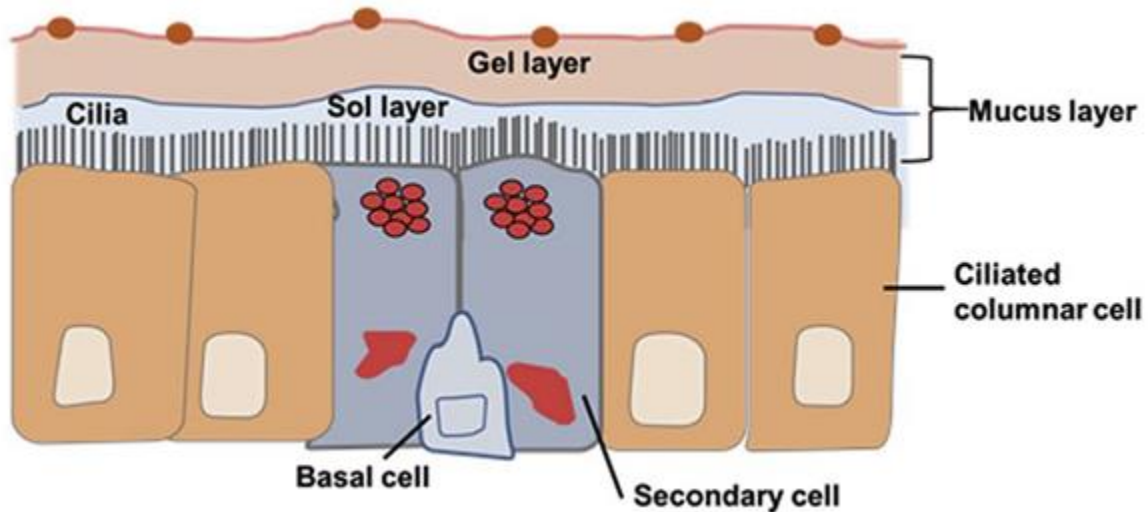


Figure 62 - Représentation schématique de la couche muqueuse sur l'épithélium respiratoire, d'après (Lavanya et al. 2020).

2. Distribution

Une fois le PA absorbée, il atteint le compartiment sanguin qui permet son transport dans l'organisme. La distribution correspond aux mécanismes par lequel le PA passe, de manière réversible ou non, du compartiment sanguin aux compartiments interstitiels. Ce phénomène dépend de plusieurs paramètres propres aux organes ou à la physico-chimie du PA (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**) :

La perfusion vasculaire de l'organe est un point-clé pour la distribution. En effet, plus celle-ci est importante, plus l'organe sera exposé au PA (Tableau 18). Dans le cas des poumons, de par leur fonction, la perfusion vasculaire est la plus importante de l'organisme. C'est pourquoi, si un PA est absorbé, sa distribution sera rapide et importante. Ce qui fait de la voie inhalée, une voie d'abord intéressante pour la délivrance systémique.

La perméabilité capillaire est déterminée par la structure locale des territoire capillaires de l'organe, ainsi que par la physico-chimie du PA. La diffusion transmembranaire et la transcytose capillaire sont régies par les mêmes règles que les processus que ceux décrits pour l'absorption (Figure 63).

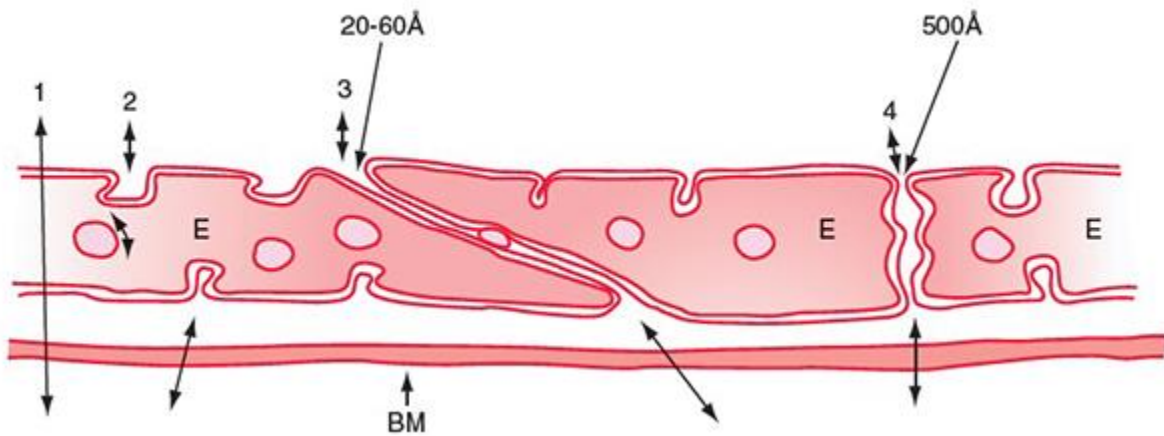
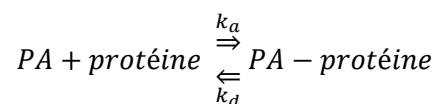


Figure 63 - Représentation schématique de la structure cellulaire de l'endothélium capillaire, d'après (Garcia 2016). 1 : Diffusion transcellulaire. 2 : transcytose. 3 : Diffusion à travers les pores. 4 : Diffusion par les fenestrations capillaires. BM : membrane basale. E : cellules endothéliales. La taille des pores et des fenestrations sont dépendantes de la microstructure locale des capillaires.

La liaison aux protéines, plasmatiques ou tissulaires, est un phénomène réversible gouverné par la physico-chimie du PA, qui détermine l'affinité aux protéines. Dans le compartiment sanguin, c'est l'albumine qui est la protéine majoritaire. Lorsqu'il est lié à une protéine, le PA n'est plus directement disponible mais devient un réservoir. En effet, lorsque la concentration en fraction libre du PA diminue, ce dernier est graduellement relargué par la protéine. La cinétique de libération peut être appréciée par la constante de dissociation (Équation 18).

Équation 18 - Cinétique d'association et de dissociation d'un PA et d'une protéine, d'après (Waller et Sampson 2018b). k_a : constante d'association. k_d : constante de dissociation.



La distribution d'un PA dans l'organisme peut être quantifiée par le calcul du volume de distribution apparent, qui correspond au volume théorique nécessaire pour obtenir une concentration en PA égale à la concentration mesurée dans le compartiment sanguin (Équation 19). Pour certains PA, le volume de distribution apparent peut être bien supérieur au volume du compartiment sanguin du fait, notamment, de la liaison aux protéines plasmatiques (Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b).

Équation 19 - Formule de calcul du volume de distribution apparent, d'après (Whalen 2014).

$$V_d = \frac{Dose}{C_0}$$

Tableau 18 - Exemples de perfusion vasculaire des organes chez l'adulte sain au repos, d'après (Waller et Sampson 2018b).

Organe	Proportion de la fraction d'éjection cardiaque (%)	Débit sanguin (mL/min pour 100 g de tissus)
Poumons	100	1000
Rein	15	350
Foie	27	110
Cœur	4	100
Tractus gastrointestinal	15	300
Cerveau	12	56
Peau	5	12
Muscle	12	4

C'est à l'étape de distribution que les PA sont accessibles pour agir sur des récepteurs, au niveau de leurs cibles tissulaires et/ou cellulaires. Les récepteurs sont des structures protéiques qui présente une ou plusieurs fonctions chimiques affines aux PA et qui permettent à ce dernier d'exercer son effet, direct ou par déclenchement de mécanisme de signalisation intracellulaire. On définit l'action d'un PA son effet sur le récepteur (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018a**) (Figure 64) :

Agoniste ou antagoniste : activation ou inactivation du site actif du récepteur

Inhibiteur compétitif : compétiteur réversible ou irréversible, face à une molécule endogène, pour le site actif du récepteur

Activateur allostérique : activation d'un site allostérique du récepteur, différent du site actif, qui module positivement l'effet du récepteur

Inhibiteur allostérique : activation d'un site allostérique du récepteur, différent du site actif, qui module négativement l'effet du récepteur

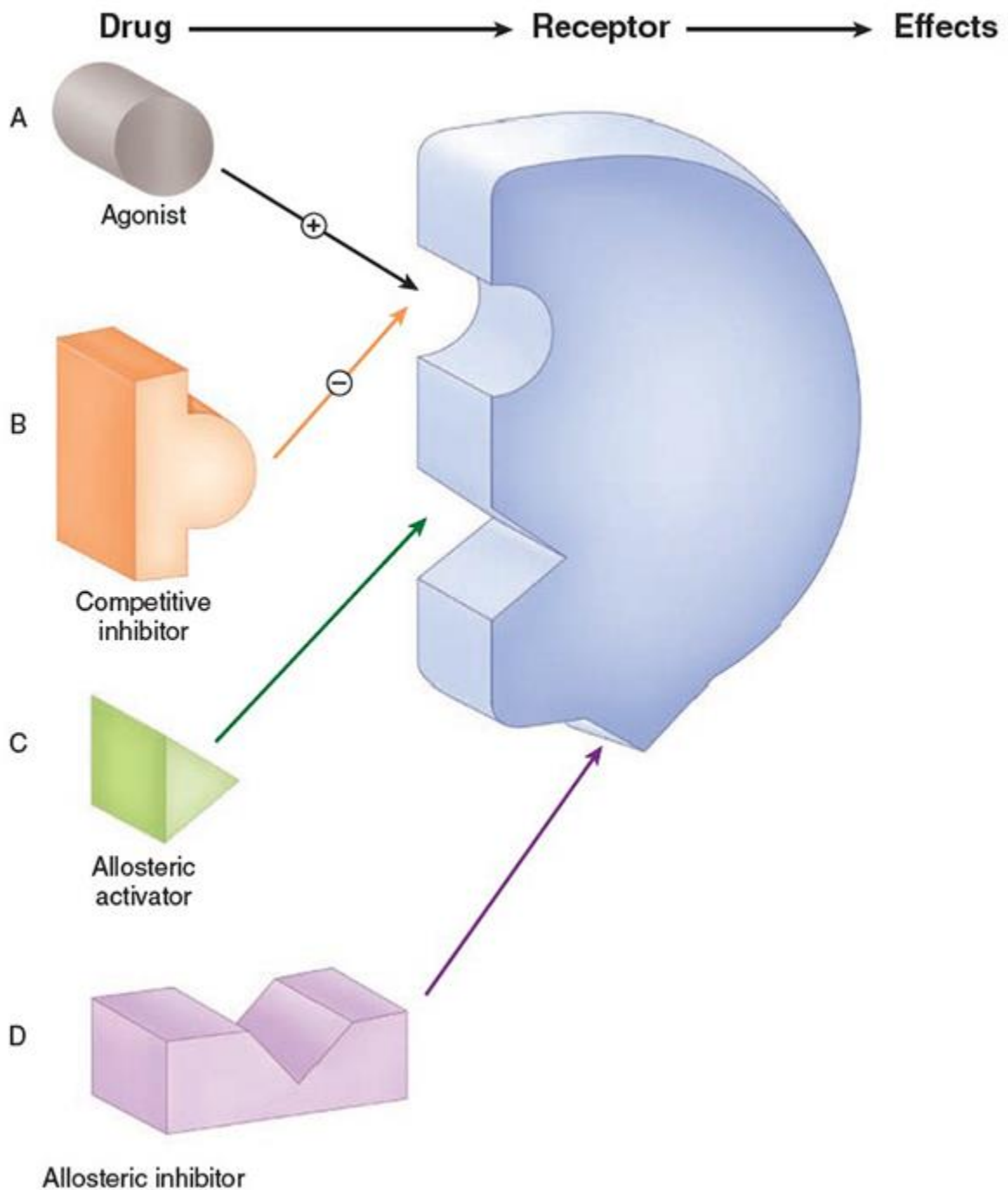


Figure 64 - Représentation schématique du fonctionnement d'un récepteur lors de la mise en contact avec un PA, d'après (Katzung 2017).

Il existe 5 grandes voies de signalisation intracellulaire (Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018a) (Figure 65) :

La diffusion passive à travers la membrane cellulaire : Ce phénomène n'est possible que pour les PA lipophiles. Une fois dans le compartiment intracellulaire, ils sont à même d'atteindre leur récepteur, qui est généralement une enzyme ou une protéine régulatrice dans la transcription.

La liaison aux structures extracellulaires d'un récepteur portant une activité enzymatique directe sur sa partie intracellulaire : Lors de la fixation du PA sur le site actif extracellulaire du récepteur, on observe des modifications de conformations des structures ternaires et quaternaires de la protéine. Ces dernières permettent aux structures intracellulaires du récepteur, portant une activité enzymatique, d'exercer leur effet sur un substrat intracellulaire.

La liaison aux structures extracellulaires d'un récepteur portant une activité enzymatique indirecte sur sa partie intracellulaire : Lors de la fixation du PA sur le site actif extracellulaire du récepteur, on observe des modifications de conformations des structures ternaires et quaternaires de la protéine. Ces dernières permettent aux structures intracellulaires du récepteur de stimuler une structure protéique secondaire, de type kinase, qui a pour rôle la phosphorylation d'un substrat intracellulaire.

La liaison aux structures extracellulaires d'un canal ionique : La fixation du PA sur ce type de récepteur induit la fermeture ou l'ouverture d'un canal ionique transmembranaire. La modification du contenu du cytosol induit, généralement, la modification de la polarisation cellulaire.

La liaison aux structures extracellulaires d'un récepteur couplé à une protéine G : Le PA se fixe sur les structures extracellulaires d'un récepteur transmembranaire, qui est couplé à une protéine effectrice appelée protéine G, car son fonctionnement repose sur la déphosphorylation d'une guanosine triphosphate (GTP) pour phosphoryler une enzyme tierce, afin de l'activer. Ce phénomène module l'activation ou l'inhibition d'une molécule de signalisation intracellulaire appelée second messager.

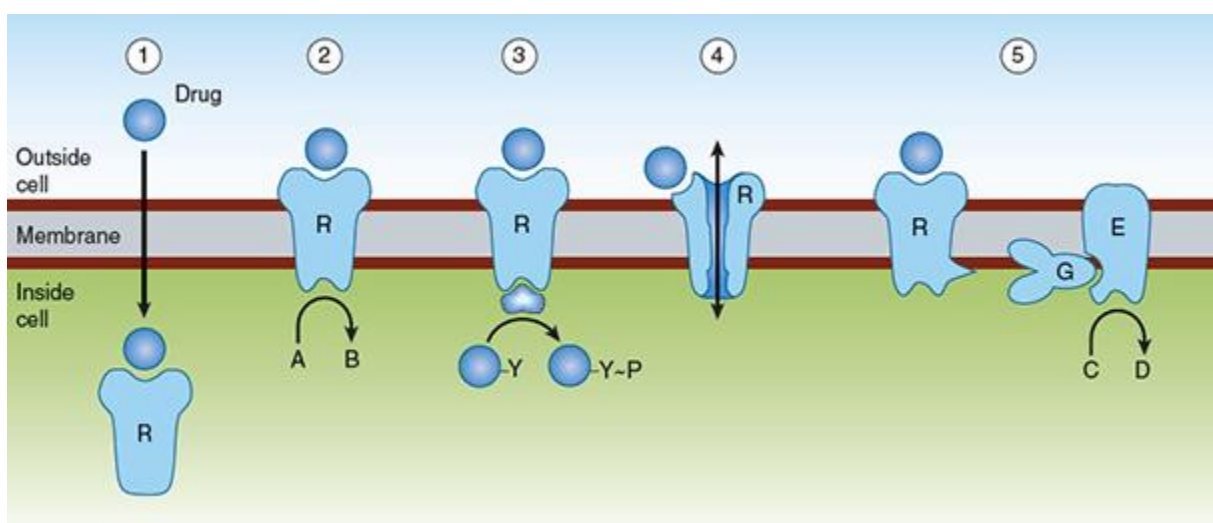


Figure 65 -Représentation schématique des mécanismes de signalisation cellulaires, d'après (Katzung 2017). 1 : Diffusion transmembranaire du PA et action sur récepteur intracellulaire. 2 :Liaison à la partie extracellulaire d'un récepteur transmembranaire d'action directe. 3 ; Liaison à la partie extracellulaire d'un récepteur

transmembranaire dont l'action est médiée par une tyrosine kinase. 4 : Liaison sur un canal ionique. 5 : Liaison sur la partie récepteur, couplée à une protéine G.

Le Tableau 19 présente, de manière non exhaustive, les récepteurs pharmacologiques présents au niveau de l'appareil respiratoire, ainsi que les PA couramment utilisés dans le traitement des pathologies pulmonaires (**Waller et Sampson 2018b**).

Tableau 19 - Exemples des récepteurs et PA associés de l'appareil respiratoire, d'après (Waller et Sampson 2018a).

Type			Localisation	Action biologique	PA effecteurs
Récepteurs couplés à une protéine G	Muscarinique	M ₁	Glandes salivaires	Activation de la sécrétion	Ipratropium (antagoniste)
	Muscarinique	M ₃	Muscles lisses	Contraction	Tiotropium (antagoniste)
	Adrénérique	β ₂	Muscles lisses bronchiques	Bronchodilatation	Salbutamol, salmeterol, terbutaline (agonistes)
Récepteurs purinergiques		A ₁	Poumons	Bronchoconstriction	Methyl-xanthines (antagonistes)
		A _{2A}	Ubiquitaires	Bronchodilatation	
		A _{2B}	Leucocytes	Bronchoconstriction	
Canal ionique	Nicotinique	N ₂	Jonction neuro-musculaires	Contraction musculaire	Curares (antagonistes)

3. Métabolisation

Le métabolisme consiste en une cascade de biotransformations des PA, reconnus comme étant des molécules exogènes, en vue de leur élimination. Elle se fait généralement en 2 phases, une première phase de pré-modifications et une phase de conjugaison. La phase 1 correspond généralement à des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse, afin de modifier une ou plusieurs fonctions chimiques du PA en vue de la seconde phase. Cette dernière consiste à ajouter une fonction chimique spécifique au PA, afin de le rendre hydrophile pour favoriser

son excrétion (Figure 66). Les enzymes impliquées dans la métabolisation sont, le plus souvent, aspécifiques et sont, donc, à même de métaboliser un grand nombre de xénobiotiques. Au cours de la métabolisation deviennent des métabolites qui perdent leur efficacité thérapeutique. Toutefois, les mécanismes de métabolisation ont été utilisés dans le développement pharmaceutique pour permettre l'administration de PA, qui prennent alors le nom de « prodrug », le métabolite de ce PA portant l'activité thérapeutique (**Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**).

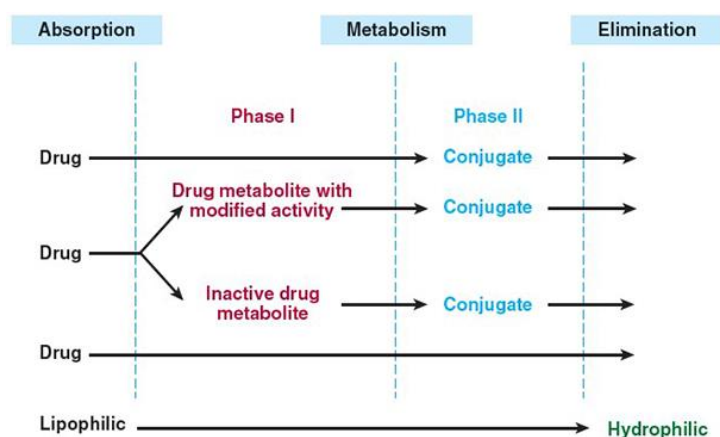


Figure 66 - Illustration des différents phénomènes de métabolisation des PA dans l'organisme, d'après (Katzung 2017).

Les réactions de la phase 1 sont médiées par une superfamille de protéines, les cytochromes P450 (CYP). Ce sont des protéines présentes sur la membrane du réticulum endoplasmique lisse des cellules. On compte plus de 50 familles de CYP, qui se déclinent ensuite en isoformes. Bien qu'ubiquitaires, ces enzymes sont exprimées de manière prépondérante dans certains organes, tels que le foie, le tractus intestinal ou les poumons. À la lumière des connaissances actuelles, il apparaît que certaines isoformes sont exprimées préférentiellement dans certains organes. Le Tableau 20 et le Tableau 21 présentent les familles et isoformes enzymatiques majoritairement exprimées au niveau des poumons. Il est important de noter que l'expression des CYP est soumise à de fortes variabilités inter-individuelles. En outre, leur expression au sein des tissus peut être induite ou inhibée par des substances exogènes (**Olsson et al. 2011; Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b**).

Tableau 20 - Récapitulatif des enzymes de métabolisation de phase 1 présente dans le tractus pulmonaire, d'après (Olsson et al. 2011).

Isoforme	Commentaires
----------	--------------

<i>CYP1A1</i>	Présente uniquement chez les fumeurs, retour au niveau basal après deux mois d'arrêt
<i>CYP1B1</i>	Induite par la fumée de tabac
<i>CYP2B6</i>	Variant par épissage alternatif, auparavant 2B7
<i>CYP2C</i>	
<i>CYP2E1</i>	
<i>CYP2J2</i>	Fortement exprimée, possible rôle endogène
<i>CYP3A4</i>	
<i>CYP3A5</i>	

Tableau 21 - Récapitulatif des enzymes de métabolisation de phase 2 présente dans le tractus pulmonaire, d'après (Olsson et al. 2011). UDP : uridine diphosphate.

Isoforme	Commentaires
<i>FMO (flavine mono-oxygénases)</i>	Différentes isoformes exprimées
<i>UGT (UDP glucuronosyle transférase)</i>	Différentes isoformes exprimées mais faible capacité métabolique
<i>GST (glutathion S-transférase)</i>	
<i>Estérases</i>	Forte capacité métabolique
<i>Époxydes hydrolases</i>	Faible capacité métabolique
<i>Peptidase</i>	Forte capacité métabolique
<i>SULT (sulfotransférases)</i>	Forte capacité métabolique

4. Élimination

L'élimination est l'étape terminale, le plus souvent, du devenir d'un PA dans l'organisme, elle correspond à la sortie du PA de l'organisme. Elle peut se faire dans différentes substances corporelles. Les substances polaires de faible poids moléculaire sont éliminées dans les fluides corporels, comme la sueur, l'urine, les larmes ou le lait. L'excrétion urinaire est, chez l'être humain, la voie d'excrétion majoritaire. Les substances de fort poids moléculaires sont majoritairement excrétées dans les fèces même si on peut retrouver des traces de certaines substances dans les cheveux. Enfin, les espèces volatiles sont majoritairement éliminées dans l'air expiré **(Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b)**.

L'élimination peut être quantifiée par le calcul de la clairance, qui correspond à un débit d'élimination (Équation 20). Elle est obtenue par la détermination de la constante d'élimination du PA, qui est inversement proportionnelle à sa demi-vie biologique et au volume de distribution apparent du PA. Le temps de demi-vie biologique d'un PA est le temps nécessaire à l'organisme pour éliminer 50% de ce PA. En pratique clinique, on estime que l'élimination d'un PA est totale après 5 demi-vies. La clairance peut être calculée indépendamment pour chaque organe, on parle de clairance d'organe, ou de manière systémique à l'échelle de l'organisme, on parle alors de clairance totale (la clairance totale étant la somme de toutes les clairances d'organe). **(Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b)**.

Équation 20 - Formule de la clairance, modifiée d'après (Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b).
k : constante d'élimination. V_d : volume de distribution apparent. $t_{1/2}$: demi-vie biologique du PA.

$$Cl = \frac{\text{taux d'élimination}}{\text{concentration en PA}} = k \times V_d = \frac{0.693}{t_{1/2}} \times V_d$$

Il est important de noter que pour certaines voies d'excrétion, des phénomènes de réabsorption peuvent advenir, ce qui limite ou délaie l'excrétion des PA. Ces phénomènes sont très présents au sein de reins ou du tractus gastro-intestinal. Au vu de la longueur de ce dernier, ces phénomènes de réabsorption portent le nom de cycle entéro-hépatique. Il s'agit du phénomène par lequel un PA est absorbée dans au niveau intestinal, puis transporté au niveau hépatique, siège majeur de métabolisation dans l'organisme. Il y est métabolisé, puis excrété dans les voies biliaires et, de manière terminale, dans l'intestin où il sera potentiellement réabsorbé, sous sa forme de métabolite ou non, et distribué à nouveau dans l'organisme (Figure 67). L'excrétion des PA de l'organisme vers l'environnement peut être à l'origine de contamination de l'environnement, dont les impacts peuvent impacter les écosystèmes **(Whalen 2014; Katzung 2017; Waller et Sampson 2018b)**.

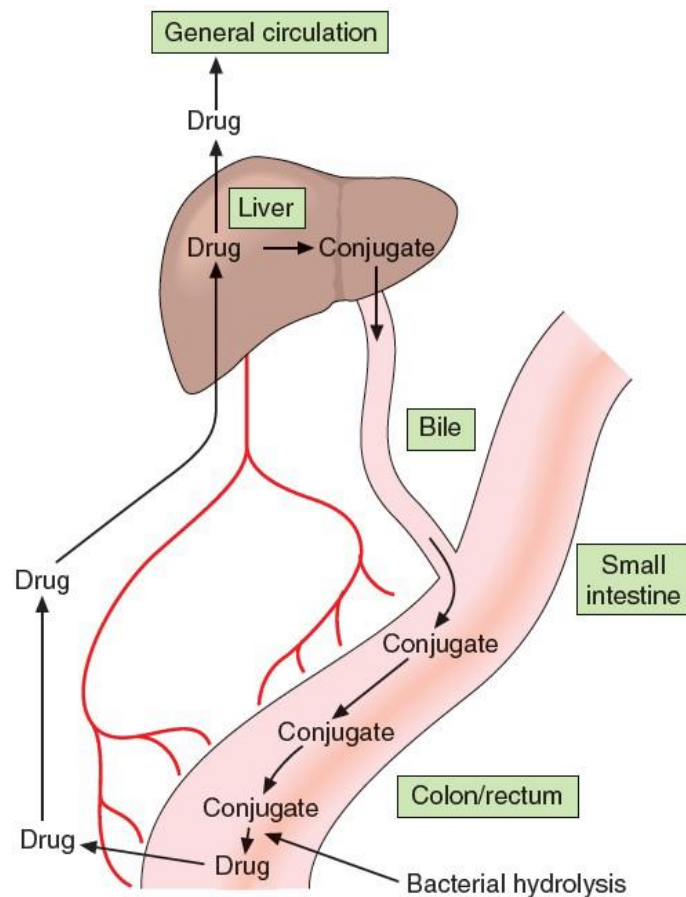


Figure 67 - Représentation schématique du cycle entéro-hépatique, d'après (Waller et Sampson 2018b).

La compréhension des différents phénomènes pharmacologiques, qu'ils soient à l'échelle de l'organisme ou à l'échelle de l'appareil respiratoire sont un prérequis important pour la compréhension de l'efficacité ou inefficacité des PA administrés par voie inhalée.

Annexe II

Historique des aérosols thérapeutiques

Les premières traces d'aérosolthérapie de l'histoire humaine figurent dans des écrits de médecine ayurvédique quelques 4000 ans avant notre ère. Des feuilles de belladone (*Atropa belladonna*) ou de datura (*Datura stramonium*), contenant de l'atropine qui est connue de nos jours pour ses effets anticholinergiques, étaient fumées en tant que traitement des pathologies respiratoires, telles que l'asthme. Pour contrer les effets potentiellement toxiques de ces alcaloïdes, les médecins hindous faisaient varier la longueur des tuyaux des pipes, afin d'ajuster, de manière empirique, les doses inhalées. Des traces de telles pipes ont

aussi été retrouvées dans les cultures amérindiennes. (Bisgaard et al. 2001; Henning et al. 2010; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019).

À peu près à la même époque, en Égypte antique autour de – 1554, les prêtres administraient des fumigations de jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*) aux patients souffrant de troubles respiratoires. Ces traitements ont été compilés, à l'époque, dans le papyrus Ebers qui est l'une des premières traces écrites de pharmacopée (Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019).

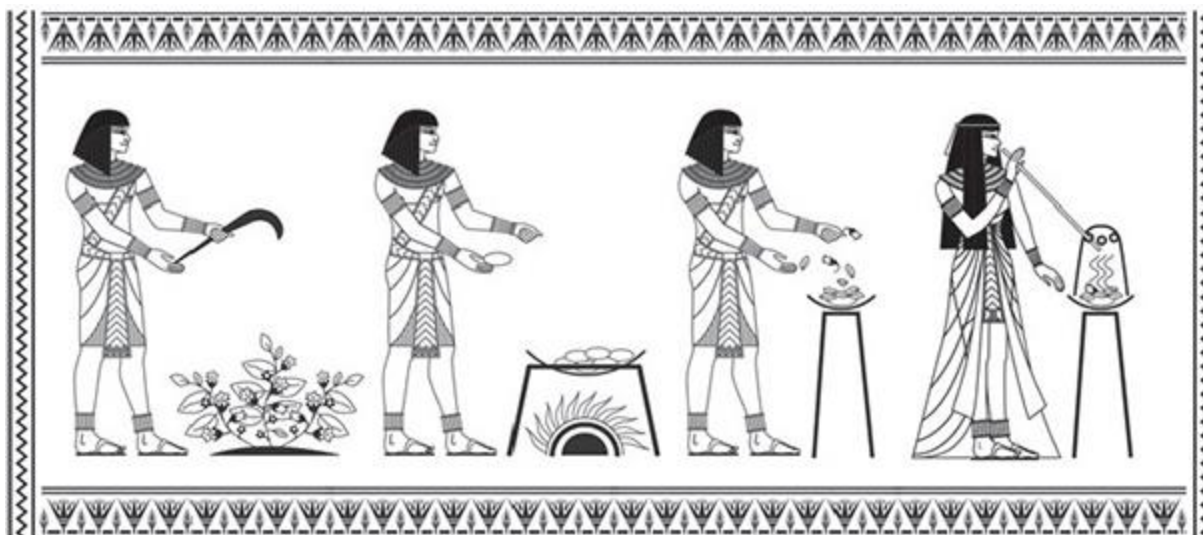


Figure 68 - Représentation schématique d'un traitement inhalé en Égypte antique vers -1554, d'après (Stein et Thiel 2017).

Quelques siècles plus tard, en Chine autour de -1100, on retrouve des traces d'opium (*Papaver somniferum*) sous forme fumée pour ses vertus récréatives. Cette pratique aurait été importée du Moyen-Orient où les Sumériens (et plus tard, les Assyro-Babyloniens et les Égyptiens) auraient mis au point ces usages. Cette utilisation de l'opium récréative deviendra progressivement thérapeutique, avec des modifications de la voie d'administration. Ces pratiques sont restées ancrées dans ces régions. Dans son *Canon de la Médecine*, Avicenne décrit de manière extensive les usages du pavot à des fins thérapeutiques et s'intéresse aux effets indésirables de ces traitements. À la même époque en Chine apparaissent les premières descriptions de l'utilisation de l'éphédrine, par fumigation d'éphédra (*Ephedra sp.*) (Stein et Thiel 2017).

Presque 700 ans plus tard, autour de -400, Hippocrate décrit un dispositif d'inhalation, proche de celui des Égyptiens, pour le traitement de diverses maladies. L'inhalation se faisait au moyen d'un roseau placé dans un pot percé (Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019).

Autour du I^{er} siècle, les herbes fumées, telles que le tabac ou le chanvre, sont devenues une pratique commune particulièrement en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Au même moment, près d'un siècle après les médecins chinois, Pline l'Ancien, recommande un remède à base d'éphédra pour le traitement de l'asthme. Un siècle plus tard, c'est Claude de Pergame, plus connu sous le nom de Galien, qui décrit l'utilisation de poudres de plantes, telles que la noix vomique (*Strychnos nux vomica*) ou la myrrhe (*Commiphora myrrha*), pour le traitement des pathologies nasopharyngées. Il recommande aussi à ses patients d'aller respirer les effluves soufrées des « solfatare » sur les pentes du Vésuve. Plus tard, autour du IV^e ou V^e siècle, Caelius Aurelianus, décrit de manière précise les symptômes de l'asthme et propose l'inhalation de vapeur d'eau pour en calmer les exacerbations. Il décrit aussi un traitement prophylactique basé sur l'inhalation d'air marin. Ces préconisations sont facilement suivies dans la Rome antique du fait de la très grande démocratisation des bains thermaux **(Sanders 2011; Stein et Thiel 2017)**.

Au cours du Moyen-Âge, on observera peu d'améliorations notables des pratiques en aérosolthérapie. Au VII^e siècle, Paulus Aegineta compile dans un livre les différents composés pouvant être inhalés dans le traitement de la toux. Entre 850 et 932 à Bagdad, Rhazes utilise des éponges qu'il imbibe de narcotiques, un mélange de d'opium, de jusquiame, de mandragore (*Mandragora officinarum*) et de belladone, qu'il fait ensuite sécher. Avant une opération, il humidifie ces éponges et les presse sur le nez et la bouche des patients, afin de les anesthésier. Les plus grandes avancées de cette époque sont issues de Maïmonide, un médecin espagnol émigré à la cour de Saladin à Damas entre 1138 et 1193. Il était responsable de la santé du fils de Saladin, asthmatique, et écrit son *Traité de l'asthme* dans lequel il détaille les traitements possibles, prophylactiques ou thérapeutiques. Il y fait aussi le lien entre la pollution de l'air et le déclenchement d'une crise d'asthme. Il recommande l'aération quotidienne des lieux de vie et prône une hygiène rigoureuse **(Sanders 2011; Stein et Thiel 2017)**.

Il faut attendre le XVII^e siècle pour entrevoir les réelles prémises de ce qui deviendra l'aérosolthérapie moderne, avec le premier réel dispositif d'inhalation dessiné par Christopher Bennett en 1654 **(Sanders 2011; Stein et Thiel 2017)**. À la même époque, en Inde, Yogaratnakara formalise et modifie l'aérosolthérapie à base de datura fumée dans le traitement de l'asthme **(Bisgaard et al. 2001; Henning et al. 2010; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019)**.

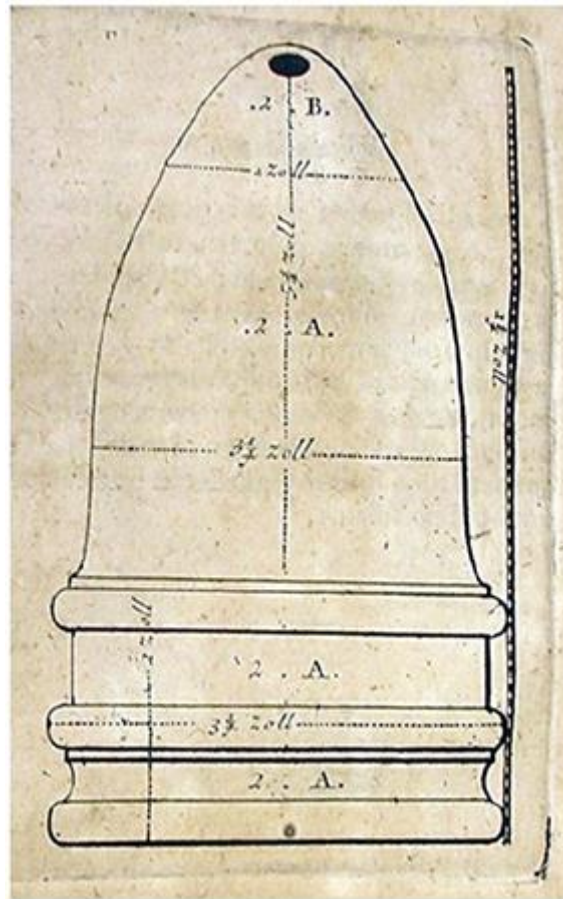


Figure 69 - Schéma du premier inhalateur connu dessiné par Christopher Bennett en 1654, d'après (Sanders 2011).

Cependant, c'est avec l'ère industrielle que l'aérosolthérapie connaît un réel essor. En effet, c'est à cette période que la production des dispositifs d'aérosolisation a pu être industrialisée. En outre, les avancées scientifiques ont permis la découverte de nouveaux PA. C'est ainsi, que l'on assiste à la transformation des « vapeurs médicales » en l'aérosolthérapie moderne, grâce aux débuts de la nébulisation et des « dry powder inhalers » (DPI). En 1767, Philip Stern publie *Medical Advice to the Consumptive and Asthmatic People* dans lequel il donne, pour la première fois à l'époque, des conseils directement aux patients et non aux médecins. Il préconise l'utilisation de vapeurs de baumier (*Dacryodes macrophylla*). Une dizaine d'années plus tard, John Mudge, publie *A Radical and Expeditious Cure for Recent Catarrhus Cough* où est décrit pour la première fois le terme d'inhalateur. Il y explique le développement et le fonctionnement d'un dispositif d'aérosolthérapie basé sur la génération et la délivrance d'aérosols à base de vapeur d'eau. Son dispositif se compose d'un pot métallique dont le couvercle est relié à un tube d'une quinzaine de centimètres, servant à l'inhalation. Sur la poignée du dispositif, des trous étaient percés pour permettre le passage de l'air et son barbotage à l'intérieur du dispositif, générant ainsi l'aérosol. Un système de valve permet la gestion des flux d'air inspiré et expiré, sans que le patient n'ait à ôter le tube de sa bouche

(Figure 70). Il recommande des sessions de 20 à 30 minutes (**Bisgaard et al. 2001; Henning et al. 2010; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019**).



Figure 70 - Dessin (a) et photographie (b) de l'inhalateur de Mudge, d'après (Stein et Thiel 2017).

Tout au long du XIX^e siècle, l'utilisation des vapeurs médicales issues de solutions aqueuses est la première ligne de traitement des pathologies respiratoires. En se basant sur les dessins de Mudge, de nombreux autres inhalateurs sont créés pour répondre aux besoins des patients. C'est aussi à cette époque que l'on assiste à la naissance de cigarettes, composées d'un mélange de tabac et de datura, pour le traitement de l'asthme. Des essais cliniques ultérieurs montreront l'effet bronchodilatateur de ces cigarettes. En 1810, Laennec introduit l'utilisation de plantes aromatiques, de baumier et de soufre dans le traitement des infections respiratoires. En 1817, Humphrey révèle les plans d'un inhalateur basé sur la vapeur. Bien que des doutes subsistent sur sa production, il s'agirait du premier inhalateur pressurisé. Quelques années plus tard, en 1829, à la suite des observations d'Auphan sur la génération de gouttelettes d'eau lorsque celle-ci est lancée contre un mur, Schneider et Walz décrivent le premier dispositif à même de créer des gouttelettes aéroportées à partir d'un liquide sans ébullition, décrivant le principe de la nébulisation. En 1834, Sir Charles Scudamore propose l'inhalation des vapeurs de solutions aqueuses d'iode et de ciguë (*Conium maculatum L.*) par séquence de 15 à 20 minutes 3 fois par jour pour le traitement de la tuberculose et d'autres affections respiratoires. Dix ans plus tard, Maddock publie une revue de l'état de l'art et des connaissances sur l'inhalation. À la même époque Horace Wales aux États-Unis d'Amérique et James Simpson au Royaume-Uni décrivent les prémisses de l'anesthésiologie en utilisant respectivement monoxyde d'azote et du chloroforme. Enfin, à la toute fin de la première moitié du XIX^e siècle, Chambers décrit l'utilisation de spores broyées de *Lycopodium clavatum*,

imbibée de nitrate d'argent ou de sulfate de cuivre, comme potentiel vecteur pour l'aérosolthérapie. Ces travaux seront repris par William Cornell à Boston qui publiera en 1850 sur l'utilité de ces poudres dans le traitement des affections respiratoires **(Bisgaard et al. 2001; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019)**.

Quelques années plus tard, en 1852, Ira Warren décrit ce qui deviendra le premier DPI qui se compose d'un kit comprenant des seringues pour administration laryngée, pharyngée ou nasale de poudres. En 1858, Jean Sales-Girons présente à l'Académie Française de Médecine un dispositif portable d'aérosolisation composé d'un réservoir pour une solution de PA, d'une pompe, d'une petite buse et d'un plateau d'impaction. En actionnant la pompe, une pression est exercée dans le réservoir, ce qui force le passage du liquide à travers la buse, puis sur le plateau d'impaction qui pulvérise la solution, générant un aérosol (Figure 71). L'Académie de Médecine, par l'intermédiaire de Trousseau, valide le dispositif et reconnaît que la finesse de l'aérosol issu de ce dispositif est à même d'atteindre les bronches. L'année suivante, on assiste à l'introduction du néphogène de Mathieu, dont l'anglicisation donnera le terme nébuliseur, qui est une itération du dispositif de Sales-Girons. En effet, plutôt que de diriger un jet de liquide sur une surface dure, Mathieu utilise un jet d'air comprimé passant au travers un goutte à goutte de solution de principe actif, qui est ainsi projeté à travers une buse **(Bisgaard et al. 2001; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019)**.



En 1860, Henry Hyde Salter publie *On Asthma its Pathology and Treatment*, une revue systématique des options thérapeutiques dans le traitement de l'asthme et effectue une catégorisation des stratégies en fonction de leur effet dépresseur, stimulant ou sédatif. En 1862, le médecin allemand Bergson s'approprie le néphogène de Mathieu et le transforme en un nouveau dispositif appelé Hydrokonium. Basé sur l'effet Venturi, il utilise l'air comprimé pour générer un aérosol. Ce système est breveté 2 ans plus tard par Siegle. Avec ces nouvelles technologies, et leurs itérations, les vaporisateurs et nébuliseurs deviennent rapidement une stratégie de choix dans la délivrance de PA inhalés. En 1865, on observe l'apparition des inhalateurs en céramique, plus légers et maniables que les inhalateurs métalliques. Leur design a été publié dans le Lancet par Nelson. Utilisé à l'origine avec des éponges imbibées de solution de PA, la praticité de l'utilisation directe de solutions modifiera les usages. Quelques années plus tard, en 1874, Louis Waldenburg présente les premières études de dépôt des aérosols. Ses travaux montrent que 25% de la dose aérosolisée serait arrêtée dans les VAS et que la dose à même d'atteindre les VAI serait de l'ordre de 30%. Il reconnaît que ces données sont impactées par les caractéristiques du patient, telles que la position de la langue, le pattern respiratoire et l'état physiopathologique. Étant donné l'importance des dépôts dans les VAS, il recommande le rinçage de la cavité buccale après traitement. Ces informations sont validées en 1884, par Evans qui publie ses études montrant que la taille des gouttelettes influe sur leur zone de dépôt. À la fin du siècle, on assiste à l'apparition des premiers DPI réellement commercialisés avec les dispositifs d'Alfred Newton et de Mack Fields. Ce dernier, l'Aerohalor[®], sera commercialisé par les laboratoires Abbott et utilisé pour l'administration d'un agoniste β , l'isoprénaline. Ce dispositif sera aussi utilisé pour l'administration de pénicilline. Le dispositif utilise la forme d'inhalation du patient pour mouvoir une bille métallique, qui impacte une cartouche contenant la poudre à aérosoliser. Doté d'un adaptateur oral ou nasal, en fonction du besoin, ce DPI ouvre l'ère de la commercialisation des dispositifs d'aérosolthérapie, malgré sa relative inefficacité. La dernière décennie du XIX^e siècle voit apparaître les premiers « metered dose inhaler » (MDI) avec le « Wyeth Pencil Inhaler », un dispositif basé sur des dépressions locales permettant la vaporisation de cristaux de menthol, et les travaux d'Helbing et Pertch qui utilisent les chlorures d'éthyle ou de méthyle comme gaz vecteur de solutions aqueuses, travaux précurseurs dont découleront les « pressurised MDI » (pMDI). **(Bisgaard et al. 2001; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019).**

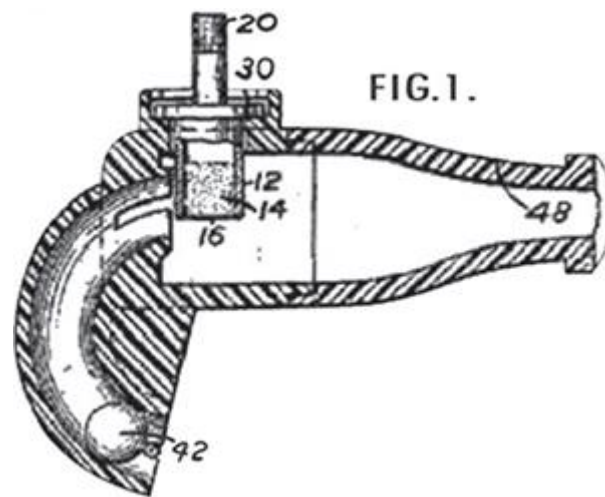


Figure 72 - Schéma du dispositif Aerohalor® des laboratoires Abbott, d'après (Stein et Thiel 2017).

Le XX^e siècle et ses développements technologiques et scientifiques galopants sont à la base de l'évolution rapide des dispositifs d'aérosolthérapie. La grande accessibilité du caoutchouc rend possible l'utilisation extensive de nébuliseurs dont le flux d'air est créé par pression d'une poire. En 1906, le « Drug and Food Act » instaure la régulation de nombreux produits dont les produits de santé. C'est à cette époque que les essais cliniques se généralisent et permettent, entre autres, de prouver l'efficacité des PA. Ainsi en 1910, l'efficacité de l'éphédrine inhalée dans le traitement de l'asthme est prouvée. Dans les années 1930, des nébuliseurs tels que le DeVilbiss n°40 ou le Pneumostat font leurs apparitions, rapidement rejoint par des copies et des dérivés. En 1946, l'apparition de pompe électrique rend possible l'utilisation des nébuliseurs au domicile des patients. À partir de 1950, on voit apparaître les premiers nébuliseurs en plastique, ce qui augmente leur portabilité et leur facilité d'utilisation. En outre, l'essor de la plasturgie permet d'améliorer la précision de certaines pièces critiques, ce qui rend possible la génération de gouttelettes plus fines et plus régulières. C'est aussi à cette période que l'intérêt de la cortisone sur le traitement des symptômes de pneumonie bactérienne et de l'asthme est prouvé (**Bisgaard et al. 2001; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019**).

En 1954, Philips Meshburg met au point la valve doseuse qui laisse passer quelques dizaines de microlitres à chaque activation. C'est George Maison, président des laboratoires Riker, qui capitalisera sur cette invention en l'utilisant pour mettre au point des pMDI, avec comme gaz vecteur des chlorofluorocarbures (CFC). Il rencontre un franc succès, les pMDI devenant les premiers dispositifs d'aérosolthérapie pratiques et portables, en faisant les traitements de première ligne dans la gestion de l'asthme au long cours. Les différentes itérations de pMDI génèrent un nombre conséquent de nouveaux dispositifs (Tableau 22). À la fin des années 1950 et tout au long des années 1960, on observe des apports importants à l'aérosolthérapie. En effet, des données cliniques recueillies par Franklin *et al.* montrent que l'utilisation de

chambres d'inhalation permettent de réduire drastiquement les dépôts dans les VAI et d'améliorer les dépôts périphériques pulmonaires, tout en proposant une solution au problème de coordination posé par les pMDI. De manière concomitante, les apports de la galénique sur les formulations placées dans les dispositifs d'aérosolthérapie permettent d'améliorer les dépôts pulmonaires ou de favoriser l'action des PA, particulièrement pour les DPI où les poudres sont mélangées à des excipients comme le lactose et placés dans des gélules au sein du dispositif. Enfin, un nouveau type de nébuliseur, basés sur la génération d'ultrason par une membrane piézoélectrique, apparaît. Pour les nébuliseurs pneumatiques, le développement des pompes sèches permet d'accroître leur utilisation en facilitant l'entretien (**Bisgaard et al. 2001; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019**).

Il est important de noter que ces nombreux développements fructueux de la voie inhalée sont accompagnés de nombreux échecs, particulièrement pour l'administration systémique de PA, tels que l'insuline qui montre une trop grande variabilité dans les dépôts pulmonaires, la vaccination avec le bacille de Calmette et Guérin ou la rougeole, le méthylphénidate pour le traitement des troubles de l'attention ou encore la triiodothyronine dans le traitement de la l'intoxication alcoolique aiguë (**Sanders 2011; Stein et Thiel 2017**).

Tableau 22 - Liste non exhaustive des pMDI approuvés aux États-Unis d'Amérique avant mise en place des génériques, modifié d'après (Stein et Thiel 2017).

Année	PA	Laboratoires
1956	Épinéphrine, isoprénaline, octylnitrate	Riker
1957	Phényléphrine + néomycine + hydrocortisone	
1959	Ergotamine	
1962	Isoprénaline + phényléphrine	
1970	Isoprénaline + phényléphrine, isoprénaline (Autohaler)	
1973	Metaproterenol	Boehringer Ingelheim
1981	Salbutamol	Glaxo, Schering

1982	Béclométhasone, triamcinolone	Schering, Glaxo, Rhône-Poulenc
1984	Flunisolide	Roche
1985	Cromoglycate de sodium	Fisons
1986	Ipratropium, pirbuterol	Boehringer Ingelheim, 3M
1992	Pirbuterol (Autohaler)	3M

À partir des années 1970, de nouveau pMDI apparaissent. En effet, pour lutter contre les difficultés d'utilisation, un système d'activation par détection de l'inspiration est mis en place, ces systèmes prenant le nom d'Autohaler. À la même période, les premières chambres d'inhalation commerciales font leur apparition et sont notamment dotées d'un système de valves pour découpler l'inspiration et l'expiration. Devant l'efficacité des premiers systèmes, de nombreuses itérations sont mises au point. En 1972, la béclométhasone, corticoïde charnière dans le traitement de pathologies pulmonaires chroniques, obtient son autorisation de mise sur le marché en Europe, puis aux États-Unis d'Amérique. Les années 1980 voient le nombre de MDI croître encore avec l'apparition de deux nouveaux PA, le salbutamol (dérivé de l'isoprénaline) et l'ipratropium (dérivé de l'atropine), présentant des effets thérapeutiques plus importants que les PA historiques tout en présentant moins d'effets indésirables. À la fin des années 1980, des travaux montrent les effets néfastes des gaz propulseurs utilisés dans le pMDI sur l'environnement. Pour stopper la détérioration de la couche d'ozone, de nouveaux gaz sont utilisés, des hexafluoroalkanes, à la suite de la signature du Protocole de Montréal en 1987. Dans les années 1990, un troisième type de nébuliseur est mis au point, son fonctionnement étant basé sur les vibrations rapides d'une membrane percée de pores micrométriques, tandis que les nébuliseurs pneumatiques sont améliorés par la mise en place de prise d'air et de valves expiratoires. Enfin, en 2004, un nouveau type de dispositif fait son apparition, les « soft mist inhalers » (SMI), qui sont à même de produire un aérosol aqueux à partir d'un dispositif portable multidoses. Depuis, on note peu de nouvelles innovations dans les dispositifs d'aérosolthérapie, les laboratoires pharmaceutiques étant plus axés sur la mise au point de nouvelles combinaisons de PA sans innovation technologique des DPI ou des pMDI (**Bisgaard et al. 2001; Sanders 2011; Stein et Thiel 2017; Lavorini et al. 2019**).

L'aérosolthérapie consiste, donc, en l'administration d'un PA par voie inhalée dans le but d'obtenir son dépôt dans les voies aériennes, afin d'obtenir un effet thérapeutique local ou systémique dans le cadre du traitement symptomatique ou curatif d'une pathologie. Au cours

des sections précédentes, nous avons eu une vue d'ensemble de l'aérosolthérapie de ses fondements jusqu'à nos jours. Les conclusions, malgré plusieurs millénaires d'utilisation et d'améliorations, sont un échec de l'obtention d'effets systémiques, alors que les effets locaux sont relativement bien contrôlés. Il y a, de fait, nécessité de mise en place de nouvelles stratégies tant technologiques que pharmacologiques, afin d'améliorer les dépôts d'aérosols là où ils sont nécessaires (régions pathologiques dans les pathologies respiratoires ou régions alvéolaires pour des visées systémiques) tout en améliorant l'absorption pulmonaire, si le PA doit avoir des effets systémiques. Cependant, une vue transdisciplinaire prenant en compte la physico-chimie des aérosols semble être nécessaire.

**Développement et optimisation d'une séquence
IRM permettant l'évaluation des dépôts régionaux
d'un aérosol d'AGuIX**

1. Introduction

Cette étude correspond aux travaux préliminaires nécessaires à la réalisation de l'étude de régionalisation des dépôts d'un aérosol d'AGuIX® par imagerie multimodale. En effet, au cours de ce projet, la méthode d'acquisition des images en IRM a été développée spécialement pour permettre l'acquisition sur le modèle *ex vivo*, avec et sans produit de contraste. L'objectif de ces travaux était, aussi, de s'intéresser à la faisabilité d'une quantification des dépôts d'aérosols contenant du gadolinium par l'étude du rehaussement du signal obtenu après des nébulisations successives.

2. Article


Received: 1 July 2019 | Revised: 11 September 2019 | Accepted: 24 September 2019

DOI: 10.1002/mrm.28041

FULL PAPER

Magnetic Resonance in Medicine

Three-dimensional quantitative MRI of aerosolized gadolinium-based nanoparticles and contrast agents in isolated ventilated porcine lungs

Yannick Crémillieux¹  | Yoann Montigaud² | Clémence Bal³ | Noël Pinaud⁴ | Vi Pham¹ | Sophie Perinel^{4,5} | Marco Natuzzi⁶ | François Lux⁶ | Olivier Tillement⁶ | Nobuyasu Ichinose⁷ | Bei Zhang⁸ | Jérémie Pourchez²

¹Institut des Sciences Moléculaires, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

²Mines Saint-Etienne, Univ Lyon, Univ Jean Monnet, INSERM, U 1059 Sainbiose, Centre CIS, Saint-Etienne, France

³IBIO, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

⁴INSERM U 1059 Sainbiose, Université Jean Monnet, Saint-Etienne, France

⁵CHU Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

⁶Institut Lumière Matière, UMR5306, Université Lyon1-CNRS, Université de Lyon, Villeurbanne, France

⁷Canon Medical Systems Corporation, Otawara, Japan

⁸Canon Medical Systems Europe, Zoetermeer, Netherlands

Correspondence

Yannick Crémillieux, Institut des Sciences Moléculaires, IBIO, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.
Email: yannick.cremillieux@u-bordeaux.fr

Funding information

Y.M. and J.P. received financial support from ANR grant AMADEUS ANR-17-CE19-0002-01.

Purpose: The objective of this study is to evaluate the suitability and performance of ultra-short echo time (UTE) sequences for imaging and quantifying the deposition of nebulized MRI contrast agents in human-sized lungs.

Methods: Nebulization of clinically used contrast agent or gadolinium-based nanoparticles were performed using a commercial jet nebulizer in isolated and ventilated porcine lungs connected to a 3D-printed human upper airways replica. MR images of isolated lungs were acquired on a 3T clinical MR scanner using 3D UTE sequences at different flip angles.

Results: 3D acquisitions with isotropic millimetric resolution were obtained in less than 4 min. Images exhibit homogeneous and large MR signal enhancement (above 200%) following nebulization of both types of aerosols. Deposition of aerosol down to the level of the bronchi of secondary lobules was visualized. T_1 values and the concentration of nanoparticles obtained by MRI were found to correlate with the amount of nebulized gadolinium³⁺ ions.

Conclusion: The distribution of aerosolized gadolinium-based contrast agent or nanoparticles can be visualized and quantified using UTE MRI in large animal ventilated lung model on a clinical MRI scanner. This protocol can be used for assessing and quantifying aerosol regional deposition with high spatial resolution (1 mm 3D isotropic) without ionizing radiation and could be applied in the future for diagnostic or therapeutic applications in patients.

KEYWORDS

aerosol, lung MRI, MRI contrast agents, theranostic nanoparticle, UTE

1 | INTRODUCTION

The administration of MRI contrast agents by means of the airways, either with intratracheal instillation or nebulized aerosols (by means of nasal, oral, or oronasal breathing route), is an approach that has been evaluated in the past by several research teams in animal models but also in humans.¹⁻⁴ A strong motivation for developing these approaches is to be able to diagnose and possibly to treat pulmonary pathologies using the airways as a direct access route to the lung tissue. The potential for MRI diagnostic has been demonstrated previously in several animal models of lung diseases such as asthma, lung fibrosis and lung cancer.⁵⁻⁸ The interest in intrapulmonary (i.p.) administration of MRI contrast agents is further reinforced when therapeutic effects can be associated to the MRI diagnostic as was shown recently with the delivery of theranostic radiosensitizing nanoparticles applied in a mouse model of lung tumors.⁹ A second important domain of application for i.p. delivery of MRI contrast agent is the possibility of imaging the biodistribution of drugs administered as an aerosol. The effectiveness of airborne particles deposits in the lungs (penetration, reproducibility, distribution, deposited fraction) remains an active research topic in which MRI plays a very limited role compared with quantitative nuclear imaging techniques such as gamma scintigraphy,^{10,11} considered in the literature as the gold standard method to assess regional aerosol deposition.

Since the first demonstration of i.p. administration of MRI contrast agents, pulmonary MRI has undergone a significant evolution with the development and application of ultra-short echo time (UTE) sequences to the lungs.¹²⁻¹⁵ These MRI sequences, characterized as their name indicates by an echo time shorter than a few hundreds of microseconds, reduce the artifacts due to tissue motion and to magnetic susceptibility differences,^{16,17} both important potential sources of artifacts in thoracic MRI. At the same time, these UTE sequences increase the MRI signal intensity in an organ, the lungs, hampered by a low proton density. The application of UTE sequences following i.p. delivery of contrast agent has been validated on small animals and preclinical MRI scanners,^{18,19} but this application of UTE sequences has not yet been evaluated on large animal models and clinical MRI, a necessary and indispensable step before these approaches can be transferred to the clinical field.

The objective of this study is precisely to validate the use of UTE sequences on isolated ventilated porcine lungs for the qualitative and quantitative assessment of the regional aerosol deposition of 2 gadolinium (Gd)-based contrast agents, a theranostic nanoparticle and a clinically used contrast agent. In this study, we quantified and compared the signal enhancement (SE) induced by these 2 types of contrast agents and we established a quantitative measure of contrast agent concentration. With a view to transferring this protocol to the clinic,

the experiments were performed under experimental conditions as close as possible to clinical situations using a commercial aerosol medical device (a jet-nebulizer technology), a 3D-printed human upper airways replica, isolated ventilated porcine lungs and a clinical whole-body MRI scanner.

2 | METHODS

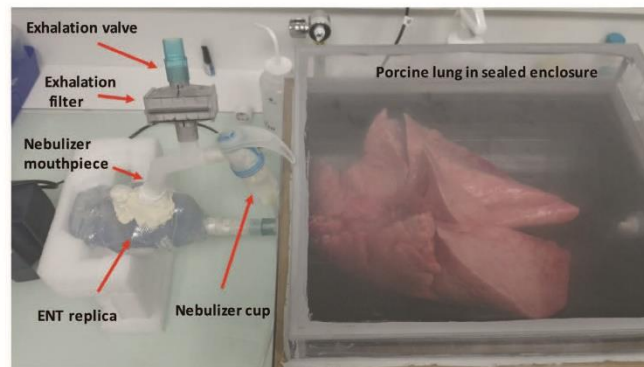
The lungs, including the trachea, were obtained from porcine slaughterhouses, meeting all sanitary controls in accordance with national sanitary standards. After harvesting, the lungs were stored at freezing temperature (-20°C) before being used for the study. The day of experiment, the lungs were brought to room temperature and a bronchoscopy was systematically performed to remove any obstructions and secretions.

For aerosol administration the porcine lungs were placed in "supine" position within an air-filled sealed enclosure and the trachea was tightly attached to a 3D-printed human upper airways replica. A nebulizer mouthpiece was air-tightly connected to the 3D replica on 1 side and to a medical jet nebulizer (LC Sprint, Pari GmbH, Germany) on the other side. A 1-way exhalation valve was fixed between the mouthpiece and the exhalation filter. An overview of the experimental set-up is shown in Figure 1.

To obtain inflation of the lungs and to mimic passive inspiration, negative pressures, depression of -9 ± 2 kPa, were applied in the enclosure using a pump connected to the enclosure. To trigger passive expiration, an exhaust valve was opened, allowing pressure to increase inside the enclosure and to obtain exhalation caused by the lung elastance. By cycling the closing and opening of the exhaust valve, the apparatus simulated passive ventilation of the lung. A set of sensors, connected to the enclosure and to the lung airways allowed a real-time follow-up of airflow and pressure and, thus, the determination of respiratory parameters, such as tidal volume, minute-ventilation, airway resistances, and dynamic compliance. Breathing pattern was set at 15 cycles per min, with 1.35 s inspiratory time and 2.65 s expiratory time leading to inspiratory/expiratory ratio of 1/2. These breathing parameters generated typical human tidal volume around 500 mL (minute-ventilation over 7.5 L/min), resistances approximately 13 $\text{cmH}_2\text{O}/(\text{L/s})$ and dynamic compliance approximately 90 $\text{mL}/\text{cmH}_2\text{O}$. The breathing cycle was applied during the aerosol administration generated with the medical jet nebulizer. The ventilation of the lung can be visualized in Supporting Information Video S1, which is available online. More details about this protocol for aerosol administration in isolated ventilated porcine lungs can be found in previously published studies using this experimental protocol.^{20,21}

Two types of solutions containing chelated Gd were prepared for aerosol deposition in the porcine lungs. The first

FIGURE 1 Overview of the nebulization set-up with the ENT (ear, nose, throat) human replica and the porcine lung in the sealed enclosure. The pump used for lung ventilation is not shown in the picture. The same enclosure is positioned inside the MRI scanner for the MRI acquisition



solution, referred herein as DOTA-aerosol, was prepared by diluting a solution of clinically used gadoterate meglumine solution (Clariscan[®], GE Healthcare) into saline solution. The second solution, referred herein as NP-aerosol, is a suspension prepared by dissolving lyophilized preparation of AGuIX[®] radiosensitizing nanoparticles (NH TherAguix, Meylan, France) into saline solution. The AGuIX nanoparticle is composed of a polysiloxane network surrounded by Gd cyclic ligands, derivatives of DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane acid-1,4,7,10-tetraacetic acid), covalently grafted to the polysiloxane matrix.²² Its hydrodynamic diameter is 3 nm, and its mass is around 10 kDa. On average, each nanoparticle presents on its surface 10 DOTA ligands, which chelate core Gd ions.

Six milliliters of 1 of these solutions with a concentration of Gd³⁺ ion of 300 mM, corresponding to 1.8 mmol of Gd³⁺, were introduced into the nebulizer reservoir and were aerosolized in approximately 15 min, until the defusing of the nebulizer. Preliminary to the ex vivo assessment of aerosol deposition pattern, size distribution of droplets was performed. Size distribution was assessed through the determination of mean median aerodynamic diameter and geometric standard deviation (SD) with an Andersen Cascade Impactor, according to the NF13544-1 standard and European Pharmacopeia monograph 2.9.18.

After complete nebulization of the solutions, the lungs within the nonmagnetic sealed enclosure were positioned inside a 3T whole body magnet (Vantage Galan 3T ZGO, Canon Medical Systems Corporation, Japan). The lungs were kept inflated at inspiratory tidal volume (around 500 mL) by applying a negative pressure in the sealed enclosure.

MR images were acquired using a 3D UTE MRI sequence with the following acquisition parameters, repetition time = 3.7 ms, echo time = 96 μ s, number of radial trajectory = 56,064, 1 average, total acquisition time = 3.5 min, field of view = 50 cm, 1 mm isotropic resolution. The data were acquired in a radial pattern, the start point of the radial lines

being in the center of the k-space and the end points being distributed over the surface of a sphere. Correction of gradient delays was applied and images were obtained using default reconstruction software installed on the MRI scanner. The data acquisition was performed using standard product coils, namely the whole body coil for RF excitation, 16ch Atlas Speeder Body coil and 16ch Atlas Speeder Spine coil for reception.

For 1 of the lungs, additional images were acquired during tidal breathing of the lungs (15 cycles per min, with 1.35 s inspiratory time and 2.65 s expiratory time and tidal volume around 500 mL). Nongated and respiratory gated images, data acquisitions triggered at end expiration, were obtained with a pressure gauge plugged to the enclosure. The total acquisition time for the 3D UTE gated acquisition was equal to 8 min.

A total of 13 isolated porcine lungs were imaged in this study, 5 of which were used for protocol implementation, validation, and optimization (imaging sequence parameters and aerosolized dose), the remaining lungs ($N = 7$) were imaged with the optimized protocol parameters.

To evaluate and quantify the changes in signal intensity induced by the DOTA-aerosol and the NP-aerosol, the left bronchus was ligated and thus temporarily obstructed during nebulization. The SE was defined as $(\text{SNR}_{\text{aerosol}} - \text{SNR}_{\text{obstr}}) / \text{SNR}_{\text{obstr}}$ where $\text{SNR}_{\text{aerosol}}$ and $\text{SNR}_{\text{obstr}}$ correspond to the signal-to-noise ratio (SNR) measured, respectively, in the nebulized right lung and in the obstructed Gd-free left lung. SNRs were measured in regions of interest (ROIs) avoiding visible airways with typical surface area of 20 cm².

The UTE acquisitions acquired at 4 different flip angles were used for computing the concentration of Gd deposited in the lungs in the following way. The image intensity was measured in lung parenchyma for each of the 4 UTE acquisition obtained at a different flip angle. The theoretical UTE MRI signal intensity, S_{UTE} , was modeled according to steady-state free precession imaging sequence without transverse coherences as follows²³;

$$S_{UTE} = \frac{(1 - E_1) \sin \alpha}{1 - E_1 \cos \alpha} \quad (1)$$

where α is the excitation flip angle and

$$E_1 = \exp\left(-\frac{T_R}{T_1}\right) \quad (2)$$

with T_R the sequence repetition time and T_1 the longitudinal relaxation time.

The value of T_1 was adjusted to obtain the best fit, using least-square minimization criteria, between the theoretical signal and the experimental data. The computed T_1 was then used to estimate the concentration, C (mM), of Gd^{3+} ion in the lungs as follows:

$$C = \frac{1}{r_1} \left(\frac{1}{T_{1post}} - \frac{1}{T_{1pre}} \right) \quad (3)$$

where r_1 is the longitudinal relaxivity induced by the Gd^{3+} ion, T_{1pre} and T_{1post} are the longitudinal relaxation times with and without nebulization of Gd-based aerosol.

The r_1 values at 3T were measured at room temperature (~ 293 K) using an inversion-recovery imaging sequence on vials with different concentrations of AGuIX nanoparticles and gadoterate meglumine in saline solution. T_{1pre} was obtained in the non-nebulized, Gd-free left lung.

The measurements of SNR values in ROI and the generation of maximum intensity of projection (MIP) were performed using OsiriX (Geneva, Switzerland). The computing of T_1 values was realized using open-source SciLab software (ESI, Paris, France). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Significance was fixed at a 5% probability level. The data are presented as mean value \pm SD.

For 2 lungs nebulized with NP-aerosol and DOTA-aerosol (3.6 mmol of Gd^{3+} ion for both of them), the right accessory lobe and the middle right lobe were collected. In both cases, the left lung was ligated and temporary closed during the nebulization. Two pieces (1.5 g each) per lobe were sampled from the lung parenchyma and used for the quantification of Gd concentration using ICP-MS (NexIon 2000, PerkinElmer, Wellesley, MA). Following harvesting, the pieces were placed immediately in a polytetrafluoroethylene tube compatible with the microwave oven CEM Mars 5. A total of 10 mL of HNO_3 69% were added, and after cooling down, the samples were diluted in HNO_3 1% to obtain a concentration of tissue of 1 g/L.

3 | RESULTS

Nanoparticle aerosol showed a mean median aerodynamic diameter of $3.60 \pm 0.05 \mu m$. Based on measurements performed

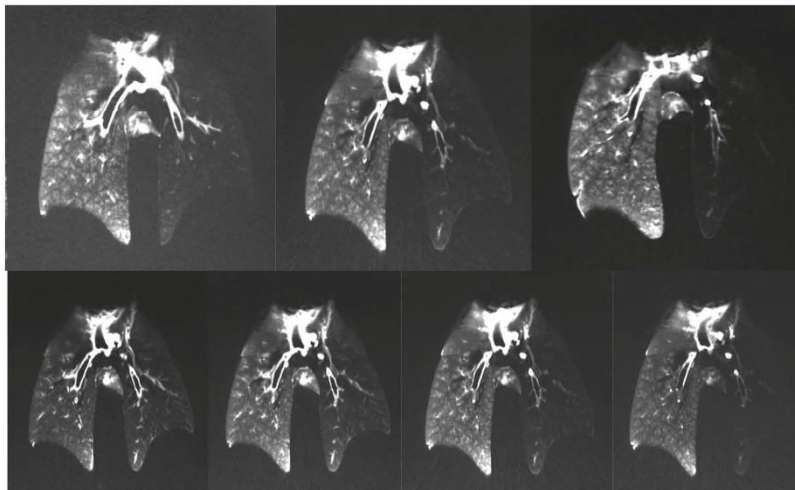


FIGURE 2 The top row shows 3 coronal slices in a similar location obtained in a porcine lung after 3 successive nebulizations (from left to right) of 6 mL of a NP-aerosol solution containing 1.8 mmol of Gd. From left to right, the cumulative amount of nebulized Gd is 1.8 mmol, 3.6 mmol, and 5.4 mmol. The 3 UTE acquisitions were obtained with a flip angle of 16° . The bottom row shows 4 coronal slices at identical position obtained with 4 increasing flip angles (from left to right) of 5, 8, 16, and 25° . These 4 UTE acquisitions were obtained after the second nebulization of NP-aerosol (3.6 mmol of Gd nebulized in total). During all nebulizations, the left bronchus was ligated and closed; thus, only the right lung received successive nebulizations

on aerosolized molecular components, DOTA-aerosol had a mean median aerodynamic diameter ranging between 3.35 and 4.65 μm .

The r_1 values were measured equal to 8.9 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ and 3.9 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ per Gd^{3+} ion at 3T and room temperature for AGuIX nanoparticle and gadoterate meglumine, respectively.

The flip angle optimizing the SNR in the pulmonary parenchyma before aerosol administration was found to be 5°. Anticipating an increase in the flip angle optimizing the SNR as well as the CNR after administration of DOTA-aerosol or NP-aerosol, the 4 flip angles used for the UTE sequence were set at 5, 8, 16, and 25°.

The increase in lung signal intensity following nebulization of nanoparticles suspension is exemplified in Figure 2. Here, the right lung received 3 consecutive nebulizations of 6 mL of nanoparticle solution, each nebulization followed by a series of UTE acquisitions. The cumulative amount of Gd^{3+} ion nebulized was equal to 1.8 mmol, 3.6 mmol, and 5.4 mmol. The time interval between 2 nebulizations was approximately 30 min, corresponding to the time required to perform the nebulization, position the lungs in the MRI scanner and perform the necessary MRI pre-adjustments (image localizer, magnetic field shimming, calculation of flip angle). It should be noted that no susceptibility artifacts were apparent at the interface between the lungs and the surrounding air of the enclosure.

The mean values of SE, measured in 3 different slices, after nebulization of nanoparticle solutions are shown in Figure 3. For all flip angle values, there is an increase in SE with the aerosolized quantities of nanoparticles. This increase is especially pronounced, and statistically significant, for the 2 highest doses of nanoparticles. There is also an increase in SE with increasing flip angle. These 2 increases are

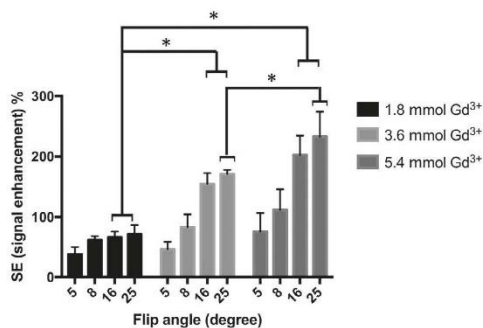


FIGURE 3 Bar plots of SE values between left lung (non-nebulized) and right lung nebulized with an aerosol of AGuIX nanoparticles. SE were measured for 4 flip angles and 3 different quantities of nebulized Gd. The asterisks indicate statistical significance ($P < .05$) between mean SE obtained with different quantities of nebulized Gd at identical flip angle. The error bars correspond to the SD obtained from 3 different measurements

consistent with the lowering of T_1 values due to the presence of Gd. Qualitatively, there is a homogeneous enhancement of signal intensity in the entire nebulized lung, including the most distal regions of the lung (it can be noted in particular the increased image intensity in the base of the right lung).

Similar qualitative and quantitative results are observed when nebulizing in the lung an aerosol of gadoterate meglumine solution as shown in Figure 4. For the same amount of nebulized Gd (3.6 mmol), the SEs obtained with the NP-aerosol (respectively, DOTA-aerosol) were equal to 46% (46%), 83% (85%), 155% (157%), and 171% (208%) for increasing flip angles equal to 5, 8, 16, and 25°.

For 1 of the lungs, 6 mL of saline solution were nebulized in the right lung (the left lung being ligated during the nebulization). No SE was observed following this nebulization.

The longitudinal relaxation times T_1 (mean \pm SD) measured in 3 ROIs avoiding large airways and located in the middle lobe of the nebulized right lung corresponding to the acquisitions shown in Figure 2 were found equal to 159 ± 3 ms, 104 ± 2 ms, 62 ± 13 ms after nebulization of, respectively, 1.8 mmol, 3.6 mmol, and 5.4 mmol of Gd^{3+} ion. The $T_{1\text{pre}}$ value measured in the Gd-free left lung was found equal to 2024 ± 5 ms. Examples of experimental data, theoretical signal intensity based on Equation 1, and computed T_1 values are shown in Supporting Information Figure S1.

Based on these T_1 values and on Equation 3, the concentrations of Gd^{3+} ion (mean \pm SD) were measured equal to 653 ± 14 μM , 1029 ± 22 μM , and 1807 ± 427 μM after cumulative nebulization of 1.8, 3.6, and 5.4 mmol of Gd^{3+} , respectively. A linear correlation ($R^2 = 0.96$) was observed between the concentration value and the cumulative quantity of airborne nanoparticles deposited within the respiratory tract (Supporting Information Figure S2).

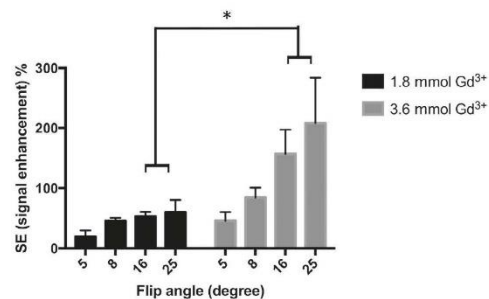


FIGURE 4 Bar plots of SE values between left lung (non-nebulized) and right lung nebulized with an aerosol of gadoterate meglumine solution. SE were measured for 4 flip angles and 2 different quantities of nebulized Gd. The asterisk indicates statistical significance ($P < .05$) between mean SE obtained with different quantities of nebulized Gd at identical flip angle. The error bars correspond to the SD obtained from 3 different measurements

The anatomical information accessible following the nebulization of NP-aerosol or DOTA-aerosol and the resulting increase in SNR and contrast can be appreciated in Figures 5 and 6. Figure 5 corresponds to a UTE coronal slice obtained after nebulization in the 2 lungs of 6 mL of NP-aerosol representing 1.8 mmol of Gd^{3+} . On this MRI image, the secondary pulmonary lobules enclosed by the hypo-intense interlobular septum are clearly visible. In the absence of aerosol, these anatomical structures are not observable in the UTE images. To preferentially visualize the airways, a 3D MIP was applied to a 3D UTE acquisition. In the image in Figure 6, up to 8 generations of airways are visible from the trachea to the bronchi of the secondary lobules with a diameter of a few millimeters close to the ultimate spatial resolution of the image. This image was acquired after nebulization in the 2 lungs of an NP-aerosol representing 3.6 mmol of Gd^{3+} . In the absence of aerosol, this level of anatomical detail is not present in the UTE images.

Example of images obtained with the lungs ventilated with tidal volumes are shown in Figure 7. The lungs did not receive any Gd-based aerosol. Not surprisingly, despite the robustness of UTE radial imaging with respect to motion, image quality (spatial resolution and SNR) is higher for acquisitions synchronized with ventilation. Note, however, that the total acquisition time increases from 3.5 min to 8 min for gated images.

The amounts of Gd measured with ICP-MS were equal to $40 \pm 9.1 \mu\text{g/g}$ and $78.6 \pm 10.5 \mu\text{g/g}$ for NP-aerosol and

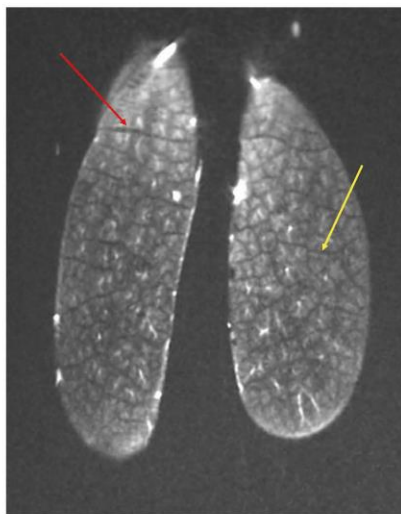


FIGURE 5 Coronal slice extracted from a 3D dataset obtained after nebulization of a 6 mL NP-aerosol (1.8 mmol of Gd^{3+}) in both lungs. In addition to the 2 lung fissures separating the 2 cranial lobes from the caudal lobes (red arrow), the secondary pulmonary lobules (mosaic pattern) are visible as well (yellow arrow)

DOTA-aerosol, respectively. By approximating the tissue density at 1 Kg/L, these quantities correspond to a Gd^{3+} concentration of 0.25 mM and 0.5 mM in the sampled tissue following NP-aerosol and DOTA-aerosol, respectively.

4 | DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Both nebulizations of DOTA-aerosol and NP-aerosol generate a homogeneous and complete enhancement of the pulmonary



FIGURE 6 3D MIP image obtained after nebulization in the 2 lungs of 3.6 mmol of Gd^{3+} from a solution of nanoparticles. Small bronchi located in secondary lobules can be easily visualized

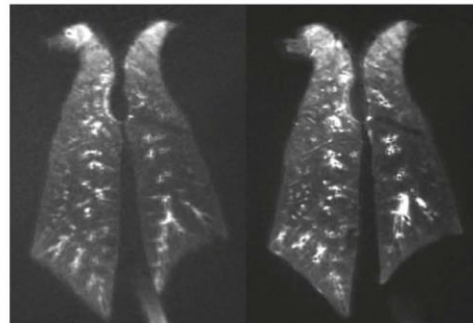


FIGURE 7 Coronal slices extracted from a 3D data set. The image on the left was acquired with the lungs ventilated in the MRI magnet. The image on the right was acquired during the ventilation phase corresponding to the expiration of the lungs with the acquisition triggered by a pressure sensor mounted on the airtight enclosure. The lungs did not receive any Gd-based aerosol

parenchyma and the SE measurements, performed in ROIs excluding visible airways, indicate that the aerosol penetrates deep into the lung to the level of terminal bronchioles with a diameter less than 1 mm. For the same amount of nebulized Gd^{3+} ion, DOTA-aerosol and NP-aerosol generate similar SE values (Figures 3 and 4), despite the lower relaxation rate of gadoterate meglumine ($3.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) compared with the one of the nanoparticle ($8.9 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). This can be related to a lower fraction of nanoparticles actually distributed inside the lungs compared with that obtained with the clinical contrast agent. Indeed, the fractions of solution that are deposited may depend on the nebulization medium and the nebulized material (e.g., molecular agent versus nanoparticle). A fraction of deposited nanoparticles twice as small as the fraction of deposited molecular marker was measured by the authors (data not published) in experiments using ^{99m}Tc -DTPA as molecular marker and ^{111}In -labeled AGuIX nanoparticles. These observations are consistent with the values of Gd concentration measured by ICP-MS, which are twice as high after DOTA-aerosol nebulization compared with NP-aerosol nebulization.

A peculiar property of the UTE imaging sequence is its lack of sensitivity to transverse relaxation. We used this feature to estimate the local concentration of Gd^{3+} ion into the lung. This quantification of Gd^{3+} concentration is especially important in view of the use of theranostic radiosensitizing agents such as the AGuIX nanoparticles.^{9,24} More generally, it is of course of great interest to be able to quantitate the regional deposition of an aerosol that contains MRI contrast agents. The difference observed between the Gd^{3+} concentration obtained using MRI (1 mM) and ICP-MS (0.25 mM) after nebulization of a 3.6 mmol Gd^{3+} NP-aerosol can be explained by the intrinsic difference in the way each of the techniques measures Gd concentration. The ICP-MS measurement provides an average concentration value in the sampled tissue and does not contain information on the distribution of the Gd within the analyzed sample.

On the other hand, the T_1 -weighted MRI protocol is sensitive to the heterogeneities in the distribution of Gd, even at a sub-pixel level. In the case of the lung, the MRI signal intensity from Gd-free lung parenchyma regions is very weak, close to the noise level, and contributes little to the overall MRI signal. As a result, the MRI signal originates mainly from regions where Gd is present and concentrated. The large MRI SE observed in the airways is indicative that, under the nonphysiological and ex vivo experimental conditions of this study, excess fluids are present in the airspace, lining the walls of the respiratory tract (from the bronchi down to the alveoli) and preventing the passage of Gd-based nanoparticles and contrast agents from the airspace to the tissue. The T_1 -weighted MRI protocol is essentially measuring the concentration of Gd confined in these liquid-lined airspaces, resulting in higher Gd concentration values than those obtained from the average ICP-MS measurement.

The linear correlation between the values of Gd^{3+} concentration measured using MRI and the cumulative amount of nebulized nanoparticle solution is an indication of the relevance of the MRI approach for assessing the amount of Gd^{3+} deposited in the lungs.

As seen from the SE in the Gd-enhanced images and in the MIP image, the Gd-based solutions are reaching very distal regions of the lungs. This observation is consistent with earlier findings obtained with this respiratory lung model using single photon emission computed tomography imaging techniques.^{20,21} However, details and spatial resolution obtained with the DOTA-aerosol and NP-aerosol are largely superior to the centimetric resolution that can be obtained using 3D gamma scintigraphy imaging approach (i.e., single photon emission computed tomography). In this study, an isotropic millimetric resolution allows to visualize the deposition of the aerosol down to the 8th generation of the respiratory tract in less than 4 min. In addition, these results are achieved without the radiation issues and complexity associated with nuclear imaging techniques. In view of these results, we conclude that the use of MRI-visible aerosol is a credible alternative to nuclear imaging techniques to qualitatively and quantitatively evaluate the effectiveness of nebulizers for regional aerosol deposition.

With regard to the potential of this approach for in vivo applications and possible transfer to the clinic, it can first be pointed out that the large SEs have been achieved with the nebulization of 3.6 mmol of Gd^{3+} from either the clinical contrast agent or the nanoparticles in a 6 mL solution. Based on the results (nonpublished data from the authors) obtained with a radioactive molecular marker, ^{99m}Tc -DTPA, nebulized with the same protocol, the fraction of the solution effectively entering the lungs can be estimated at 21% for DOTA-aerosol, corresponding to 0.76 mmol of Gd^{3+} ion. The remainder of the aerosol solution is split into 50% not being nebulized, 8% exhaled, and 21% located in the upper airways replica. In comparison, the dose of Gd^{3+} administered intravenously to a patient from a clinical contrast agent is around 8 mmol, an order of magnitude higher. Given the recent reports of long-term accumulation of Gd in the brain,²⁵ this is an encouraging indication of the applicability of this protocol to human in vivo imaging. Of note, due to its larger r_1 relaxivity per Gd^{3+} ion, the NP-aerosol is more effective to further decrease the amount of Gd administered.

The most conclusive results have been obtained on non-ventilated insufflated lungs, and it is obvious that the transition to in vivo imaging will require gating approaches or motion correction techniques to limit motion artifacts. The preliminary results reported in this study with gating techniques do indicate that high quality images can still be obtained on a ventilated lung. In an in vivo imaging protocol, the clearance of contrast agents and nanoparticles must also be considered. Previous in vivo studies have shown that these

Gd-based contrast agents and nanoparticles are able to cross the alveolar tissue barrier and are then eliminated by the kidneys.^{18,19} Results obtained on mouse models indicate an elimination half-life of 22 min from the lungs for gadoterate meglumine and 130 min for AGuIX nanoparticles. Such half-life values appear long enough and compatible with the protocol for imaging the lung deposition of Gd-based aerosolized solution in vivo.

A key clinical application that is being considered is the administration of nebulized aerosols containing theranostic agents. The AGuIX radiosensitizing nanoparticle, an example of this type of agent, has already shown its effectiveness in targeting tumors and improving radiotherapy in animal models of lung cancer.^{8,9} Other clinical applications could combine, in the same aerosol, a Gd-based diagnostic agent and a drug targeting a specific lung disease. Based on the results of this study, both molecular and nanoparticle aerosols can be used for an effective i.p. distribution and lung enhancement, bearing in mind that the fraction of aerosol deposited may vary depending on the composition of the aerosol and that the relaxivity r_1 per Gd³⁺ ion is greater for nanoparticles. It should be noted that the administration of Gd-based aerosol allows also in principle to carry out functional imaging of the lung with, in a first phase, the acquisition of i.p. aerosol deposition, linked to ventilation, then, over time, the possibility of imaging the clearance of the Gd-based agents linked to perfusion and exchanges between the airways, the pulmonary parenchyma, and the blood capillaries.

In summary, this study demonstrates that the distribution of aerosolized Gd-based contrast agent or nanoparticles can be visualized and quantified using UTE MRI in large animal ventilated lung model on a clinical MRI scanner. This protocol can be used for assessing and quantifying aerosol regional deposition with high spatial resolution (1 mm 3D isotropic) without ionizing radiation. With some adjustments to accommodate breathing and lung motion, for which the UTE MRI sequence is particularly well adapted, this approach could be used in the future for clinical applications with diagnostic or therapeutic Gd-based agents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank NH TherAguix for providing AGuIX nanoparticles and Canon Medical Systems for their technical and scientific support. This study was carried out within the IBIO (Institut de Bio-Imagerie de Bordeaux) and was achieved within the context of the Laboratory of Excellence TRAIL ANR-10-LABX-57.

CONFLICTS OF INTEREST

N.I. and B.Z. are employees of Canon Medical Systems. Y.C., F.L. and O.T. are consultants for NH Theraguix company.

ORCID

Yannick Crémillieux  <https://orcid.org/0000-0002-3262-5983>

REFERENCES

- Berthéze Y, Vexler V, Clément O, Mühler A, Moseley ME, Brasch RC. Contrast-enhanced MR imaging of the lung: assessments of ventilation and perfusion. *Radiology*. 1992;183:667–672.
- Haage P, Karaagac S, Spüntrup E, Truong HT, Schmidt T, Günther RW. Feasibility of pulmonary ventilation visualization with aerosolized magnetic resonance contrast media. *Invest Radiol*. 2005;40:85–88.
- Sood BG, Shen Y, Latif Z, et al. Aerosol delivery in ventilated newborn pigs: an MRI evaluation. *Pediatr Res*. 2008;64:159–164.
- Mosbah K, Ruiz-Cabello J, Berthéze Y, Crémillieux Y. Aerosols and gaseous contrast agents for magnetic resonance imaging of the lung. *Contrast Media Mol Imaging*. 2008;3:173–190.
- Wang H, Sebré C, Judé S, et al. Quantitative Gd-DOTA-based aerosol deposition mapping in the lungs of asthmatic rats using 3D UTE-MRI. *NMR Biomed*. 2018;31(12):e4013.
- Bianchi A, Gobbo OL, Dufort S, et al. Orotracheal manganese-enhanced MRI (MEMRI): an effective approach for lung tumor detection. *NMR Biomed*. 2017;30(11):e3790.
- Tassali N, Bianchi A, Lux F, et al. MR imaging, targeting and characterization of pulmonary fibrosis using intra-tracheal administration of gadolinium-based nanoparticles. *Contrast Media Mol Imaging*. 2016;11:396–404.
- Bianchi A, Dufort S, Lux F, et al. Targeting and in vivo imaging of non-small-cell lung cancer using nebulized multimodal contrast agents. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;24(111):9247–9252.
- Dufort S, Bianchi A, Henry M, et al. Nebulized gadolinium-based nanoparticles: a theranostic approach for lung tumor imaging and radiosensitization. *Small*. 2015;11:215–221.
- Lee Z, Berridge MS, Nelson AD, Heald DL. The effect of scatter and attenuation on aerosol deposition as determined by gamma scintigraphy. *J Aerosol Med*. 2001;14:167–183.
- Biddiscombe MF, Meah SN, Underwood SR, Usmani OS. Comparing lung regions of interest in gamma scintigraphy for assessing inhaled therapeutic aerosol deposition. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2011;24:165–173.
- Johnson KM, Fain SB, Schiebler ML, Nagle S. Optimized 3D ultrashort echo time pulmonary MRI. *Magn Reson Med*. 2013;70:1241–1250.
- Togao O, Tsuji R, Ohno Y, Dimitrov I, Takahashi M. Ultrashort echo time (UTE) MRI of the lung: assessment of tissue density in the lung parenchyma. *Magn Reson Med*. 2010;64:1491–1498.
- Lederlin M, Crémillieux Y. Three-dimensional assessment of lung tissue density using a clinical ultrashort echo time at 3 Tesla: a feasibility study in healthy subjects. *J Magn Reson Imaging*. 2014;40:839–847.
- Roach DJ, Crémillieux Y, Serai SD, et al. Morphological and quantitative evaluation of emphysema in chronic obstructive pulmonary disease patients: a comparative study of MRI with CT. *J Magn Reson Imaging*. 2016;44:1656–1663.
- Glover GH, Pauly JM. Projection reconstruction techniques for reduction of motion effects in MRI. *Magn Reson Med*. 1992;28:275–289.

17. Bergin CJ, Pauly JM, Macovski A. Lung parenchyma: projection reconstruction MR imaging. *Radiology*. 1991;179:777–781.
18. Bianchi A, Lux F, Tillement O, Crémillieux Y. Contrast enhanced lung MRI in mice using ultra-short echo time radial imaging and intratracheally administrated Gd-DOTA-based nanoparticles. *Magn Reson Med*. 2013;70:1419–1426.
19. Bianchi A, Dufort S, Lux F, et al. Quantitative biodistribution and pharmacokinetics of multimodal gadolinium-based nanoparticles for lungs using ultrashort TE MRI. *MAGMA*. 2014;27:303–316.
20. Perinel S, Leclerc L, Prévôt N, et al. Micron-sized and submicron-sized aerosol deposition in a new ex vivo preclinical model. *Respir Res*. 2016;17:78.
21. Perinel S, Pourchez J, Leclerc L, et al. Development of an ex vivo human-porcine respiratory model for preclinical studies. *Sci Rep*. 2017;24(7):43121.
22. Lux F, Mignot A, Mowat P, et al. Ultrasmall rigid particles as multimodal probes for medical applications. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2011;16:50:12299–12303.
23. Crémillieux Y, Briguet A, Deguin A. Projection-reconstruction methods: fast imaging sequences and data processing. *Magn Reson Med*. 1994;32:23–32.
24. Lux F, Tran VL, Thomas E, et al. AGuIX® from bench to bedside-transfer of an ultrasmall theranostic gadolinium-based nanoparticle to clinical medicine. *Br J Radiol*. 2018;18:20180365.
25. Kanda T, Fukusato T, Matsuda M, et al. Gadolinium-based contrast agent accumulates in the brain even in subjects without severe renal dysfunction: evaluation of autopsy brain specimens with inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Radiology*. 2015;276:228–232.

SUPPORTING INFORMATION

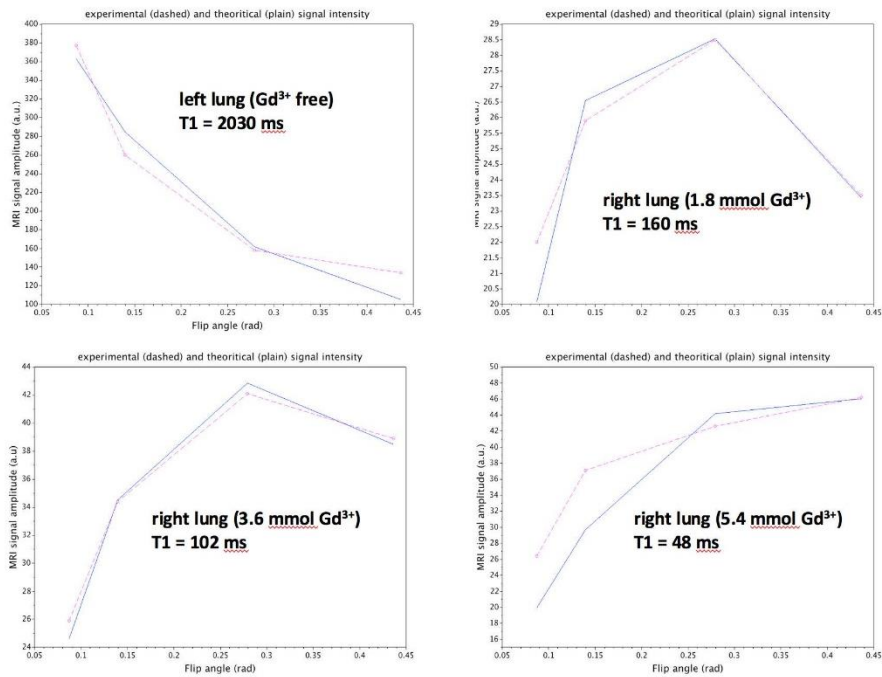
Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

FIGURE S1 MRI signal intensity as a function of flip angle. Pink dashed lines correspond to experimental data. Blue plain lines correspond to theoretical MRI signal intensity based on Equation 1 obtained with the T_1 values given in each of the graph, namely, 2024 ± 5 ms without Gd^{3+} , 159 ± 3 ms with 1.8 mmol of Gd^{3+} , 104 ± 2 ms with 3.6 mmol of Gd^{3+} , and $62 \text{ ms} \pm 13 \text{ ms}$ with 5.4 mmol of Gd^{3+}

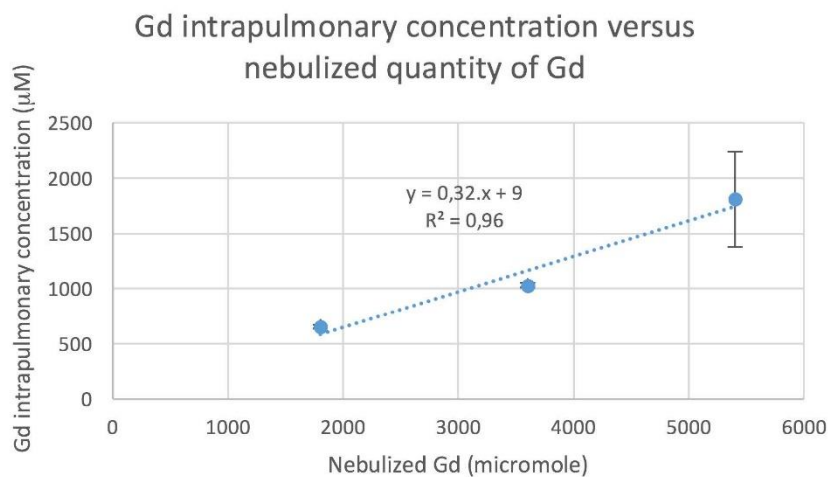
FIGURE S2 Computed concentration of Gd^{3+} in the lung versus the cumulative quantity of nebulized Gd^{3+} in the lung
VIDEO S1 Video filmed over several cycles of inhalation/exhalation carried out on a porcine lung placed inside the airtight enclosure. The left bronchus is ligated and only the right lung is ventilated

How to cite this article: Crémillieux Y, Montigaud Y, Bal C, et al. Three-dimensional quantitative MRI of aerosolized gadolinium-based nanoparticles and contrast agents in isolated ventilated porcine lungs. *Magn Reson Med*. 2019;00:1–9.
<https://doi.org/10.1002/mrm.28041>

3. Informations supplémentaires



Supporting Information Figure S1. MRI signal intensity as a function of flip angle. Pink dashed lines correspond to experimental data. Blue plain lines correspond to theoretical MRI signal intensity based on Eq. 1 obtained with the T_1 values given in each of the graph, namely, 2024 ± 5 ms without Gd^{3+} , 159 ± 3 ms with 1.8 mmol of Gd^{3+} , 104 ± 2 ms with 3.6 mmol of Gd^{3+} and $62 \text{ ms} \pm 13 \text{ ms}$ with 5.4 mmol of Gd^{3+} .



Supporting Information Figure S2. Computed concentration of Gd^{3+} in the lung versus the cumulative quantity of nebulized Gd^{3+} in the lung.

4. Conclusions et perspectives

Cette étude a permis le développement d'une méthode fine d'acquisition en IRM de dépôts d'aérosol avec une possible quantification des dépôts d'un agent de contraste au gadolinium, qu'il soit sous forme moléculaire ou nanoparticulaire. Enfin, une attention particulière a été portée à la correction du mouvement des structures respiratoires, afin d'obtenir des images de qualité dans un temps compatible avec un examen clinique de routine.

Recherche de solutions pour l'aérosolisation de principes actifs bronchodilatateurs avec une cigarette électronique

1. Introduction

Cette étude fait suite à des travaux préalablement publiés par l'équipe (**Pourchez et al. 2017b, 2018; Prévôt et al. 2017**) sur les émissions de e-cigarette et sur la versatilité des propriétés aérodynamiques de l'aérosol en fonction des réglages du dispositif.

L'objectif de ces travaux était, par formulation galénique, de permettre l'aérosolisation de différents PA de délivrance pulmonaire, afin de traiter des pathologies obstructives, telles que la BPCO ou l'asthme.

2. Données préliminaires

Les travaux préalables ont montré qu'il était possible d'aérosoliser de la terbutaline, à hauteur de quelques µg de PA par bouffées, avec une cigarette électronique. Toutefois, pour représenter un potentiel clinique, les doses administrées doivent être suffisamment élevées pour permettre une durée de traitement équivalente ou plus courte que les traitements conventionnels par nébulisation des PA.

Ainsi, des travaux de formulations galéniques ont été réalisés, dans le cadre de deux stages de M1 d'étudiants en pharmacie. Au travers d'études de stabilité, de rhéologie et de solubilisation de PA à l'aide de tensioactifs, leur projet a permis de tester différentes hypothèses, qui se sont révélées fructueuses.

Différents PA ont été testés (terbutaline, salbutamol et ipratropium) dans différentes formulations composées d'un mélange de propylène glycol et de glycérine végétale ou dans une solution pure de 1,3-propanediol. Les émissions de e-cigarette ont été caractérisées selon deux méthodes différentes : la détermination du MMAD avec différents impacteurs en cascade et la détermination de la fraction respirable du PA à l'aide d'un Glass Twin Impinger (GTI).

Les données obtenues semblent prometteuses mais d'importants facteurs confondants retardent les avancées de cette étude. En effet, des études plus poussées sont nécessaires pour

comprendre et contrôler les interactions entre la formulation galénique, la composition de la résistance et de la mèche et le PA utilisé.

3. Perspectives

Après des premiers essais concluants, la complexité de ce projet n'a pas été compatible avec les différents projets de ces travaux de thèse. Aussi, une nouvelle doctorante a-t-elle été recrutée pour mener à bien ce projet.

NNT: *Communiqué le jour de la soutenance*

Yoann MONTIGAUD

***Ex vivo* preclinical models to assess the treatment of respiratory diseases
with pulmonary delivery of aerosols**

Specialty: Process engineering

Keywords: anatomical *ex vivo* models, respiratory tract, aerosols, aerosol therapy, nanoparticles, mechanical ventilation, respiratory diseases

Abstract :

Pulmonary delivery of active pharmaceutical ingredients seems to be a preferential administration route to treat respiratory diseases. Indeed, with an important surface and huge vascularisation, the respiratory system presents all the needed criteria to deliver drugs, for both local and systemic uses. However, reality does not meet theory. For systemic uses, there are still major issues to cross the biological and physicochemical barriers to obtain enough absorption to have therapeutic effects like other administration routes. For local uses, despite a wide therapeutic arsenal, there is still a need for better targeting of the aerosol to reach the diseased regions to reduce the risk of adverse and/or increase the efficacy.

Hence, there is a need for research and development to improve medical devices to obtain a better control of aerosol deposition patterns. However, ethical restrictions associated with human experimentation are not compatible with such needs. Thus, preclinical models, such as *in vitro* cellular models, *in vivo* animal models and *in silico* computational models, are required to estimate and assess the pulmonary deposition of therapeutic aerosols and their potential biological effects. However, these models sometimes lack relevance and are barely transposable to human due to anatomical and physiological differences between animal species and humans or also due to the needed simplification of a model.

Following the previous development of a preclinical chimeric *ex vivo* model, the present work aims to develop a panel of preclinical respiratory models to study and assess aerosol deposition patterns. Thus, the knowledge systematisation could be used to facilitate clinical transfer of aerosol technologies to bridge the data gap and to reach the unmet medical needs.

Each *ex vivo* model tends to be biomimetic of a respiratory pathology. Then, respiratory physiology is validated by comparison with data, both humans and animals, published in the literature. Then, the aerosol deposition pattern is assessed and compared to published data, to ensure its extrapolability as well as to correlate its relevance with other preclinical models. Then, the developed models were applied to clinical issues on a bed to bench to bed approach. Applications were various, such as the optimal position of a nebuliser during aerosol treatments for patients under mechanical ventilation or the regional aerosol deposition of an aerosol generated with an electronic nicotine delivery system.

To conclude, the various developed *ex vivo* models showed a good experimental reproducibility and repeatability as well as aerosol deposition patterns similar to those observed on patients with respiratory diseases. Moreover, the *ex vivo* models allowed to overstep certain ethical restriction and to reduce the economical and organisational limits inherent to other preclinical models. Lastly, through different applications, the *ex vivo* models have shown their usefulness as new preclinical tools, complementarily to *in silico*, *in vitro* and as a potential surrogate to some *in vivo* animal models. Moreover, the *ex vivo* models were developed as a new approach following the 3R guidelines.

École Nationale Supérieure des Mines
de Saint-Étienne

NNT : *Communiqué le jour de la soutenance*

Yoann MONTIGAUD

**Modèles précliniques *ex vivo* pour l'étude de la délivrance pulmonaire
d'aérosols dans le traitement de pathologies pulmonaires**

Spécialité : Ingénierie des procédés

Mots-clefs : modèle anatomique *ex vivo*, tractus respiratoire, aérosols, aérosolthérapie, nanoparticules, ventilation mécanique, pathologies respiratoires

Résumé :

La délivrance pulmonaire de principes actifs semble être une voie d'administration préférentielle pour le traitement des pathologies respiratoires. Doté d'une vaste surface d'échange et d'une vascularisation importante, l'appareil respiratoire a toutes les qualités recherchées pour l'administration de médicaments, à usage locaux ou systémiques. Cependant, la réalité en aérosolthérapie est bien loin de la théorie. En effet, pour les usages systémiques, l'aérosolthérapie peine encore à franchir les différentes barrières physico-chimiques et biologiques pour permettre une absorption suffisante pour obtenir des effets comparables à d'autres voies d'administration. Pour les usages locaux, la diversité des principes actifs utilisés, bien qu'efficace, nécessitent parfois un ciblage des dépôts pour accroître leur efficacité tout en réduisant le risque d'effets indésirables.

Ainsi, afin d'améliorer les dispositifs d'aérosolthérapie pour un meilleur contrôle des profils de dépôts des aérosols, des futures recherches sont nécessaires. Toutefois, les restrictions éthiques liées à l'expérimentation sur la personne humaine ne sont pas compatibles avec de tels besoins. De modèles précliniques sont, donc, nécessaires, tels que les modèles cellulaires *in vitro* ou les modèles animaux *in vivo* qui permettent d'apprécier les dépôts pulmonaires d'un aérosol, alors que des modèles *in silico* permettent d'estimer les dépôts, à partir des caractéristiques physicochimiques des particules aérosolisées. Cependant, ces modèles manquent parfois de pertinence ou sont difficilement extrapolables du fait de l'administration des aérosols, des différences anatomiques et physiologiques entre les espèces animales et l'être humain ou encore de la simplification des structures anatomiques.

Ces travaux de thèse ont donc pour objectif, en capitalisant sur le développement d'un modèle chimérique *ex vivo*, de développer un panel de modèles précliniques respiratoires dans le but d'étudier et d'évaluer les profils de dépôts des aérosols dans l'appareil pulmonaire, afin de systématiser les connaissances pour permettre un transfert clinique facilité des technologies d'aérosolthérapie.

Chaque modèle *ex vivo* développé tend à être biomimétique d'une pathologie pulmonaire ou d'un syndrome respiratoire. Il fait, ensuite, l'objet d'une validation de la physiologie respiratoire en comparaison avec des données humaines. Enfin, le profil de dépôt des aérosols est étudié et comparé à des données *in vivo* humaines et animales, afin de s'assurer de l'extrapolabilité des résultats et du placement relatif du modèle par rapport aux modèles animaux existants. Dans un second temps, les modèles développés ont été appliqués à des cas cliniques pratiques, tels que la recherche d'une position optimale pour le nébuliseur lors de la nébulisation d'un médicament chez un patient ventilé par un respirateur médical ou encore l'étude de la régionalisation des dépôts d'un aérosol émis par un dispositif de type cigarette électronique.

En conclusion, les différents modèles précliniques *ex vivo* développés ont montré une répétabilité et une reproductibilité expérimentale, ainsi que des profils de dépôts d'aérosols similaires à ceux rencontrés chez des patients atteints des pathologies simulées. En outre, ces modèles permettent de s'affranchir d'un certain nombre de restrictions éthiques, tandis qu'ils outrepassent les limites économiques et organisationnelles rencontrées par les autres modèles précliniques. Enfin, au travers de différentes applications, les modèles *ex vivo* ont montré leur utilité en tant que nouvel outil de recherche préclinique, complémentaire aux modèles *in vitro*, *in silico* et en remplacement de certains modèles animaux *in vivo* dans le cadre d'une approche 3R de la recherche en aérosolthérapie ou pour le développement de nouveaux dispositifs médicaux d'aérosolisation.